

GENETYKA MOLEKULARNA



Wydawnictwo Naukowe PWN

GENETYKA MOLEKULARNA



Wydawnictwo Naukowe PWN

GENETYKA MOLEKULARNA

Ewa Bartnik	Uniwersytet Warszawski
Mieczysław Chorąży	Instytut Onkologii
Magdalena Fikus	Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Wacław Gajewski	Uniwersytet Warszawski
Witold Jachymczyk	Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Andrzej Jerzmanowski	Uniwersytet Warszawski
Halina Krzanowska	Uniwersytet Jagielloński
Barbara Lipińska	Uniwersytet Gdański
Włodzimierz	
Ostoja-Zagórski	Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Krzysztof Staroń	Uniwersytet Warszawski
Piotr Stępień	Uniwersytet Warszawski
Stanisław Szala	Instytut Onkologii
Alina Taylor	Uniwersytet Gdański
Karol Taylor	Uniwersytet Gdański
Piotr Węgleński	Uniwersytet Warszawski

Okładkę i strony tytułowe projektowała *Maryna Wiśniewska*

Redaktor *Anna Graffstein*

Redaktor techniczny *Jolanta Cibor*



56/59

5248

577.21

Tytuł dotowany przez Ministra Edukacji Narodowej

Copyright © by Wydawnictwo Naukowe PWN Sp. z o.o.
Warszawa 1995

ISBN 83-01-11830-X

GENETYKA MOLEKULARNA

Praca zbiorowa pod redakcją
Piotra Węgleńskiego

Wydawnictwo Naukowe PWN
Warszawa 1995

Mojsak - Bety

PRZEDMOWA

Książka ta jest pisana z myślą o studentach biologii, medycyny i rolnictwa, a także wszystkich tych osobach, które ukończyły studia kilka lub kilkanaście lat temu i chciałyby uzupełnić swoją wiedzę. Genetyka i cała biologia molekularna zmieniły się w ostatnim dziesięcioleciu tak bardzo, że wszystkie dostępne polskojęzyczne podręczniki stały się nieaktualne. Ostatni podręcznik W. Gajewskiego pt. *Genetyka ogólna i molekularna* pochodzi z roku 1983. Zbiorowe opracowanie *Biologia molekularna*, wydane przez PWN w roku 1987 ma wiele wad wynikających z faktu, że jest to przeróbka książki pisanej w końcu lat 70., ponadto nie zawiera ono kilku działów o ogromnym dla współczesnej biologii znaczeniu. W tej sytuacji podjęcie prac nad napisaniem aktualnego i w miarę kompletnego podręcznika genetyki molekularnej wydało się nam nie tylko uzasadnione, ale i konieczne.

W książce tej pominięto niemal wszystkie zagadnienia genetyki klasycznej. Jedynie w rozdziale 1 czytelnik znajdzie nawiązanie do doświadczeń Mendla i podstawowych zasad analizy genetycznej. Materiał ten zamieszczono po to, aby uświadomić czytelnikowi związki pomiędzy genetyką klasyczną i molekularną i aby wprowadzić pewne podstawowe terminy dotyczące struktury i funkcjonowania genów.

Warto sobie również zdawać sprawę z tego, że książka ta ze względu na swoją niewielką objętość, zawiera skrótowe ujęcia większości omawianych zagadnień. Każdemu z zagadnień, którym poświęcono poszczególne rozdziały można by z powodzeniem poświęcić całą książkę i nie byłaby ona przesadnie szczegółowa. Niektóre podręczniki o charakterze ogólnym, takie jak na przykład słynny *Molecular biology of the gene* pod redakcją Watsona, są o wiele bardziej rozbudowane i sądzę, że powinny znaleźć się na polskim rynku niezależnie od tej książki.

Jeden z rozdziałów książki dotyczy manipulacji wykonywanych na DNA. Jest to ta sfera genetyki molekularnej, w której w ostatnich latach dokonał się

największy postęp i która ma ogromne znaczenie zarówno dla wszystkich innych dziedzin biologii, jak i dla medycyny, biotechnologii i innych działów zastosowań praktycznych. Kilka omówionych w tym rozdziale metod i ogólny opis zasad techniki rekombinowania i klonowania DNA powinny dać czytelnikowi wyobrażenie o możliwościach technicznych, które otwały się przed współczesnymi genetykami, ale należy zdawać sobie sprawę z tego, że istnieją kilkusetstronicowe książki zajmujące się na przykład wyłącznie techniką PCR i jej różnymi zastosowaniami.

Umiejętność manipulowania genami to jedna z najważniejszych zdobyczy nauki wieku XX. Z perspektywy kilkuset lat będzie prawdopodobnie wymieniana jako równocenna z umiejętnością rozbijania atomów. Już obecnie idzimy jak wielkie konsekwencje ma ona dla rozwoju nauk biologicznych. Nie ma praktycznie żadnej dziedziny biologii, włączając w to takie jej działy, jak biologia środowiska czy paleobiologia, które pozornie wydawałyby się odległe od genetyki molekularnej, w których techniki klonowania genów i manipulowanie nimi nie znalazłyby zastosowania. Z miesiąca na miesiąc pojawiają się nowe zastosowania technik inżynierii genetycznej. Niektóre z nich są omówione w ostatnim rozdziale tej książki. Można mieć pewność, że w przyszłości będzie ich o wiele więcej i że będą miały kapitalne znaczenie, zwłaszcza w medycynie i w rolnictwie.

Mamy nadzieję, że książka ta pomoże zrozumieć najważniejsze zjawiska i procesy biologiczne, a także ukaże przynajmniej niektóre sfery zastosowań współczesnej genetyki molekularnej.

Prof. dr hab. *Piotr Węgleński*

SPIS TREŚCI

1. Podstawowe koncepcje genetyczne i wybrane metody analizy genetycznej • Piotr Węgleński	15
1.1. Dziedziczenie ma charakter jednostkowy	15
1.2. Geny mieszczą się w chromosomach	19
1.3. Geny zajmują stałe miejsca w chromosomach i mogą rekombinować	21
1.4. Materiałem genetycznym jest DNA	23
1.5. Geny odpowiadają za syntezę białek	24
1.6. Rekombinacja może zachodzić również i wewnątrz genu	25
1.7. Mutacje w różnych genach uzupełniają się (komplementują), a w jednym (na ogół) nie	26
1.8. Analiza genetyczna bakterii	29
1.8.1. Koniugacja	30
1.8.2. Transformacja	33
1.8.3. Transdukcja	33
1.9. Nie wszystkie geny lokują się w chromosomach	35
2. DNA — budowa i właściwości • Andrzej Jerzmanowski	37
2.1. Wiele cech strukturalnych cząsteczki DNA wynika z właściwości zasad	37
2.2. Lokalna sekwencja zasad w DNA wywiera silny wpływ na konformację i właściwości podwójnego heliksu	44
2.3. Na powierzchni podwójnego heliksu występują dwie bruzdy	44
2.4. Parametry służące do opisu lokalnej struktury podwójnego heliksu	45
2.5. Struktura fragmentów DNA zawierających sekwencje bogate w AT	48
2.6. Lokalne sekwencje określają podatność na rozkręcenie i zginanie	49
2.7. Architektura DNA a inicjacja transkrypcji	52
2.8. Pętle w DNA	53
2.9. Superhelikalne formy DNA	54
2.10. Solenoidowe (toroidalne) i plektonemiczne (przeplecione) superzwinięcie DNA	57
3. Replikacja DNA • Witold Jachymczyk	59
3.1. Podstawowe reguły procesu replikacji DNA	59
3.1.1. Replikacja jest procesem semikonserwatywnym	60

3.1.2. Inicjacja replikacji zachodzi w ściśle określonych sekwencjach nukleotydów zgromadzonych w specyficznych miejscach chromosomu, zwanych „origin”	61
3.1.3. Replikon — jednostka replikacji	62
3.1.4. Replikacja DNA jest inicjowana przez krótkie odcinki RNA służące jako startery dla polimerazy DNA	64
3.1.5. Replikacja DNA sterowana jest przez duże, wieloenzymatyczne kompleksy	64
3.1.6. Struktura chromosomów wywiera wpływ na proces replikacji	64
3.1.7. Replikacja DNA jest ściśle związana z procesem transkrypcji	65
3.1.8. Terminacja replikacji może być zapisana w sekwencji genomu	65
3.2. Inicjacja procesu replikacji DNA	66
3.2.1. Inicjacja replikacji w dwuniciowej cząsteczce bakteryjnego DNA	67
3.2.2. Inicjacja replikacji DNA bakteriofaga λ	71
3.2.3. Inicjacja replikacji przez polimerazę RNA — formowanie pętli D i R	73
3.2.4. Inicjacja replikacji w jednoniciowej cząsteczce DNA	76
3.2.5. Budowa primosomu	76
3.2.6. Równocześnieść obu typów primosomów	79
3.2.7. Inicjacja replikacji DNA przez nacinanie jednej z nici w kolistym dwuniciowym genomie. Replikacja typu obracającego się koła	80
3.2.8. Inicjacja replikonów liniowych. Starterowy RNA może być zastępowany przez cząsteczki białkowe	81
3.2.9. Inicjacja replikacji DNA w komórkach eukariontów	84
3.2.10. Inicjacja replikacji DNA w komórkach drożdży. Sekwencje ARS	87
3.2.11. Inicjacja replikacji DNA w komórkach wyższych eukariontów	88
3.3. Elongacja DNA	89
3.3.1. Polimerazy DNA	90
3.3.2. Bakteryjne polimerazy DNA	91
3.3.3. Asymetryczna budowa holoenzymu polimerazy III DNA	95
3.3.4. Polimerazy DNA komórek eukariotycznych	97
3.3.5. Budowa eukariotycznych widełek replikacyjnych	99
3.3.6. Udział histonów w replikacji	100
3.3.7. Białka wspomagające replikację	101
3.4. Terminacja replikacji	105
4. Fizyczna organizacja genomu • Krzysztof Staroń	110
4.1. Genom wiroidów	111
4.2. Genom wirusów	111
4.3. Napięcie torsyjne w genomie bakteryjnym	113
4.3. Białka genomu bakteryjnego	117
4.5. Histony	118
4.6. Białka niehistonowe	118
4.7. Nukleosom	119
4.8. Lokalizacja nukleosomów w stosunku do sekwencji nukleotydów	121
4.9. Włókno chromatypowe	123
4.10. Domeny chromatypowe	125
4.11. Centromer	126
4.12. Sekwencje telomerowe	126
4.13. Architektura jądra interfazowego	126
4.14. Odtwarzanie jądra chromatyny	127
4.15. Euchromatyna i heterochromatyna	127
4.16. Chromatyna aktywna transkrypcyjnie	128
4.17. Modyfikacje białek i DNA w chromatynie aktywnej transkrypcyjnie	130
4.18. Miejsca nadwrażliwe na nukleazy	130
4.19. Nietypowe konformacje DNA w chromatynie aktywnej transkrypcyjnie	131

5. Kod genetyczny i biosynteza białek • Włodzimierz Zagórski-Ostoja	134
5.1. Częsteczką adaptorową, pojęcie antykodonu	136
5.2. Schemat translacji	137
5.3. Struktura rybosomu	141
5.4. Rybosomowe kwasy rybonukleinowe (rRNA)	142
5.5. Białka rybosomowe	143
5.6. Odstępstwa od kodu uniwersalnego	144
5.7. Zapis w mRNA może się różnić od zapisu w DNA	146
5.8. Redagowanie może wprowadzić dodatkowy kodon terminalny	146
5.9. Redagowanie może kreować kodon inicjacyjny	147
5.10. Redagowanie może przywrócić treść kodu uniwersalnego	147
5.11. Redagowanie może nadać sens informacji, kreując otwarte ramki odczytu w rezultacie licznych rozrzuconych insercji	148
5.12. Redagowanie może nadać sens informacji na skutek blokowania insercji urydyn i delekcji urydyn	148
5.13. Transferowy RNA (tRNA)	149
5.14. Swoistość aminoacylacji tRNA	150
5.15. Supresorowe tRNA	151
5.16. Swoistość aminoacylacji może być określona przez nietypową parę zasad umieszczoną w ramieniu aminokwasowym	152
5.17. Supresja może zachodzić w wyniku „omyłek” rybosomów. Dwuznaczność translacji	152
6. Rekombinowanie i klonowanie DNA • Piotr Węgleński, Magdalena Fikus	156
6.1. Wyodrębnianie i powielanie genów	157
6.2. Enzymy restrykcyjne	159
6.3. Mapy restrykcyjne	160
6.4. Wektory	161
6.4.1. Bakteryjne wektory plazmidowe	161
6.4.2. Wektory pochodne bakteriofagów	165
6.4.3. Wektory drożdżowe	168
6.4.4. Wektory stosowane dla wszystkich eukariontów	169
6.5. Wprowadzanie DNA do komórki i całych organizmów	171
6.6. Identyfikacja zrekombinowanych genów	173
6.7. Charakterystyka sklonowanych genów — sekwencjonowanie DNA	178
6.8. Wykrywanie sekwencji DNA wiążących białka	181
6.9. Powielanie genów bez ich klonowania: technika PCR	182
6.10. Ukierunkowana mutageneza	183
6.11. Wędrówki i skoki po chromosomach	188
6.12. Komputerowa analiza genów	190
7. Struktura i działanie genów prokariotycznych • Karol Taylor, Alina Taylor	193
7.1. Transkrypcja	193
7.2. Polimeraza RNA	194
7.3. Promotory	196
7.4. Czynniki sigma (σ)	198
7.5. Indukcja i represja	201
7.6. Indukcja operonu laktozowego	201
7.7. Represja operonu biosyntezy tryptofanu	206
7.8. Represja kataboliczna	208
7.9. Regulacja azotowa i enhancery	210
7.10. Terminatory	215

7.11. Atenuacja	220
7.12. Antyterminacja	222
7.13. Uwagi końcowe	224
8. Struktura i działanie genów eukariotycznych • Ewa Bartnik	226
8.1. W komórkach <i>Eukaryota</i> trzy różne rodzaje polimeraz RNA przeprowadzają transkrypcję	227
8.2. Polimerazy RNA wiążą się z DNA tylko w obecności dodatkowych czynników transkrypcyjnych	227
8.3. Polimeraza I odpowiedzialna jest za syntezę trzech klas rRNA	228
8.4. Polimeraza III RNA syntetyzuje wiele klas małych RNA	228
8.5. Geny kodujące białka są transkrybowane przez polimerazę II	230
8.6. Promotory dla polimerazy II składają się z wielu sekwencji, z którymi wiążą się czynniki transkrypcyjne	230
8.7. Sekwencje wzmacniające transkrypcję, podobnie jak promotory, wiążą czynniki transkrypcyjne, ale w odróżnieniu od promotorów wpływają na ekspresję niezależnie od swojego położenia i orientacji względem genu	231
8.8. Czynniki transkrypcyjnymi mogą być białka o różnej budowie	232
8.9. Regulacja niektórych genów została już dobrze poznana	234
8.10. Niektóre geny nie podlegają regulacji	235
8.11. Geny eukariotyczne są najczęściej nieciągłe	235
8.12. Mechanizmy wycinania intronów	236
8.13. Regulacja ekspresji genów u <i>Eukaryota</i> odbywa się też po transkrypcji	239
8.14. W pewnych układach transkrypt nie jest kolinearny z genem — redagowanie RNA (editing)	240
8.15. Regulacja przez wybór miejsca terminacji transkrypcji	243
8.16. Regulacja przez wybór jednej z dróg składania transkryptu	245
8.17. Regulacja eksportu mRNA do cytoplazmy	245
8.18. Regulacja stabilności mRNA	246
8.19. Regulacja stabilności białek	246
8.20. Białka towarzyszące	247
9. Mutageneza, reperacja i rekombinacja DNA • Wacław Gajewski	248
9.1. Mutageneza i reperacja DNA	250
9.2. Mutageneza samorzutna (spontaniczna)	251
9.3. Polimeraza DNA III <i>E. coli</i> w trakcie replikacji dokonuje korekty mylnie włączonych zasad	252
9.4. Poreplikacyjna naprawa przez wycinanie niewłaściwie sparowanych zasad	252
9.5. W czasie replikacji DNA mogą powstawać delecje bądź addycje nukleotydów	254
9.6. Modyfikacje zasad w DNA mogą być źródłem mutacji samorzutnych	255
9.7. Gorące miejsca mutacji w genach	256
9.8. Mutacje indukowane	257
9.9. Mutageny chemiczne wywołują różnego typu uszkodzenia DNA	259
9.10. Rekombinacja DNA	261
9.11. Rekombinacja homologiczna (uprawniona) zachodzi między homologicznymi cząsteczkami DNA	261
9.12. Białko RecA u <i>E. coli</i> dopasowuje do siebie komplementarne jednoniciowe DNA pochodzące z odrębnych cząsteczek DNA	263
9.13. Heterodupleksy powstające w procesie rekombinacji są przyczyną zjawiska konwersji genów	264
9.14. Udział rekombinacji w procesach reperacji DNA	267
9.15. Mutageniczny system SOS naprawy DNA u <i>E. coli</i>	268
9.16. Rekombinacja może zachodzić także między niehomologicznymi cząsteczkami DNA	269

9.17. Ruchome elementy genetyczne, czyli transpozony	270
9.18. Transpozony bakteryjne	272
9.19. Bardziej złożone bakteryjne transpozony typu <i>Tn</i>	273
9.20. Niektóre transpozony mają właściwości zbliżone do retrowirusów	276
9.21. Integracja retrowirusów do chromosomów gospodarza	276
9.22. Retrotranspozony <i>Ty</i> u drożdży mają wiele wspólnych właściwości z retrowirusami	278
9.23. Wykorzystanie transpozonów w genetyce molekularnej	279
10. Geny a różnicowanie się i rozwój • Halina Krzanowska	280
10.1. Zjawisko różnicowania się (dyferencjacji)	280
10.1.1. Komórki zróżnicowane zawierają (na ogół) pełen zestaw informacji genetycznej	281
10.1.2. W niektórych tylko przypadkach różnicowanie jest związane z ilościowymi zmianami materiału genetycznego	283
10.1.3. Wzorec ekspresji genów zmienia się w czasie rozwoju i jest specyficzny tkankowo	284
10.1.4. Stan aktywności chromatyny przenosi się na komórki potomne i jest jednym z elementów pamięci komórkowej	284
10.1.5. Determinację rozwojową blastomerów wyznacza polarność składników jaja oraz (lub) oddziaływania międzykomórkowe	285
10.1.6. Rozwój ssaków wymaga obecności genomu przekazanego przez matkę i ojca	286
10.1.7. Ujawnienie się niektórych chorób człowieka może być wywołane imprintingiem genomu rodzicielskiego	290
10.2. Genetyczna kontrola morfogenezy	290
10.2.1. Losy linii komórkowych u nicienia <i>Caenorhabditis elegans</i> są wyznaczone przez geny kontrolujące rozwój	291
10.2.2. Geny kierujące rozwojem <i>Drosophila</i>	293
10.2.3. Ukształtowaniem postaci <i>Drosophila</i> wzdłuż osi przednio-tylnej zawiąduje hierarchiczny układ genów regulatorowych	294
10.2.4. Geny polarności jaja wyznaczają przedni i tylny biegun zarodka	296
10.2.5. Geny segmentacji wyznaczają granice 14 parasegmentów	296
10.2.6. Geny homeotypiczne kompleksu <i>Antennapedia</i> i <i>bithorax</i> decydują o zróżnicowaniu parasegmentów na głowowe, tułowiowe i odwłokowe	299
10.2.7. Wiele genów kierujących rozwojem zawiera sekwencję, zwaną homeoboksem, kodującą białko o charakterze czynnika transkrypcyjnego	301
10.2.8. Sekwencja homeoboksu występuje w genach kierujących rozwojem u zwierząt bezkręgowych i kręgowców	303
10.2.9. Sekwencje homeoboksu tworzą konserwatywną ewolucyjnie rodzinę	306
10.3. Kontrola genetyczna determinacji płci u zwierząt	307
10.4. Determinacja płci u <i>D. melanogaster</i>	308
10.4.1. Płeć u <i>Drosophila</i> jest zdeterminowana stosunkiem liczby chromosomów X do liczby autosomów	309
10.4.2. Mechanizm kompensacyjny podwyższa aktywność chromosomu X u samic <i>Drosophila</i> do poziomu odpowiadającego dwu chromosomom X u samic	310
10.4.3. Aktywny stan nadrzędnego genu <i>Sxl</i> uruchamia kaskadę genów regulatorowych, prowadzących rozwój w kierunku żeńskim	311
10.4.4. O płci somatycznej <i>Drosophila</i> decyduje różny sposób obróbki transkryptów genów regulatorowych	312
10.4.5. Na determinację płciową komórek rozrodczych wpływa aktywność genu <i>Sxl</i> oraz środowisko komórek somatycznych	313

10.5. Determinacja płci u ssaków	313
10.5.1. Mechanizm kompensacyjny u samic ssaków polega na inaktywacji jednego z dwu chromosomów X	313
10.5.2. Płeć męską ssaków determinuje obecność chromosomu Y w komórkach somatycznych gonady	315
10.5.3. Jak poszukiwano genu determinującego płeć męską u ssaków	316
10.5.4. Na determinację płci ssaków wpływają także geny położone w innych chromosomach	320
11. Molekularne podstawy procesów odpornościowych • Barbara Lipińska	322
11.1. Antygeny wywołują odpowiedź immunologiczną humoralną i komórkową	323
11.2. Przeciwciała wiążą się z determinantami antygenowymi	324
11.3. Przeciwciała dzielą się na klasy pełniące różne funkcje	326
11.4. Przeciwciała są wytwarzane przez limfocyty B	328
11.5. Odpowiednie przeciwciała produkowane są dzięki selekcji określonych klonów limfocytów B	329
11.6. System odpornościowy ma pamięć immunologiczną	332
11.7. Limfocyty T są podstawą odpowiedzi komórkowej i niezbędnym elementem odpowiedzi humoralnej	333
11.8. Makrofagi są ważnymi komórkami wspomagającymi odpowiedź immunologiczną	334
11.9. Komórki układu immunologicznego krążą po całym organizmie	335
11.10. Przeciwciała mają wspólny plan budowy, lecz są bardzo różnorodne	336
11.11. Umiemy wytwarzać przeciwciała monoklonalne	342
11.12. Są dwa zasadnicze mechanizmy prowadzące do różnorodności przeciwciał	344
11.13. Geny immunoglobulin ulegają somatycznej rekombinacji	344
11.14. Regulacja transkrypcji genów immunoglobulin	354
11.15. Limfocyty T mają receptory TCR	355
11.16. Receptory komórek T wiążą antygeny prezentowane na powierzchni komórek	360
11.17. Białka MHC uczestniczą w odrzucaniu przeszczepów	364
11.18. Białka MHC uczestniczą w stymulacji syntezy immunoglobulin	365
11.19. Białka MHC są polimorficzne i należą do superrodziny immunoglobulin	366
11.20. Geny MHC mają bardzo wiele alleli	369
11.21. Edukacja grasicowa uczy komórki T reagować z obcymi białkami i tolerować własne	370
11.22. Odpowiedź immunologiczna zależna od antygeny	372
11.23. Antygeny stymulujące syntezę przeciwciał niezależnie od komórek T	376
11.24. Zaktywowana komórka B wydziela przeciwciała	376
11.25. Zaktywowany limfocyt B wytwarza wtórne przeciwciała	379
11.26. Geny immunoglobulin ulegają somatycznym mutacjom	380
11.27. Tolerancja komórek B wobec własnych antygenów organizmu	381
11.28. Wirus HIV wywołuje AIDS	382
12. Udział genów w procesie nowotworzenia • Mieczysław Choraży, Stanisław Szala	385
12.1. Komórki nowotworowe różnią się od komórek prawidłowych wieloma cechami biologicznymi	385
12.2. Proces nowotworowy rozwija się w ciągu długiego czasu i jest procesem wieloetapowym obejmującym fazę inicjacji, promocji i progresji	386
12.3. W fazie progresji postępuje proces utraty kontroli nad podziałami komórek nowotworowych	387
12.4. Nowotwory złośliwe u człowieka są skutkiem działania wielu czynników etiologicznych	388

12.5. Immortalizacja komórek jest pierwszym zdarzeniem w procesie nowotworzenia <i>in vitro</i> , ale nie jest jednoznaczna z transformacją nowotworową	389
12.6. Nowotwory u ludzi mogą się rozwijać na tle wrodzonych predyspozycji, ale stanowią one mały odsetek wszystkich nowotworów	390
12.7. Molekularnym podłożem procesu nowotworowego są mutacje genetyczne komórek samiatycznych	391
12.8. Wirusy onkogenne typu RNA należące do grupy retrowirusów	392
12.9. Wirusy typu RNA przechodzą złożony cykl życiowy w zainfekowanej komórce	392
12.10. Retrowirusy o ostrym działaniu onkogennym zawierają gen transformujący (onkogen wirusowy <i>v-onc</i>)	394
12.11. Ostre wirusy onkogenne są zwykle niezdolne do replikacji wskutek utraty części genomu i wymagają obecności wirusów wspomagających	394
12.12. Występujące w ostrych retrowirusach geny transformujące (geny <i>v-onc</i>) pochodzą z komórek eukariotycznych	395
12.13. Komórkowe protoonkogeny są przekształcane w onkogeny w wyniku różnych mutacji	396
12.14. Białka kodowane przez protoonkogeny spełniają kluczowe funkcje biologiczne w komórce	396
12.15. Niektóre protoonkogeny kodują białka spełniające funkcję receptorów i mające swoistą aktywność fosfokinaz	398
12.16. Protoonkogeny z rodziny <i>ras</i> kodują białko o aktywności GTPazy	399
12.17. Niektóre czynniki transkrypcyjne są produktami protoonkogenów	399
12.18. Produkty białkowe protoonkogenów biorą udział w transmisji sygnału do komórki	400
12.19. Wzrost i różnicowanie komórek są w stanie wzajemnej równowagi	402
12.20. Geny supresorowe transformacji nowotworowej	403
12.21. W następstwie pre- lub postzygotycznej mutacji genu supresorowego <i>Rb</i> rozwija się siatkówczak (retinoblastoma) oka	404
12.22. Mutacje genu supresorowego <i>p53</i> towarzyszą wielu typom nowotworów złośliwych	405
12.23. Ostatnio wykryto nowe geny supresorowe mające udział w procesie nowotworowym	406
12.24. W procesie nowotworzenia biorą udział nie tylko onkogeny i geny supresorowe	407
12.25. Niektóre geny biorą udział w progresji procesu nowotworowego i przerzutowaniu	408
12.26. Procesowi postępującego złośliwienia komórek towarzyszy postępująca destabilizacja genomu	409
12.27. Mechanizmy selekcji i adaptacji prowadzą do rozwoju klonów komórek nowotworowych o dużej autonomii wzrostu	410
13. Molekularne podstawy ewolucji • Piotr Stępień	412
13.1. Życie na Ziemi mogło powstać ok. 3 mld lat temu	413
13.2. Życie powstało dzięki katalitycznym właściwościom replikujących się cząsteczek RNA	414
13.3. Białka okazały się lepszymi katalizatorami niż RNA	417
13.4. Kod genetyczny jest na ogół identyczny w całym świecie ożywionym	418
13.5. Progenota: praprzodek organizmów żywych miał genom złożony z DNA	419
13.6. Historia ewolucji jest zapisana w sekwencji nukleotydowej genów	420
13.7. Mitochondria i chloroplasty są pochodzenia endosymbiotycznego	423
13.8. Białka o nowych funkcjach powstały dzięki duplikacjom genów lub dzięki tasowaniu egzonów	426

13.9. Ewolucji życia na Ziemi wystarczyło niewiele egzonów	428
13.10. Czy introny pojawiły się wcześniej czy późno w ewolucji?	429
13.11. Geny należące do rodzin wielogenowych ewoluują razem	430
13.12. Część DNA w genomach nie ulega ekspresji	432
13.13. Geny powstające przez odwrotną transkrypcję mogą pełnić ważną rolę w ewolu- cji	433
13.14. Genomy mogą być kolonizowane przez pasożytniczy, samolubny DNA	434
13.15. Czy rzeczywiście pochodzimy od jednej pramatki Ewy?	435
13.16. Czy symbioza i horyzontalny transfer genów mogą być motorem ewolucji?	436
13.17. Podsumowanie	436
14. Nowy wspaniały świat biotechnologii • Magdalena Fikus	438
14.1. Wprowadzenie do zagadnień współczesnej biotechnologii	438
14.1.1. Zakres stosowania technik rekombinacji DNA <i>in vitro</i> w projektach biotechnologicznych. Sprzężenie nauki z techniką	438
14.1.2. Czynniki warunkujące sukces projektu biotechnologicznego	439
14.1.3. Rozwój firm biotechnologicznych	440
14.1.4. Wybór organizmów gospodarzy do klonowania genów	442
14.2. Biotechnologia w przemyśle farmaceutycznym i w medycynie	444
14.2.1. Kierunki rozwoju biotechnologii medycznej	444
14.2.2. Profilaktyka i diagnostyka	444
14.2.2.1. Szczepionki	444
14.2.2.2. Testy diagnostyczne	448
14.2.3. Somatyczna terapia genowa	450
14.2.4. Nowe leki	453
14.3. Organizmy transgeniczne	456
14.3.1. Transgeniczne rośliny	457
14.3.1.1. Plazmidy <i>Agrobacterium</i> jako wektory DNA dla roślin dwuliściennych	457
14.3.1.2. Bezwektorowa transfekcja roślin i komórek roślinnych	460
14.3.1.3. Celowość konstrukcji roślin transgenicznych	462
14.3.1.4. Perspektywy zastosowań transgenicznych roślin	464
14.3.2. Transgeniczne zwierzęta	465
14.3.2.1. Transgeniczne myszy jako model modyfikacji genotypu do celów bio- technologicznych	466
14.3.2.2. Transgenizacja zwierząt hodowlanych	468
14.4. Metody rekombinacji DNA <i>in vitro</i> zastosowane do produkcji związków chemi- cznych	470
14.5. Postęp nauki i techniki w rozwoju biotechnologii	471
14.6. Bezpieczeństwo biotechnologii dla ekosfery i człowieka	472
Skorowidz	475

1. PODSTAWOWE KONCEPCJE GENETYCZNE I WYBRANE METODY ANALIZY GENETYCZNEJ

Fascynacja współczesnymi technikami genetyki molekularnej i łatwość, z jaką możemy dziś wnikać w strukturę i mechanizm działania genów, nie powinny prowadzić do lekceważenia metod klasycznej analizy genetycznej. Większość podstawowych koncepcji genetycznych powstała, jeśli jeszcze nie przed odkryciem roli DNA w dziedziczeniu, to w każdym razie przed wprowadzeniem w użycie technik inżynierii genetycznej. Co więcej, rozwiązywanie wielu problemów z dziedziny genetyki molekularnej jest z reguły poprzedzone (a często nawet zależne) od uzyskania wielu informacji dotyczących lokalizacji badanych genów, ich współdziałania z innymi genami itp. Informację tę w wielu przypadkach można uzyskać dużo szybciej (i taniej) stosując klasyczne metody genetyczne niż nawet najbardziej wyrafinowane metody genetyki molekularnej.

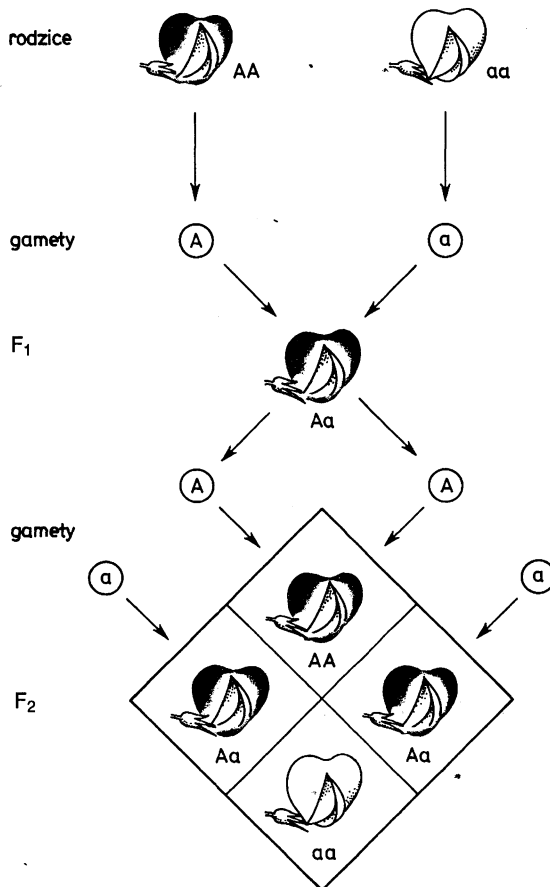
Rozdział ten zawiera krótkie omówienie podstawowych koncepcji genetyki klasycznej oraz metod analizy genetycznej wyższych organizmów, bakterii i wirusów. Przedstawione w nim również będą podstawowe zasady działania genów, które znacznie dokładniej zostaną omówione w dalszych rozdziałach.

1.1. Dziedziczenie ma charakter jednostkowy

Podobieństwo potomstwa do rodziców jest zjawiskiem oczywistym, obserwowanym od niepamiętnych czasów. Przy czym nie chodzi tu jedynie o podobieństwo niektórych cech, jak kształt nosa czy kolor oczu, ale o podobieństwo wszystkich zasadniczych cech gatunku: potomek człowieka jest człowiekiem, potomek kota jest kotem itd. Poznanie zjawiska dziedziczenia było kluczem do zrozumienia podstawowych zasad powstawania i funkcjonowania żywych organizmów. Należało bowiem ustalić nie tylko w jaki sposób cechy organizmów są przekazywane z pokolenia na pokolenie, ale również naturę samych

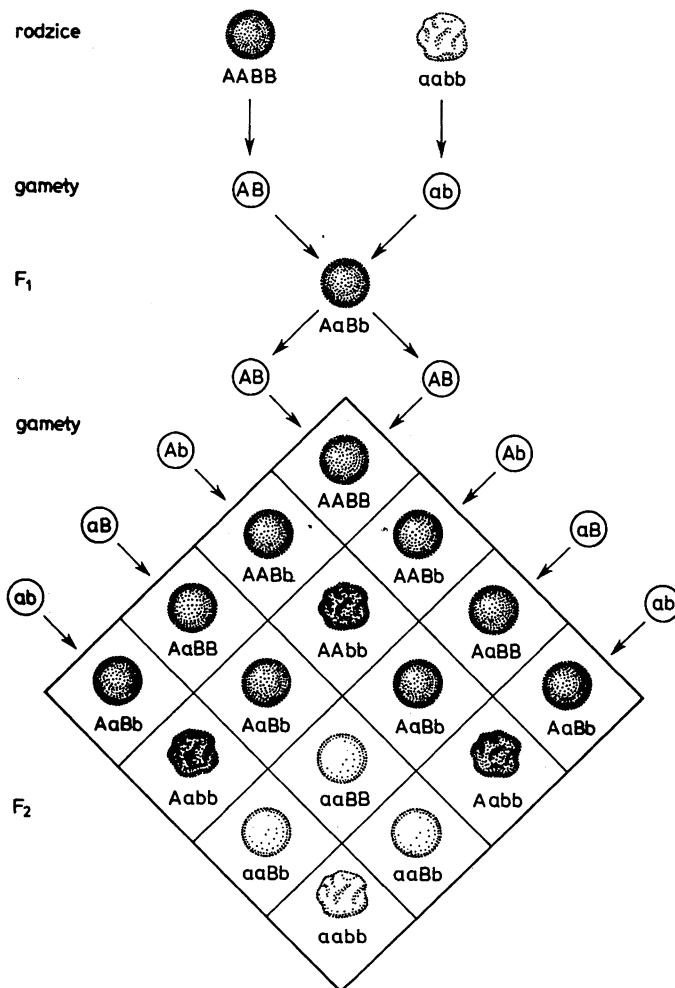
determinantów cech, sposób ich funkcjonowania, zakres i przyczyny ich zmienności. Pierwszy krok na drodze do poznania tych zagadnień postawił w roku 1865 Grzegorz Mendel, publikując rezultaty swoich doświadczeń nad dziedziczeniem wybranych cech grochu.

Mendel krzyżował ze sobą rośliny o łatwych do wyróżnienia cechach, takich jak barwa kwiatów, barwa czy kształt nasion, przy czym były to cechy utrzymujące się z pokolenia na pokolenie w przypadku krzyżowania wsobnego. Zaobserwował, że w potomstwie (F_1) krzyżówki osobników różniących się jedną cechą otrzymuje się osobniki jednakowe, wykazujące cechę jednego z rodziców. Cechę tę określa się jako dominującą, podczas gdy cechę nie ujawniającą się w pokoleniu F_1 określa się jako recesywną. W drugim pokoleniu (F_2), otrzymanym ze skrzyżowania osobników F_1 powstają osobniki dominujące i recesywne w stosunku 3 : 1 (rys. 1.1).



Rys. 1.1. Dziedziczenie jednej cechy. Skrzyżowano dwie rośliny homozygotyczne, jedną o kwiatach czerwonych (cecha dominująca) i drugą o kwiatach białych (cecha recesywna). Wszystkie osobniki potomne (F_1) są heterozygotami o kwiatach czerwonych. Po skrzyżowaniu ze sobą osobników F_1 otrzymujemy pokolenie F_2 , w którym występują osobniki o kwiatach czerwonych i białych w proporcji 3 : 1

W przypadku krzyżowania osobników różniących się dwoma cechami Mendel obserwował jednolite pod względem obu cech pokolenie F_1 i pojawienie się w pokoleniu F_2 osobników o obu cechach dominujących, jednej lub



Rys. 1.2. Dziedziczenie dwóch cech. Skrzyżowano rośliny o nasionach żółtych i gładkich (cechy dominujące) z roślinami o nasionach zielonych i pomarszczonych (cechy recesywne). Otrzymano jednolite fenotypowo pokolenie F_1 , w którym wszystkie osobniki są podwójnymi heterozygotami. Po skrzyżowaniu osobników F_1 ze sobą otrzymujemy pokolenie F_2 , w którym występują cztery klasy fenotypowe w stosunku 9:3:3:1. Wynik taki wskazuje na niezależne dziedziczenie się dwóch par alleli

drugiej cesze dominującej i obu cechach recesywnych w proporcji, jak 9:3:3:1 (rys. 1.2).

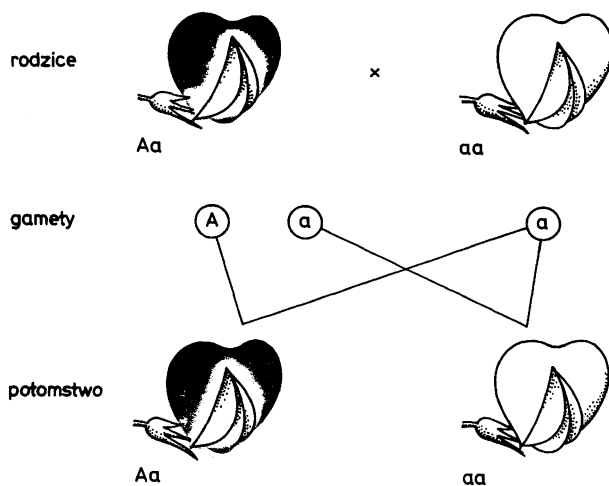
Obserwowaną w tych krzyżówkach segregację cech Mendel interpretował następująco:

1) Cechy zależne są od „zawiązków dziedziczności” (które obecnie nazywamy genami).

2) Każda cecha jest determinowana przez dwa geny. Geny determinujące jedną cechę określamy obecnie terminem „allele”.



5248



Rys. 1.3. Jednopunktowa krzyżówka wsteczna (testowa). Osobnika heterozygotycznego skrzyżowano z osobnikiem homozygotycznym recesywnym. W potomstwie otrzymuje się osobniki o cechach dominujących i recesywnych w proporcji 1 : 1

3) Gamety zawierają tylko jeden allel z danej pary, przy czym segregacja alleli do gamet odbywa się losowo, a zatem częstości gamet z jednym i drugim allelem są sobie równe.

4) Geny warunkujące różne cechy segregują niezależnie od siebie i jest kwestią przypadku, który allel z pary warunkującej jedną cechę znajdzie się w gamecie z jednym bądź drugim allelem z pary alleli warunkującej drugą cechę.

Z wymienionych punktów, punkt 2) i 4) znane są jako I i II prawa Mendla, tzw. prawo czystości gamet i prawo niezależnej segregacji cech.

Osobniki mające dwa identyczne allele genu warunkującego daną cechę określa się jako homozygoty, a osobniki mające dwa różne allele — jako heterozygoty. W krzyżówkach Mendla osobniki pokolenia rodzicielskiego były homozygotami, a osobniki pokolenia F_1 — heterozygotami. O heterozygotyczności tych osobników można się najłatwiej przekonać wykonując krzyżówkę wsteczną, polegającą na skrzyżowaniu ich z recesywną formą rodzicielską. W potomstwie takiej krzyżówki otrzymamy heterozygoty i homozygoty w stosunku 1 : 1 (rys. 1.3).

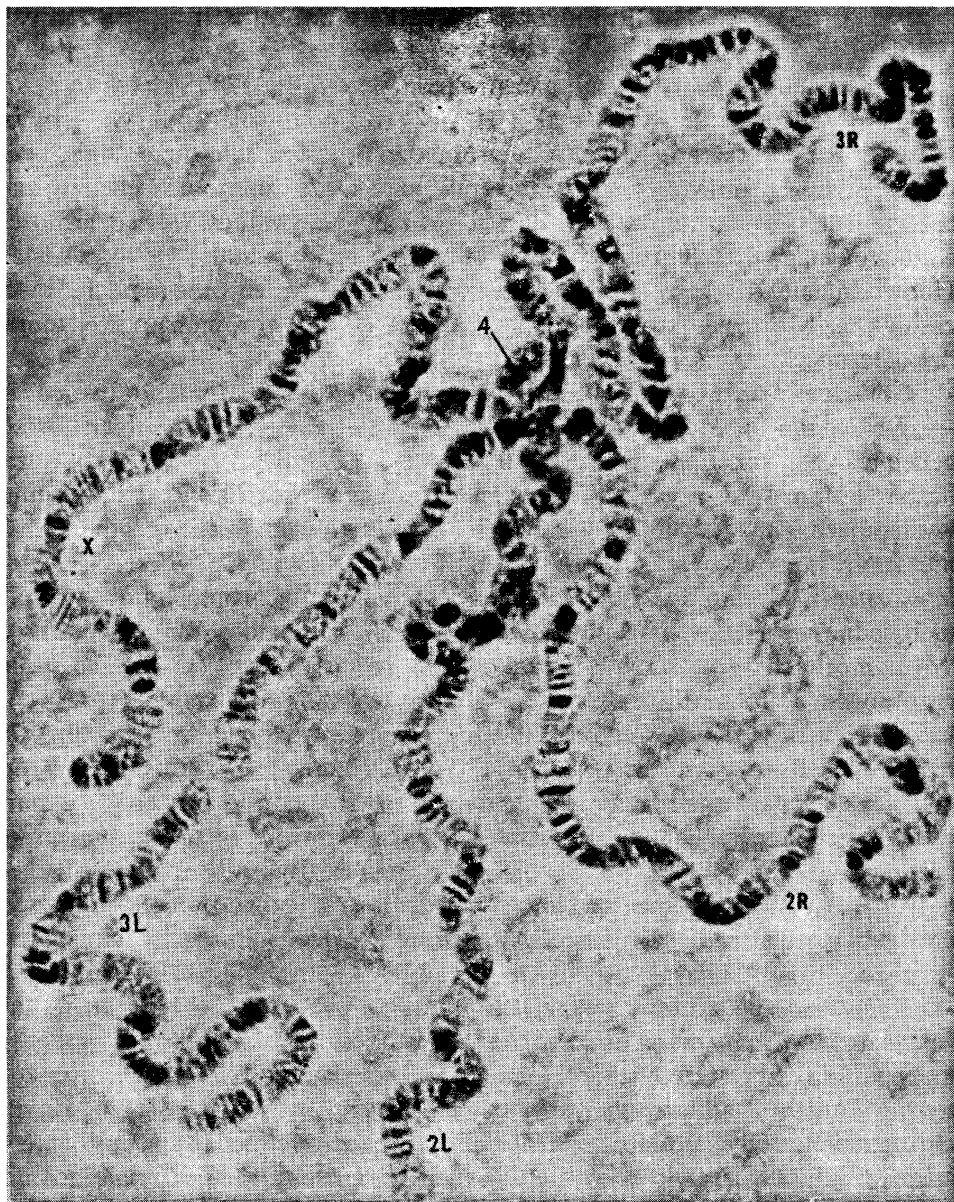
Głównym osiągnięciem Mendla było wykazanie istnienia jednostek („związków”) dziedziczności, które zgodnie z określonymi regułami są przekazywane za pośrednictwem gamet z pokolenia na pokolenie. Odkrycie to stworzyło racjonalne podstawy genetyce, nauce o dziedziczności.

1.2. Geny mieszczą się w chromosomach

Prace Mendla pozostawały niezauważone do roku 1900, kiedy to trzech uczeni E. Correns, W. Tschermak i H. de Vries ponownie „odkryli” prawa Mendla. Z początkiem wieku XX nagromadzono już na tyle dużo danych na temat przebiegu mejozy i powstawania gamet, że zbieżność między zachowaniem się postulowanych przez Mendla czynników dziedziczności a zachowaniem się chromosomów w czasie mejozy stała się oczywista. Udowodnienie, że geny rzeczywiście mieszczą się w chromosomach, było zasługą T. Morgana, który uznawany jest za twórcę chromosomowej teorii dziedziczności.

Obiektem prac Morgana i jego współpracowników była muszka owocowa — *Drosophila melanogaster*. Miała ona liczne zalety, jako obiekt prac genetycznych, takie jak: krótki (10 dni) cykl życiowy, stosunkowo duża liczba potomstwa uzyskiwanego z jednej pary osobników i naturalnie występująca zmienność dziedziczna, co było w owym czasie istotne, gdyż nie znane jeszcze były sposoby indukowania mutacji. Co więcej, *D. melanogaster* ma tylko cztery, łatwo wyróżnialne pary chromosomów (wśród nich jedną parę, tzw. chromosomów płci: XX u samic i XY u samców). W komórkach gruczołów śliniankowych występują u *D. melanogaster* chromosomy politeniczne, zwane chromosomami olbrzymimi (rys. 1.4), które powstają przez wielokrotne podziały chromatyd, po których nie następuje ich rozejście się. Obecność tych chromosomów umożliwia u *D. melanogaster* łatwe śledzenie, za pomocą mikroskopu optycznego, zmian w strukturze chromosomów. Właściwości te spowodowały, że *D. melanogaster* przez długie lata pozostawała obiektem numer jeden w badaniach genetycznych, a i obecnie wykorzystywana jest z powodzeniem do prac nad genetyczną regulacją procesów rozwoju i różnicowania się organizmów (p. rozdz. 10).

Krzyżując między sobą rozmaite mutanty *D. melanogaster* Morgan wykazał, że niektóre geny nie są przekazywane niezależnie od siebie, a więc segregują niezgodnie z II prawem Mendla. Geny takie określamy nazwą genów sprzężonych. Morgan ustalił, że geny sprzężone to geny mieszczące się w jednym chromosomie. Okazało się, że u *D. melanogaster* występują 4 grupy genów sprzężonych, a więc tyle ile występuje par chromosomów. Geny należące do jednej z tych grup wykazywały szczególny charakter dziedziczenia, polegający na tym, że u samców ujawniały się cechy warunkowane przez geny recesywne przekazywane przez matkę. Morgan prawidłowo zinterpretował ten fakt, zakładając że są to geny mieszczące się w chromosomie X i że chromosom Y jest genetycznie „pusty”. Morgan, badając dziedziczenie się cech u osobników charakteryzujących się anomaliami chromosomowymi (np. mających połączone ze sobą chromosomy X) wykazał, że sposób przekazywania określonych genów w krzyżówkach takich osobników jest zgodny ze sposobem przekazywania chromosomów. Później udało się skorelować wiele aberracji

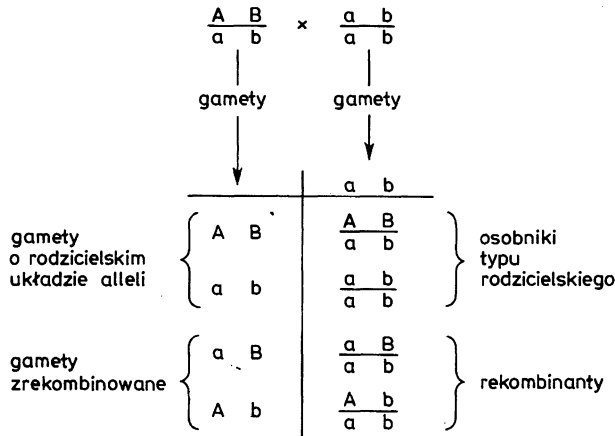


Rys. 1.4. Chromosomy olbrzymie (politeniczne) *D. melanogaster* (wg B.P. Kaufmana, *Intern. Rev. Cyt.*, 9, 77, 1960)

chromosomowych (widocznych przy obserwacji chromosomów olbrzymich), polegających na wypadnięciu (delecji) lub przemieszczeniu (translokacji) fragmentów chromosomów z wystąpieniem określonych mutacji, co pozwoliło na przypisanie poszczególnych genów nie tylko do chromosomów płci, lecz również do autosomów.

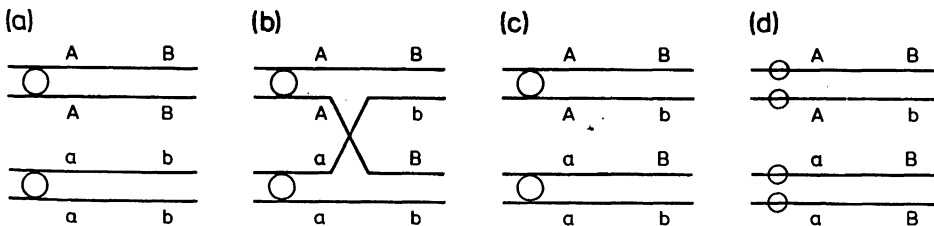
1.3. Geny zajmują stałe miejsca w chromosomach i mogą rekombinować

To, że dwa geny znajdują się w jednym chromosomie nie oznacza, że zawsze przekazywane są razem. W krzyżówkach testowych (krzyżówka heterozygoty z homozygotą recesywną) obserwuje się pojawianie się rekombinantów, czyli osobników mających inny niż rodzicielski układ alleli w chromosomach (rys.1.5). Morgan zaobserwował, że częstość, z jaką pojawiają się rekombinan-



Rys. 1.5. Krzyżówka testowa za pomocą której ustala się sprzężenie dwóch genów. Genotypy rodziców i potomstwa zapisano w formie ułamków, co lepiej uwidacznia, które allele znajdowały się w jednym, a które w dwóch różnych chromosomach. Osobniki heterozygotyczne wytwarzają cztery rodzaje gamet. Procent gamet zrekombinowanych jest tym mniejszy im bliżej na chromosomie znajdują się loci badanych genów. Gamety zrekombinowane powstają w wyniku crossing-over (p. rys. 1.6)

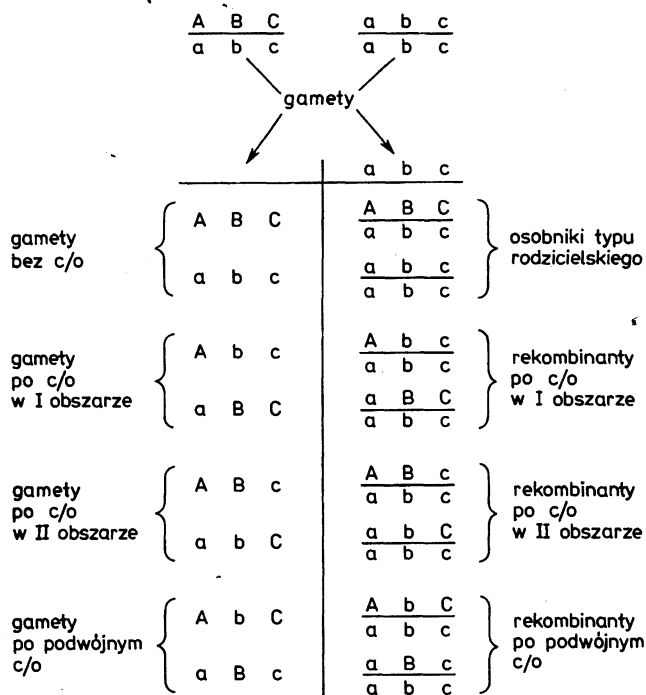
ty, jest stała dla danej pary genów, co wskazywało, że geny zajmują na chromosomie określone, stałe miejsca (loci). Pojawianie się rekombinantów jest wynikiem pęknięcia chromatyd chromosomów homologicznych i ich ponownego



Rys. 1.6. Uproszczony schemat crossing-over. W profazie I podziału mejozytycznego chromosomy homologiczne (każdy złożony z dwóch chromatyd) układają się obok siebie (a). Może dojść do pęknięcia i połączenia „na krzyż” chromatyd należących do dwóch różnych chromosomów (b). W I podziale chromosomy rozchodzą się (c) a w II podziale pękają centromery i rozchodzą się chromatyd (d), każda z nich trafia do innej gamety

łączenia się w nowym układzie (rys. 1.6). Proces ten określamy nazwą crossing-over. Morgan założył również, że częstość crossing-over jest funkcją odległości pomiędzy loci genów na chromosomie: im dalej od siebie są położone, tym większa szansa na zajście crossing-over pomiędzy nimi.

Słuszność założeń Morgana została potwierdzona w całej rozciągłości. Dla wszystkich organizmów, będących przedmiotem intensywnych prac genetycznych, oraz dla wielu organizmów ważnych z punktu widzenia użytkowego, sporządzono dokładne mapy genetyczne poszczególnych chromosomów. Mapy te obrazują kolejność ułożenia genów na chromosomie oraz odległości między genami wyrażone w jednostkach rekombinacji (procentach crossing-over). W celu sporządzenia takiej mapy wykonuje się serie krzyżówek testowych (o mapowaniu genów u bakterii będzie mowa dalej), zwykle krzyżówek trzy- lub więcej punktowych, tzn. takich, w których bada się jednocześnie segregację trzech lub więcej genów. Przykładowa analiza krzyżówki trzypunktowej jest podana na rysunku 1.7.



Rys. 1.7. Krzyżówka testowa trzypunktowa. W wyniku krzyżówki powstaje 8 klas potomstwa, wszystkie rozróżnialne na podstawie fenotypów. O ile wszystkie trzy geny są sprzężone, to klasy rekombinantów będą mniej liczne niż klasy typu rodzicielskiego. Najmniej liczne będą klasy powstałe w wyniku podwójnego crossing-over (c/o), gdyż prawdopodobieństwo zajścia podwójnego c/o równa się iloczynowi prawdopodobieństw zajścia pojedynczych c/o. Ponieważ w wyniku podwójnego c/o jedynie gen środkowy zmienia swoją pozycję względem pozostałych genów, to liczebność klas daje nam informację nie tylko o odległościach pomiędzy genami, ale również o ich wzajemnym położeniu na chromosomie. Odległości między genami wyrażane są w jednostkach rekombinacji, przy czym jedna jednostka odpowiada jednemu procentowi rekombinacji

Mechanizm molekularny procesu crossing-over nie był oczywiście znany w czasach Morgana. Dowodem cytologicznym na występowanie tego procesu było występowanie połączeń między chromatydami (chiasm) obserwowane w profazie podziałów mejotycznych. Molekularna strona procesu rekombinacji zostanie omówiona w rozdziale 9. Tam też zajmiemy się wyjątkami od reguł nakreślonych przez Morgana, związanych z występowaniem ruchomych elementów genetycznych, których obecność zmusza nas do modyfikacji poglądów na temat stałości miejsc zajmowanych przez geny w chromosomach.

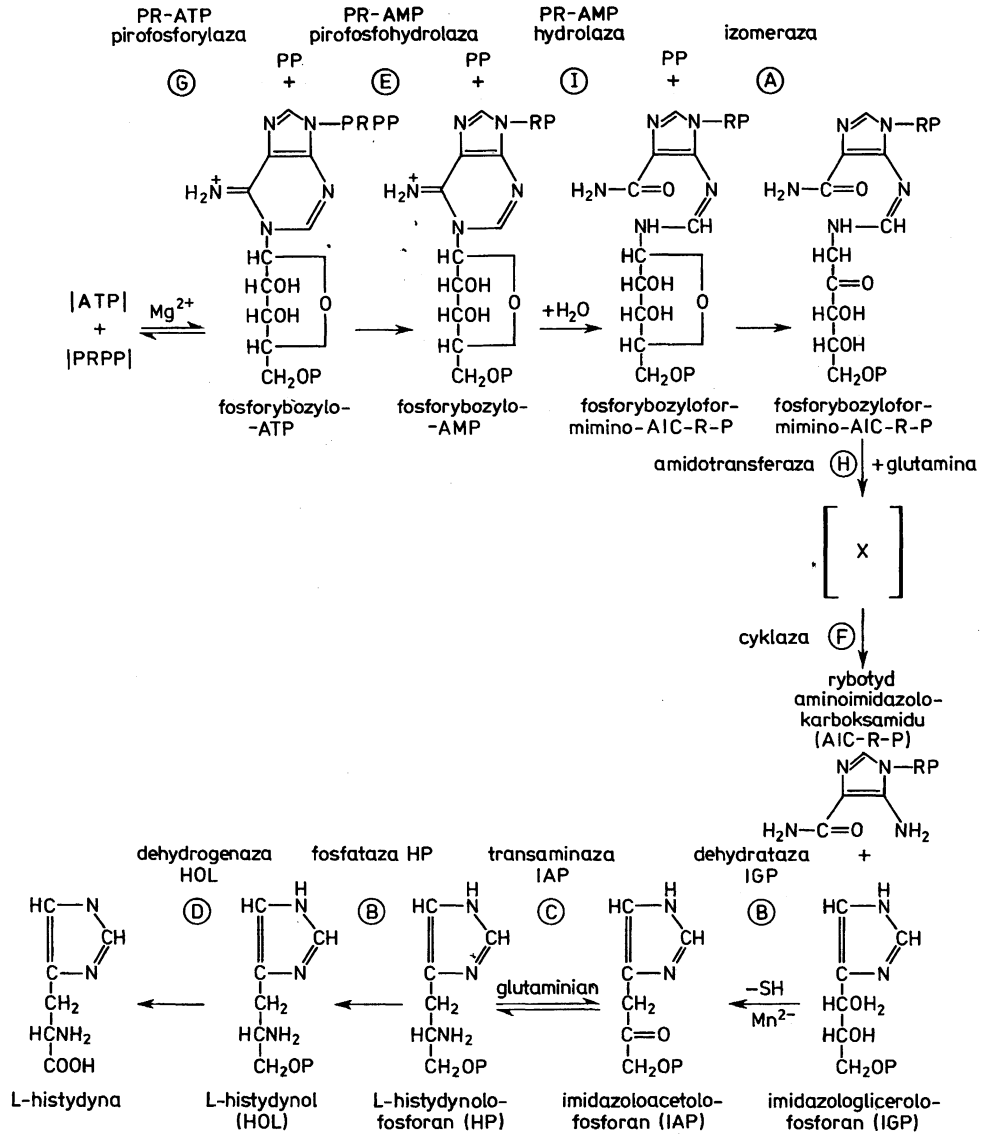
1.4. Materiałem genetycznym jest DNA

Kluczowym momentem dla rozwoju genetyki i całej biologii było odkrycie, że materiałem genetycznym jest kwas deoksyrybonukleinowy (DNA). Doświadczenia, które doprowadziły do tego stwierdzenia mają obecnie wartość jedynie historyczną i nie będą tutaj szczegółowo omawiane. Przypomnimy tylko, że w roku 1928 F. Griffith wykonał doświadczenie nad transformacją bakterii, wykazując, że jakiś czynnik z zabitych bakterii może zostać przekazany bakteriom żywym, w wyniku czego te ostatnie mogą być genetycznie zmodyfikowane, nabywając niektóre cechy bakterii zabitych. W roku 1944 O. T. Avery, C. M. MacLeod i M. MacCarty ustalili, że związkem chemicznym odpowiedzialnym za przekazywanie cech u bakterii w wyniku transformacji jest DNA. Wykonane przez nich doświadczenie polegało na transformowaniu bakterii poszczególnymi frakcjami uzyskanymi z bakterii zabitych i wykazaniu, że jedynie frakcja zawierająca DNA może zmienić genetyczne właściwości transformowanych komórek. Inne klasyczne doświadczenie ukazujące rolę DNA w dziedziczeniu zostało wykonane przez A. D. Hershey'a i M. Chase w roku 1952. Wykazali oni, że w czasie infekcji komórki bakteryjnej przez bakteriofagi (wirusy bakteryjne) do wnętrza komórki wnika jedynie DNA, natomiast płaszcz białkowy bakteriofaga pozostaje na zewnątrz. Doświadczenie to polegało na wyznakowaniu bakteriofagowych DNA i białek odpowiednio za pomocą fosforu ^{32}P i siarki ^{35}S oraz prześledzeniu losów radioaktywnego piętna po infekcji. Doświadczenie to wykazało, że cała informacja niezbędna do odtworzenia się bakteriofaga w komórce i przejścia przez niego pełnego cyklu życiowego jest zawarta w DNA.

W roku 1953 J. D. Watson i F. Crick zaproponowali model struktury DNA i wynikający z niego sposób replikacji cząsteczek tego związku (p. rozdz. 3). Zdolność do wytwarzania w procesie replikacji kopii cząsteczek DNA jest jedną z dwóch podstawowych właściwości, jakie musi spełniać związek chemiczny będący nośnikiem informacji genetycznej. Drugą właściwością tego związku musi być zdolność do kierowania syntezą i wyznaczenia pierwszorzędowej struktury białek, od których zależą wszelkie właściwości żywego organizmu.

1.5. Geny odpowiadają za syntezę białek

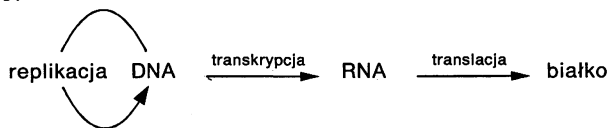
W latach 40. wprowadzono do badań genetycznych tzw. mutanty pokarmowe (inaczej: aukstotroficzne). Są to mutanty, które w wyniku uszkodzenia określonego genu utraciły zdolność do syntezy jakiegoś związku chemicznego (np. aminokwasu). Mutanty takie można łatwo otrzymać u mikroorganizmów, takich jak bakterie lub grzyby, których hodowle prowadzi się na prostych,



Rys. 1.8. Droga biosyntezy histydyny u *Salmonella typhimurium*. Literami oznaczono geny odpowiedzialne za syntezę poszczególnych enzymów

niezdefiniowanych pożywkach. Mutanty te można utrzymać przy życiu dodając do pożywki składnik, którego nie potrafią wytwarzać. Analiza mutantów pokarmowych pozwala na znacznie łatwiejsze, niż w przypadku mutantów morfologicznych, zademonstrowanie zależności między genem, białkiem a cechą organizmu. Można bowiem ustalić, że fenotyp mutant (wymaganie jakiegoś składnika wzrostowego lub niezdolność do wykorzystywania jakiegoś składnika do wzrostu) wynika bezpośrednio z braku lub niefunkcyjności określonego enzymu. Przykład zależności między genami a enzymami konkretnego szlaku metabolicznego jest przedstawiony na rysunku 1.8.

W latach 50. pogląd, że geny są odcinkami DNA determinującymi pierwszorzędową strukturę białek, zaczął zyskiwać mocne poparcie eksperymentalne. Prace V. M. Ingrama na hemoglobinach wykazały, że mutacje wywołujące tzw. anemię sierpowatą powodują zamianę określonych aminokwasów w łańcuchu β -globiny. Dane tego typu uzyskano później dla dziesiątków innych genów i białek. Poznanie przebiegu biosyntezy białek, a w szczególności roli mRNA w tym procesie, doprowadziło do sformułowania tzw. centralnego dogmatu genetycznego, mówiącego że przepływ informacji genetycznej odbywa się następująco:



Dogmat ten obowiązuje do dziś, aczkolwiek należy pamiętać o kilku uzupełnieniach i uściśleniach. Po pierwsze, informacja genetyczna u wielu wirusów zawarta jest w RNA a nie w DNA. Po drugie, RNA może w niektórych przypadkach służyć jako matryca do syntezy DNA (p. rozdz. 4). Wreszcie, finalnym produktem wielu genów jest RNA (np. RNA rybosomalny i transferowy), nie podlegający translacji.

1.6. Rekombinacja może zachodzić również i wewnątrz genu

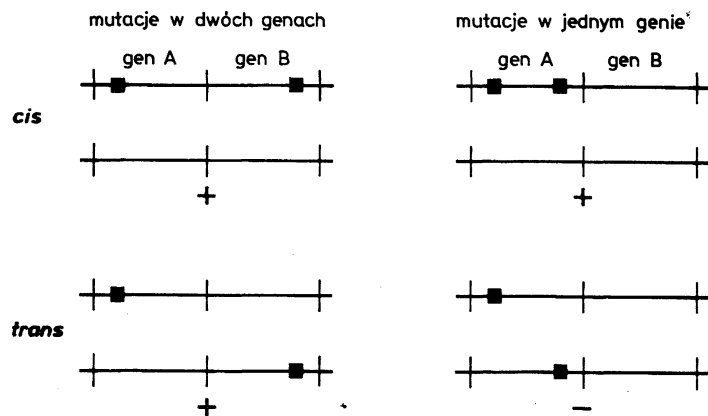
W początkowym okresie rozwoju genetyki klasycznej geny wyobrażano sobie jako koraliki na sznurku. Każdy z nich był w pewnym sensie jednostką mutacji, rekombinacji i funkcji. Wkrótce okazało się jednak, że dany gen może mutować na wiele różnych sposobów (mówiono wtedy o allelach wielokrotnych, których najbardziej znanym przykładem była seria alleli genu *w* u *Drosophila*, warunkujących różną barwę oka), a także, że rekombinacja może zachodzić w obrębie genu.

Obecnie, gdy wiemy że gen jest odcinkiem DNA złożonym z kilku tysięcy nukleotydów i że chromosom zawiera jedną, ciągłą nić DNA, jest to dla nas oczywiste. Mutacji może bowiem ulegać dowolny nukleotyd w obrębie genu, a rekombinacja może zachodzić na identycznej zasadzie zarówno wewnątrz

genów, jak i między nimi. Jeżeli skrzyżujemy ze sobą mutanty alleliczne, to możemy z pewną częstością (rzędu ułamków procenta) otrzymać rekombinanty typu dzikiego. Stanowią one połowę wszystkich rekombinantów, druga połowa to rekombinanty mające dany gen zmutowany w dwóch miejscach. Na podstawie częstości rekombinacji między poszczególnymi mutacjami w danym genie sporządza się mapy genetyczne genów, tak samo jak mapy genetyczne chromosomów.

1.7. Mutacje w różnych genach uzupełniają się (komplementują), a w jednym (na ogół) nie

Jeżeli mamy do czynienia z mutacjami mapującymi się na różnych chromosomach lub leżącymi daleko od siebie na jednym chromosomie, to nie ma wątpliwości, że są to mutacje różnych genów, nawet jeżeli efekty fenotypowe tych mutacji są takie same. Jeżeli natomiast dwa geny związane np. z syntezą jednego aminokwasu leżą obok siebie na chromosomie, to test rekombinacji nie pozwoli nam na ustalenie czy dane dwie mutacje zaszły w jednym czy też w dwóch różnych genach. Jednoznaczną (na ogół) odpowiedź otrzymamy natomiast stosując test na komplementację (inaczej: test na alleliczność). Test ten w przypadku organizmów diploidalnych polega na otrzymaniu osobnika heterozygotycznego, u którego występują jednocześnie oba zmutowane allele. Jeżeli mutacje dotyczą różnych genów (i są recesywne), to osobnik taki będzie miał dziki fenotyp, jeżeli obie mutacje zaszły w tym samym genie, to osobnik



Rys. 1.9. Test na alleliczność. Jeżeli mutacje zaszły w dwóch genach, to heterozygota niezależnie od tego czy mutacje znajdują się w układzie *cis* czy też *trans* będzie miała fenotyp nie zmutowany (dziki). Dziki fenotyp heterozygoty świadczy więc o komplementowaniu (wzajemnym uzupełnianiu się) dwóch mutacji, a zatem o nieallelizmie zmutowanych genów. Jeżeli mutacje zaszły w tym samym genie, to heterozygota mająca mutacje w układzie *cis* będzie miała fenotyp dziki (jeden allel genu A jest zmieniony w dwóch miejscach, a drugi jest nie zmutowany), podczas gdy heterozygota w układzie *trans* będzie mutantem (oba allele genu A zmutowane). Taki wynik testu świadczy o braku komplementacji

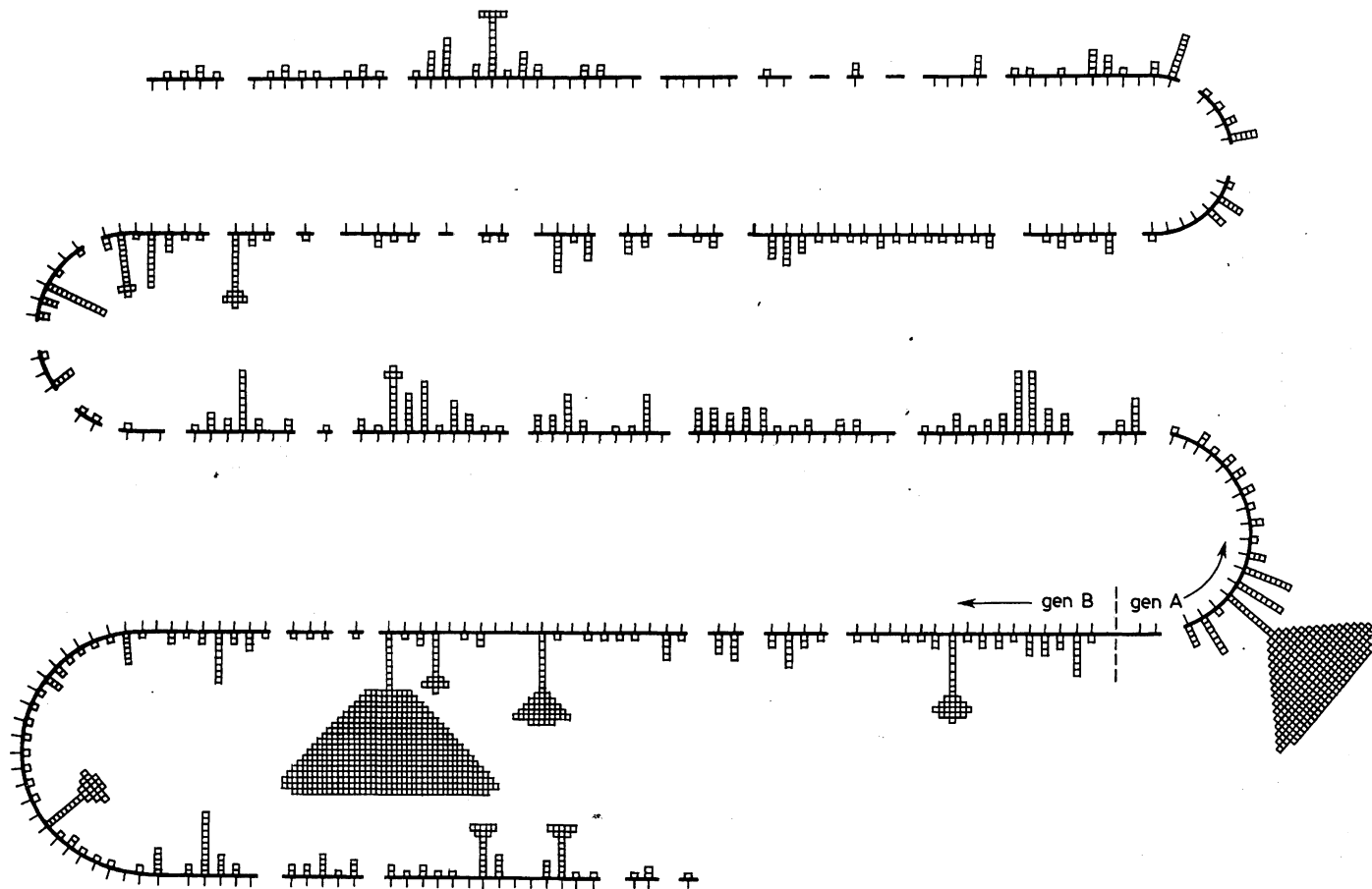
będzie miał fenotyp mutantu. W tej drugiej sytuacji nie występuje bowiem dziki allel zmutowanego genu, który mógłby wytwarzać funkcjonalne cząsteczki zakodowanego w nim białka. Obie omówione sytuacje są przedstawione schematycznie na rysunku 1.9.

Wykonanie testu na komplementację jest także możliwe w przypadku organizmów, u których dominuje faza haploidalna, pod warunkiem że można u nich uzyskać stabilne formy diploidalne (lub heterokariony). W przypadku bakterii test na komplementację można przeprowadzić w układzie, w którym jeden zmutowany allel znajduje się w chromosomie bakteryjnym, a drugi jest wprowadzony do komórki na plazmidzie lub za pośrednictwem bakteriofaga. W przypadku wirusów test na komplementację przeprowadza się infekując komórki jednocześnie dwoma zmutowanymi wirusami. Jeżeli mutacje dotyczą różnych, nieallelicznych genów, wirusy będą mogły przejść pełny cykl życiowy w zainfekowanej komórce.

Klasycznym przykładem badań nad rekombinacją i komplementacją wewnątrzgenową są prace S. Benzera nad mutantami *rII* u bakteriofaga *T4*. Mutanty *rII*, w przeciwieństwie do fagów typu dzikiego, nie są zdolne do namnażania się w komórkach szczepu K *Escherichia coli*, mogą natomiast namnażać się w szczepie B, dając łyśinki o innej morfologii niż łyśinki typu dzikiego. Benzer otrzymał kilka tysięcy mutantów *rII* i na podstawie wyników krzyżówek między nimi sporządził dokładną mapę genetyczną regionu fagowego chromosomu, w którym lokowały się mutacje *rII*. Łatwość, z jaką można wykrywać rekombinanty typu dzikiego (jedynie one mogą namnożyć się w szczepie K), umożliwiła mu badanie rekombinacji zachodzącej z częstością niższą nawet niż 0,001%. Mapę genetyczną całego obszaru przedstawiono na rysunku 1.10. Na mapie tej naniesiono pozycje wszystkich mutacji punktowych. Jak widać, wiele z nich nie rekombinowało między sobą, można było więc przyjąć, że w tych przypadkach mutacje zaszły dokładnie w tym samym miejscu cząsteczki DNA. Obszar *rII* liczy sobie 6 jednostek mapowych. Czy zawiera on jeden, czy też więcej genów? Odpowiedź na to pytanie można uzyskać wykonując test na komplementację, polegający na infekowaniu komórek szczepu K jednocześnie dwoma mutantami *rII*. Pojawienie się łyśinek typu dzikiego (ze znacznie większą częstością niż wynikałoby to z zajścia rekombinacji) dowodziłoby, że komplementacja zachodzi, a więc mamy do czynienia z mutacjami różnych genów.

Test na komplementację pozwolił na podzielenie mutantów *rII* na dwie grupy, A i B. Mutanty A nie komplementowały ze sobą a komplementowały z mutantami B, podobnie jak mutanty B, które nie komplementowały ze sobą a komplementowały z mutantami A. Mutanty A i B lokują się w dwóch różnych, sąsiadujących ze sobą, odcinkach obszaru *rII* (p. rys. 1.10). Mamy więc w tym przypadku do czynienia z dwoma odrębnymi genami.

Benzer wprowadził termin „cistron” jako synonim pojęcia genu rozumianego jako jednostka funkcji określonej na podstawie testów na komplementację między mutacjami w układzie *cis* i *trans*. Mutacje jednego genu nie komplemen-



Rys. 1.10. Mapa genetyczna obszaru rII faga *T4*. Każdy kwadracik oznacza jedną zmapowaną w tym obszarze mutację. Wszystkie mutacje mają identyczny fenotyp: niezdolność do rozwoju faga w komórkach szczepu K *E. coli*. Podziału całego obszaru na dwa geny *A* i *B* dokonano badając zdolność do komplementacji poszczególnych par mutantów

tują w układzie *trans* a komplementują w układzie *cis*, podczas gdy mutacje dwóch różnych genów komplementują w obu układach (p. rys. 1.9).

Brak komplementacji między mutacjami jednego genu nie jest regułą bez wyjątków, istnieje bowiem zjawisko komplementacji wewnątrzgenowej. Zjawisko to dotyczy genów kodujących białka, które są aktywne w formie multimerów, tj. cząsteczek złożonych z dwóch lub więcej identycznych podjednostek (polipeptydów). Jeżeli w komórce występują dwie kopie genu, z których każda jest zmutowana w innym miejscu, to powstające białko jest złożone z podjednostek dwóch rodzajów, różniących się między sobą (i od podjednostek typu dzikiego), np. jednym podstawieniem aminokwasowym. Zdarza się, że w takim przypadku zmiana w jednej podjednostce kompensuje „defekt” drugiej podjednostki i powstaje cząsteczka o właściwej konformacji, zdolna do spełniania swojej funkcji, np. enzymatycznej. Taka kompensacja jest oczywiście niemożliwa, gdy wszystkie podjednostki są zmienione w tej samej pozycji. Komplementacja wewnątrzgenowa jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim i dotyczy tylko bardzo nielicznych mutacji danego genu.

1.8. Analiza genetyczna bakterii

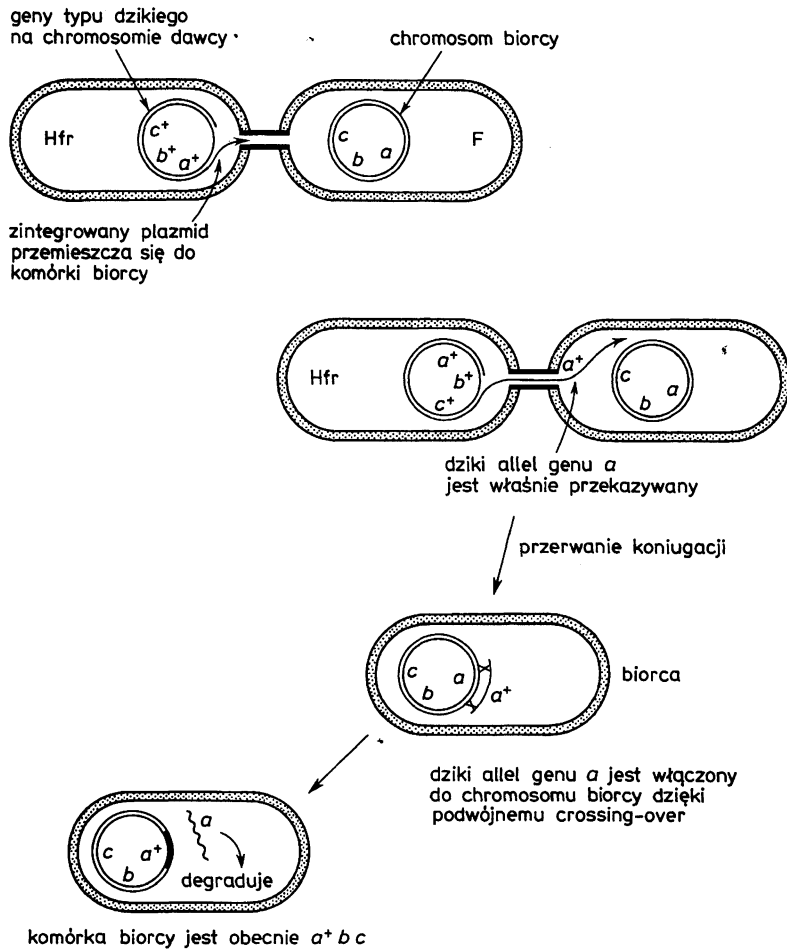
Podstawową metodą analizy genetycznej u wyższych organizmów jest krzyżowanie i badanie częstości rekombinacji zachodzącej w czasie mejozy. U bakterii procesy płciowe i wymiana materiału genetycznego między osobnikami ma zupełnie inny charakter, stąd też metody analizy genetycznej są całkowicie różne. Z kilku powodów warte są chociaż krótkiego omówienia. Przede wszystkim bakterie, a zwłaszcza *E. coli*, stanowią jeden z najważniejszych obiektów prac genetycznych. Wiele podstawowych koncepcji genetycznych, jak choćby rola DNA w dziedziczeniu czy też pierwsze modele regulacji genetycznej, były wynikiem prac nad bakteriami. Równie ważne znaczenie miały prace nad wirusami bakteryjnymi (bakteriofagami), takimi jak *T4*, lambda (λ) i innymi.

Znane są trzy systemy wymiany informacji genetycznej między bakteriami: koniugacja, transformacja i transdukcja. Każdy z nich występuje w naturze, aczkolwiek tylko u niektórych rodzajów bakterii i zachodzi jedynie w określonych warunkach. Wszystkie różnią się od procesów wymiany informacji genetycznej występujących u wyższych organizmów tym, że wkład genetyczny rodziców nie jest jednakowy. Zwykle tylko niewielka część materiału genetycznego z jednej komórki (dawcy) zostaje włączona do aparatu genetycznego drugiej komórki (biorcy), toteż rekombinanty zachowują większość cech jednego z rodziców (biorcy). Ponadto, u bakterii nie ma bezpośredniego związku między procesami wymiany informacji genetycznej a procesem rozmnażania się.

1.8.1. Koniugacja

Materiał genetyczny bakterii jest zorganizowany w postaci chromosomu zawierającego jedną kolistą cząsteczkę DNA, która w przypadku *E. coli* ma długość 1,3 mm, co odpowiada 4 mln par zasad. W cząsteczce tej mieszczą się wszystkie lub ogromna większość genów bakterii. Niewielka część (mniej niż 1%) genów może znajdować się w cząsteczkach DNA, zwanych plazmidami, replikujących się niezależnie od chromosomu.

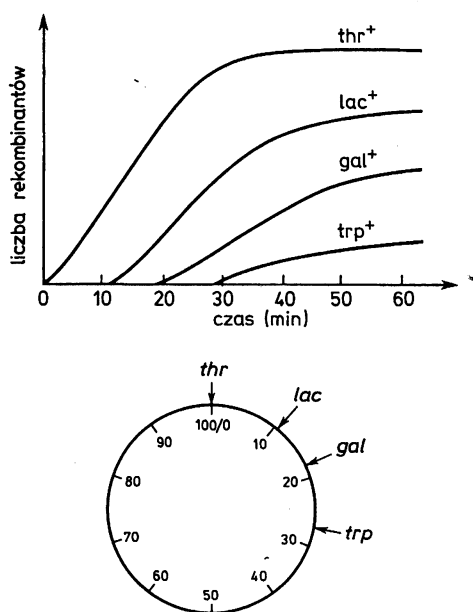
Zjawisko wymiany materiału genetycznego między komórkami *E. coli*, zwane koniugacją, zostało wykryte w roku 1946 przez J. Lederberga. Jego późniejsze prace, a także prace innych badaczy, wykazały, że proces wymiany zachodzi jednokierunkowo: geny bakterii, określanych jako F^+ , są przekazywane bakteriom F^- , przy czym te ostatnie stają się bakteriami F^+ . Ustalono, że różnica między komórkami F^+ i F^- polega na występowaniu w komórkach



Rys. 1.11. Koniugacja pomiędzy bakteriami Hfr i F^-

F^- plazmidu F . Plazmid ten zawiera około trzydziestu genów, wśród których występuje grupa genów *tra*, odpowiedzialnych za wytwarzanie tzw. pili płciowych i przekazywanie (transfer) samego plazmidu oraz fragmentów chromosomu z komórek F^+ do F^- .

W sporządzaniu map genetycznych bakterii najistotniejszą rolę odegrały tzw. szczepy Hfr (skrót od ang. high frequency of recombination). W szczepach tych plazmid F jest zintegrowany z chromosomem bakterii. Mechanizm integracji jest podobny do obserwowanego w przypadku rekombinacji faga λ z chromosomem *E. coli*. W przypadku koniugacji komórek F^+ z komórkami F^- z niewielką częstością dochodzi do przekazania fragmentu chromosomu bakteryjnego, natomiast w przypadku koniugacji Hfr z F^- w zasadzie zawsze komórka biorcy uzyskuje jakiś fragment chromosomu dawcy. Dzieje się tak dlatego, że chromosom bakteryjny pęka tuż obok miejsca integracji plazmidu F i jest sukcesywnie przekazywany do komórki biorcy (rys. 1.11). Długość przekazanego fragmentu chromosomu jest zależna od czasu trwania połączenia między parą koniugujących ze sobą komórek. Zwykle komórki te rozłączają się



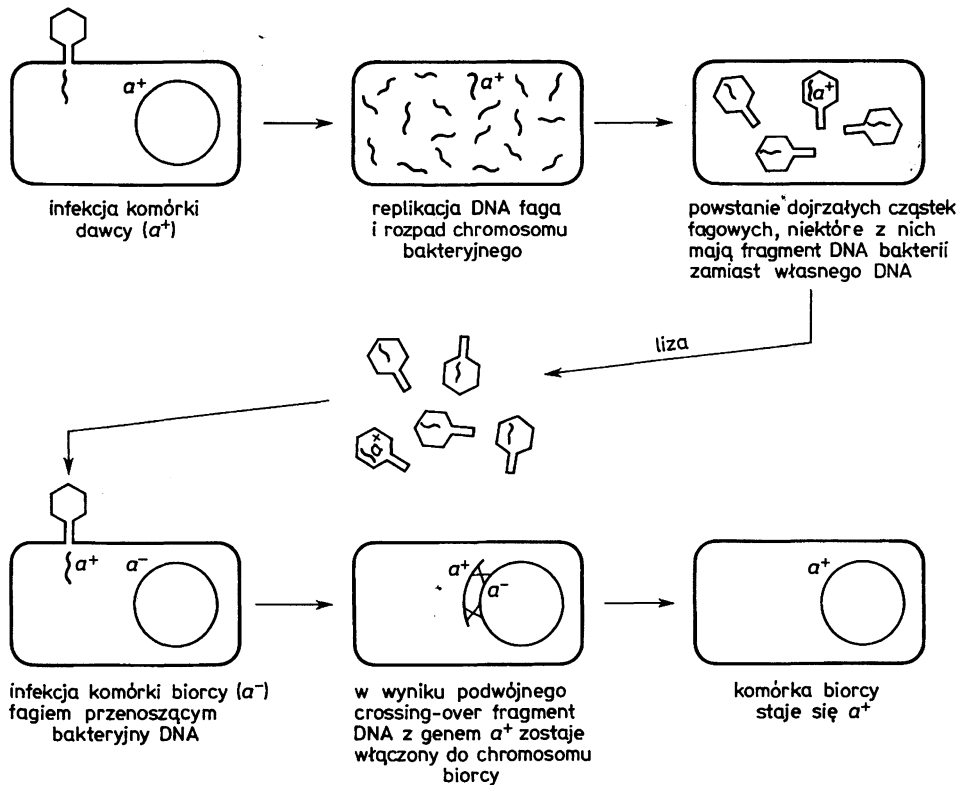
Rys. 1.12. Mapowanie genów za pomocą koniugacji przerywanej. Bakterie użytego szczepu Hfr (dawca) miały dzikie allele genów *thr*, *lac*, *gal* i *trp*. Bakterie F^- miały mutacje w tych genach i były odporne na streptomycynę, podczas gdy szczep Hfr był wrażliwy na ten antybiotyk. Koniugację przerywano po określonym czasie i próbki bakterii wysiewano na pożywkę zawierającą streptomycynę (aby nie wyrosły bakterie Hfr) i odpowiednie uzupełnienia pokarmowe (aby sprawdzić czy pojawiły się bakterie szczepu biorcy, które uzyskały poszczególne dzikie allele genów ze szczepu dawcy). Wykres obrazuje kinetykę pojawiania się poszczególnych rekombinantów. Na podstawie takiego wykresu można zaznaczyć położenie badanych genów na kolistej mapie genetycznej *E. coli*.

Jednostką odległości pomiędzy genami są w tym przypadku minuty

zanim dojdzie do przekazania całego chromosomu, do czego niezbędna jest koniugacja trwająca 90 min.

Proces przekazywania chromosomu bakteryjnego został wykorzystany do mapowania genów *E. coli*. Przeprowadza się koniugację między danym szczepem Hfr (różne szczepy Hfr mają odmienne, ale określone miejsca integracji plazmidu *F*) i szczepem F^- , przerywając ją po określonym czasie i ustalając, które z genów Hfr zostały przeniesione do komórek biorców. Przykład mapowania genów za pomocą techniki przerywanej koniugacji jest przedstawiony na rysunku 1.12. W wyniku doświadczeń tego typu uzyskuje się informacje o wzajemnym położeniu genów na chromosomie bakteryjnym i o odległościach między genami, przy czym te ostatnie są wyrażone w minutach.

Przeniesienie fragmentu chromosomu z komórki Hfr do komórki F^- nie oznacza jeszcze tego, że w komórce F^- będą ulegały ekspresji wprowadzone do niej w tym fragmencie chromosomu geny i że komórka nabędzie warunkowane przez te geny cechy fenotypowe. Aby to się stało, wprowadzony fragment chromosomu musi zintegrować się z chromosomem bakterii, zastępując odpowiedni fragment homologiczny (rys. 1.13).



Rys. 1.13. Transdukcja ogólna

1.8.2. Transformacja

Transformacja polega na pobieraniu przez komórki bakteryjne „nagiego” DNA z podłoża. Niektóre gatunki bakterii należące do rodzajów *Bacillus* i *Haemophilus* mają zdolność wydajnego pobierania DNA. Inne, do których należy *E. coli*, można transformować w warunkach laboratoryjnych, poddając ich komórki odpowiednim zabiegom zmieniającym właściwości błon komórkowych i doprowadzających komórki do stanu tzw. kompetencji. Zjawisko transformacji wykorzystuje się do badania sprzężeń między genami przez ustalanie częstości kotransformacji dwóch genów. Im bliżej siebie położone są geny, tym większa szansa na przeniesienie ich do komórki biorcy w jednym fragmencie DNA i ich integrację z chromosomem w wyniku podwójnego crossing-over.

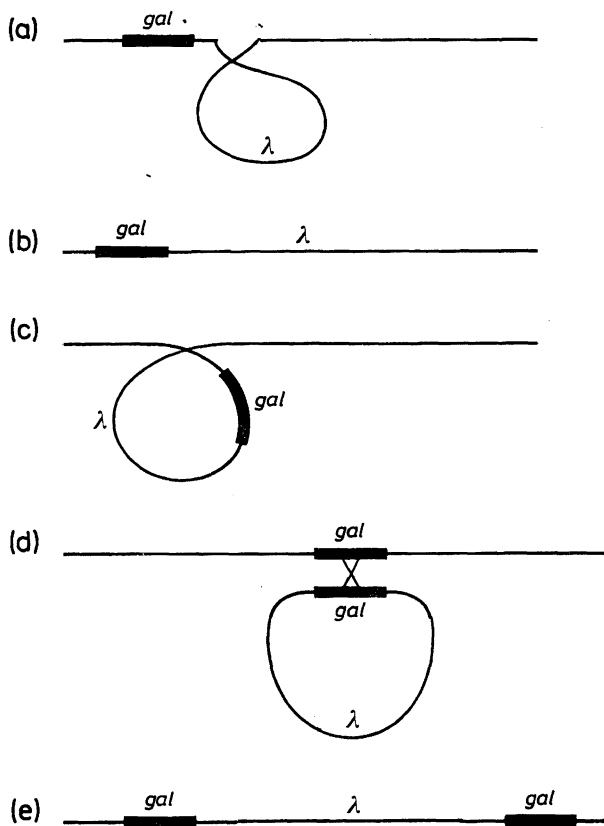
1.8.3. Transdukcja

Transdukcja polega na wymianie DNA między bakteriami za pośrednictwem wirusów bakteryjnych (inaczej: bakteriofagów lub fagów). Wyróżniamy dwa typy transdukcji, ogólną i ograniczoną. Przykładami fagów wywołujących transdukcję ogólną są fag *Salmonella typhimurium* — *P22* i fag *E. coli* — *P1*. W czasie namnażania się fagów w komórkach bakterii wytwarzane są oddzielnie cząsteczki DNA i otoczki białkowe, które łączą się ze sobą w końcowym stadium cyklu rozwojowego faga. Jednocześnie dochodzi do fragmentacji chromosomu bakteryjnego. Fragment chromosomu może być „zapakowany” w otoczkę białkową zamiast lub razem z cząsteczką DNA, stanowiącą genom faga. Cząstka fagowa zawierająca DNA bakteryjny nadal ma właściwości infekcyjne i może przenieść DNA do następnej komórki, w której zostaje on włączony do genomu w wyniku crossing-over (rys. 1.13). Wielkość fragmentu DNA przenieszonego przez faga *P22* wynosi nie więcej niż 40 tysięcy par zasad, co odpowiada wielkości genomu faga. Stanowi to ok. 1% genomu bakteryjnego. Kotransdukcja, czyli jednoczesne przeniesienie z komórki dawcy do komórki biorcy dwóch lub więcej genów, świadczy więc o ich bardzo bliskim sprzężeniu. Mapowanie genów za pomocą transdukcji nie może więc służyć do sporządzania ogólnej mapy genomu bakteryjnego, natomiast znakomicie nadaje się do ustalania sprzężeń między genami znajdującymi się w bliskim sąsiedztwie.

Za pomocą faga *P22* można przenieść z komórki dawcy do komórki biorcy dowolny fragment chromosomu bakteryjnego, stąd też w takich przypadkach mówimy o transdukcji ogólnej. Z inną sytuacją mamy do czynienia w przypadku fagów, które mają zdolność włączania się w ściśle określone miejsce chromosomu bakteryjnego. Najlepiej znanym przykładem takiego faga jest rozwijający się w komórkach *E. coli* fag λ .

Fag λ należy do grupy tzw. łagodnych fagów, co oznacza, że oprócz cyklu litycznego polegającego na namnożeniu się cząstek fagowych i zniszczeniu komórki, może zachodzić cykl lizogeniczny, w którym DNA faga integruje się

z chromosomem bakterii i w postaci tzw. profaga jest powielany zgodnie z cyklem podziałowym chromosomu gospodarza. Integracja zachodzi preferencyjnie w określonym miejscu chromosomu bakteryjnego, w pobliżu genu *gal*. Proces wycinania się profaga z chromosomu następuje z pewną częstością, którą można znacznie podwyższyć działając na komórki określonymi czynnikami, np. promieniowaniem UV. Proces ten może przebiegać nieprecyzyjnie, w tym sensie, że wycięciu podlega DNA profaga wraz z sąsiadującym fragmentem chromosomu. Następuje normalny cykl lityczny, w wyniku którego powstają cząstki fagowe zawierające w swoim genomie określony gen bakteryjny. Gen ten może być przeniesiony do kolejnej komórki, do której wniknie fag i może zostać włączony do jej genomu razem z genomem faga (rys. 1.14). Mechanizm rekombinacji między genomem faga a genomem bakterii zostanie szczegółowo omówiony w rozdziale 7.



Rys. 1.14. Transdukcja ograniczona. (a) i (b) Fag λ rekombinuje z chromosomem bakterii obok locus genu *gal*. (c) Fag λ wyrekombinowuje nieprawidłowo, czego rezultatem jest powstanie defektywnego faga zawierającego zamiast części swoich genów fragment chromosomu bakterii z genem *gal*. (d) i (e) Defektywny fag integruje z chromosomem bakteryjnym na zasadzie rekombinacji pomiędzy przenoszonym przez siebie a obecnym w chromosomie genem *gal*

W wyniku transdukcji ograniczonej przenoszone są geny znajdujące się obok miejsca integracji faga. Jak wspomniano wyżej, preferencyjne miejsce integracji faga λ jest położone obok genu *gal*. Miejsce to można usunąć przez mutacje i wtedy fag integruje się w innych miejscach, co pozwala na transdukowanie również innych niż *gal* genów *E. coli*. Podobnie jak w przypadku transdukcji ogólnej, w czasie transdukcji ograniczonej przenoszone są stosunkowo niewielkie fragmenty genomu bakteryjnego, a zatem kotransdukcja dwóch genów świadczy o ich bliskim położeniu na chromosomie.

Warto zdawać sobie sprawę z tego, że zanim powstały techniki inżynierii genetycznej, uzyskiwanie fagów przenoszących określone geny bakterii było jedyną drogą wiodącą do wyodrębniania genów i do dziś stanowi dogodną metodę konstruowania szczepów bakteryjnych o żądanym genotypie.

1.9. Nie wszystkie geny lokują się w chromosomach

W czasach rozwoju genetyki klasycznej genetycy zaobserwowali wiele przypadków dziedziczenia się cech niezgodnie z prawami Mendla i zasadami teorii chromosomowej. Zjawisko to określano nazwą dziedziczenia cytoplazmatycznego, z tego względu, że niektóre cechy były przekazywane w linii matczynej. Wykrycie obecności DNA w mitochondriach i chloroplastach pozwoliło na pełne wyjaśnienie całego problemu. W organellach tych znajdują się cząsteczki DNA mające zdolność samodzielnej replikacji, niezależnej od replikacji DNA chromosomalnego.

W komórkach występuje wiele mitochondriów, z których każde ma swój własny aparat genetyczny w formie kolistej (na ogół) cząsteczki DNA (mtDNA). Wielkość cząsteczek mtDNA waha się znacznie u różnych organizmów (np. 16,6 tysięcy par zasad — u człowieka, 84 tysięcy par zasad — u drożdży, 570 tysięcy par zasad — u kukurydzy), ale różnice w wielkości wynikają raczej z obecności powtarzających się sekwencji DNA i sekwencji niekodujących niż z liczby genów. W mtDNA występują bowiem geny kodujące mitochondrialne tRNA i rRNA oraz niektóre podjednostki enzymów łańcucha oddechowego. DNA chloroplastowy (ctDNA) ma wielkość 140–195 tysięcy par zasad w zależności od gatunku i zawiera geny kodujące chloroplastowy rRNA, tRNA i geny dla ok. 50 białek, w tym niektórych białek aparatu fotosyntetycznego.

Segregacja organelli w czasie podziałów komórkowych jest losowa, nie ma mechanizmów zapewniających ich precyzyjny rozdział, takich jak mitozę czy mejozę, prowadzące zawsze do rozdzielenia chromosomów. W czasie zapłodnienia udział gamet męskiej i żeńskiej, jako dostarczycieli cytoplazmy wraz z organellami, jest u wielu gatunków niejednakowy, często cała cytoplazma pochodzi wyłącznie z komórki jajowej. Zdarza się też, że organellarny DNA wniesiony przez jedną z gamet ulega degradacji w zygocie. Taka sytuacja ma miejsce np. w przypadku ctDNA u glonu *Chlamydomonas*. Z tych powodów

dziedziczenie cech warunkowanych przez geny mieszczące się w organellarnym DNA nie ma mendlowskiego charakteru; nie obserwuje się charakterystycznych stosunków liczbowych poszczególnych fenotypów w pokoleniach F_1 czy F_2 , a fenotypy potomstwa są różne w krzyżówkach odwrotnych. Krzyżówkami odwrotnymi nazywamy np. krzyżówki $\text{♀ a} \times \text{♂ +}^a$ i $\text{♀ +}^a \times \text{♂ a}$.

Zjawisko dziedziczenia się cech zależnych od genów nie znajdujących się w chromosomach nazywa się obecnie dziedziczeniem pozachromosomalnym lub pozajądrowym. Obejmuje ono nie tylko przypadki genów lokujących się w organellarnym DNA. Zarówno u eukariontów, jak i u prokariontów występują cząsteczki pozachromosomalnego DNA, zwane plazmidami. Powyżej wspomniano o plazmidach determinujących płęć bakterii. Inne plazmidy bakteryjne determinują takie cechy, jak oporność na czynniki antybakteryjne, enzymy degradujące niektóre związki organiczne itp. Wszystkie plazmidy są kolistymi cząsteczkami DNA złożonymi z kilku do kilkuset tysięcy par zasad. W komórce występuje określona liczba kopii plazmidów (od jednej do kilkudziesięciu), zależna od mechanizmów kontrolujących ich replikację. Niektóre z tych mechanizmów będą omówione w rozdziale 3. Spośród plazmidów eukariotycznych najbardziej znany jest plazmid 2μ opisany u *Saccharomyces cerevisiae*. Plazmid ten, podobnie jak niektóre plazmidy *E. coli*, odgrywa ważną rolę jako wektor stosowany w inżynierii genetycznej (p. rozdz. 6).

2. DNA — BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI

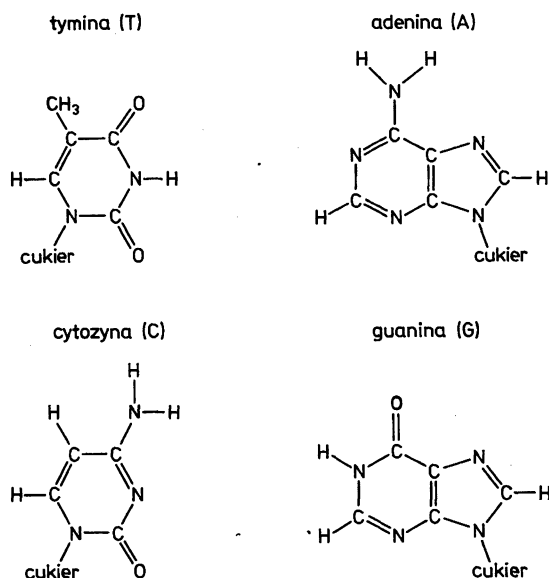
DNA (kwas deoksyrybonukleinowy) zajmuje wyjątkową pozycję wśród cząsteczek chemicznych tworzących materię ożywioną. W postaci liniowej sekwencji zasad zapisana jest w DNA informacja o budowie cząsteczek białek i RNA, które z kolei determinują kompletną strukturę i wszystkie funkcje komórek oraz całych organizmów. Jednocześnie, szczególna budowa cząsteczki DNA umożliwia precyzyjne powielanie informacji genetycznej, bez którego nie byłoby możliwe rozmnażanie się organizmów i dziedziczenie cech, a zatem i proces ewolucji na Ziemi.

2.1. Wiele cech strukturalnych cząsteczki DNA wynika z właściwości zasad

Cząsteczka DNA ma postać długiego, nierozgałęzionego podwójnego heliksu, który tworzą dwa ułożone przeciwrównoległe i owijające się wokół siebie łańcuchy polinukleotydowe. Zbudowane są one z jednostek, zwanych deoksyrybonukleotydami. W skład każdego deoksyrybonukleotydu wchodzi jedna z czterech zasad azotowych występujących w DNA (rys. 2.1), tj. adenina, tymina, guanina lub cytozyna, połączona wiązaniem N-glikozydowym z pierścieniem pentozowym cukru (2-deoksyrybozy), do którego przyłączona jest także reszta fosforanowa.

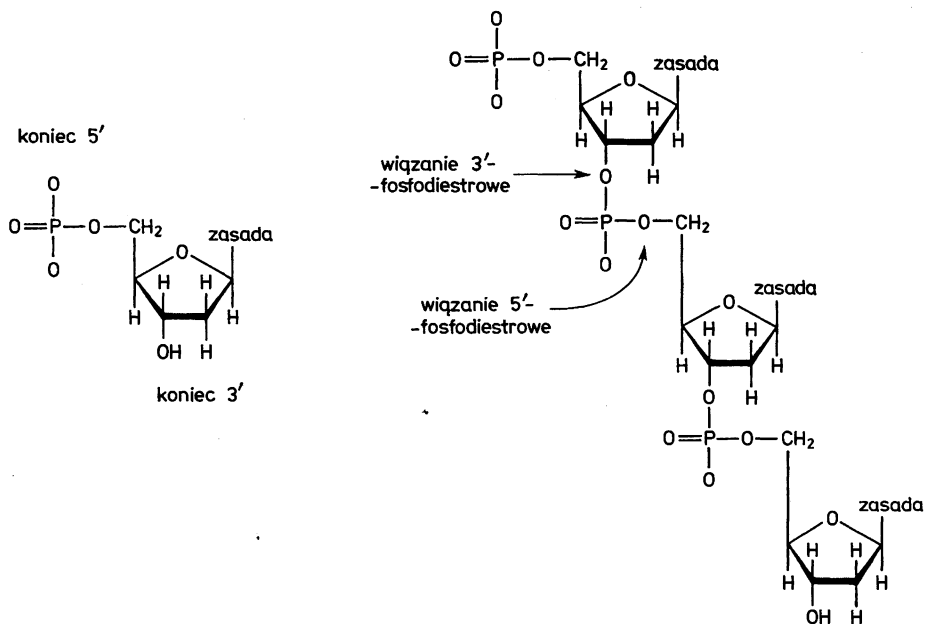
W łańcuchu polinukleotydowym deoksyrybonukleotydy połączone są ze sobą wiązaniami fosfodiestrowymi, występującymi między atomem węgla 5' jednej reszty cukrowej a atomem węgla 3' reszty cukrowej, która z nią sąsiaduje (rys. 2.2).

Nierozpuszczalność zasad azotowych w wodzie o obojętnym pH, a jednocześnie dobra rozpuszczalność w tych warunkach deoksyrybozy z przyłączoną resztą fosforanową wymuszają określoną konformację dużych cząsteczek



Rys. 2.1. Zasady azotowe występujące w DNA

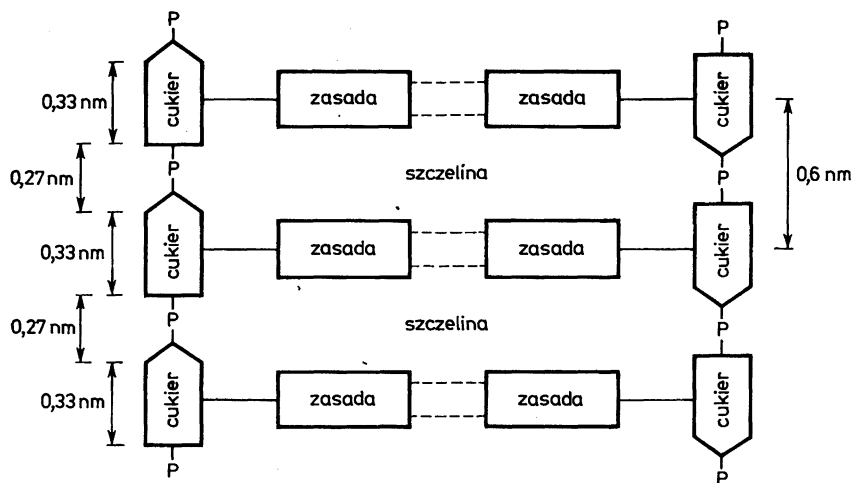
DNA. Aby cząsteczki takie mogły być stabilne w obojętnych roztworach wodnych, muszą one utworzyć ściśle upakowaną strukturę, wewnątrz której znaleźć się powinny wszystkie elementy nierozpuszczalne w wodzie, tj. zasady, na zewnątrz zaś — elementy rozpuszczalne w wodzie, tj. cząsteczki cukru



Rys. 2.2. Deoksyrybonukleotyd i fragment łańcucha polinukleotydogo

i reszty fosforanowe. Badania krystalograficzne włókien DNA wykazały, że istotnie przyjmują one tego typu strukturę. W fizjologicznej sile jonowej struktura ta ma postać regularnego heliksu o średnicy 2 nm i długości skoku 3,4 nm.

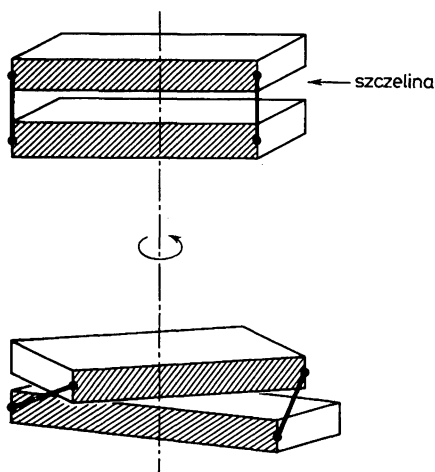
Heliks DNA można porównać do skręconej spiralnie drabiny, której szczeble (hydrofobowe wnętrze) tworzą oddziałujące ze sobą zasady, natomiast pionowe listwy (polarne krawędzie) stanowią połączone wiązaniami fosfodiesterowymi cząsteczki deoksyrybozy. Konieczność spiralnego skręcenia całej struktury staje się oczywista, gdy porówna się wymiary poszczególnych elementów



Rys. 2.3. Drabina DNA utworzona przez dwa łańcuchy polinukleotydowe; zaznaczono wymiary poszczególnych elementów

deoksyrybonukleotydów (rys. 2.3). Odległość między sąsiadującymi cząsteczkami pentozy wynosi 0,6 nm natomiast grubość płaskich pierścieni zasad — 0,33 nm. Gdyby dwa łańcuchy polinukleotydowe tworzyły prostą drabinę, między sąsiadującymi w warstwach pierścieniami zasad istniałaby pusta szczelina o grubości 0,27 nm. Ponieważ przestrzeni tej, ze względu na silnie hydrofobowy charakter zasad, nie mogą zająć cząsteczki wody, musi ona być zlikwidowana lub wypełniona przez jakąś inną cząsteczkę o właściwościach hydrofobowych (np. cząsteczkę bromku etydyne), aby cała struktura była stabilna. Skręcenie w stosunku do siebie (wokół osi pionowej) warstw utworzonych przez płaszczyzny zasad powoduje, że puste szczeliny między nimi zostają zlikwidowane (rys. 2.4).

W hipotetycznym heliksie zbudowanym tak, by między płaszczyznami zasad nie występowały szczeliny, kąt skręcenia sąsiadujących warstw wynosi $32,3^\circ$, co stanowi $1/11$ pełnego obrotu ($360^\circ/32,3^\circ$). Na jeden pełny obrót heliksu powinno zatem przypadać 11 par zasad. Wartość ta jest zgodna z danymi doświadczalnymi, uzyskanymi dla różnych form podwójnego heliksu DNA (formy te opisane są bardziej szczegółowo w dalszej części rozdziału).



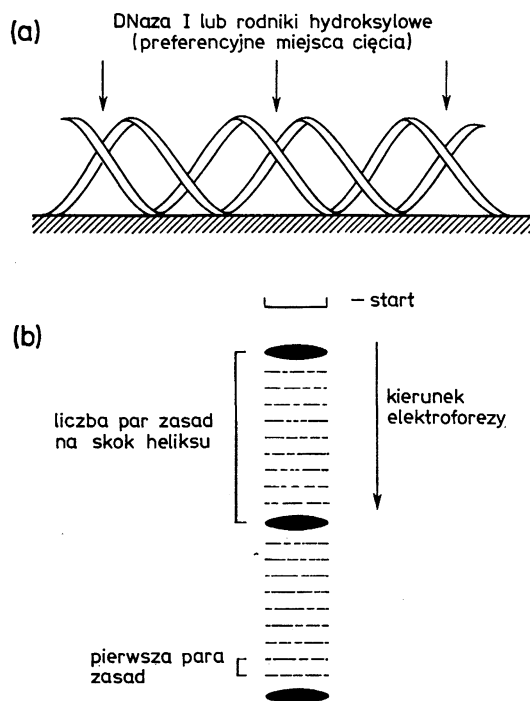
Rys. 2.4. Ułożenie zasad w warstwach w prostej i spiralnie skręconej drabinie. Skręcenie wokół osi pionowej powoduje likwidację szczeliny między warstwami

Liczba par zasad przypadająca na jeden pełny obrót heliksu wynosi 10,5 dla formy B, 11 — dla formy A i 12 — dla formy Z. W jaki sposób wyznacza się tak dokładnie te wartości? Dane o wymiarach podwójnego heliksu DNA pochodzą z jednej strony z badań krystalograficznych, z drugiej zaś, z analizy sposobu przecinania DNA w roztworze przez nukleazy bądź związki generujące wolne rodniki oraz, w przypadku kolistych cząsteczek DNA, z analizy topoizomerów.

Badania krystalograficzne wykonuje się obecnie nie na populacjach heterogennych cząsteczek DNA, jak w latach 50. i 60., lecz na homogennych pod względem wielkości i sekwencji oligonukleotydach. Wyniki tych badań wskazują, że oligonukleotydy zawierające różne sekwencje zasad mają w większości strukturę zbliżoną do formy B DNA (10,5 par zasad na skręt). Silny wpływ na strukturę DNA mają warunki krystalizacji. Odwodnienie włókna powoduje, że DNA przyjmuje strukturę typu A (11 par zasad na skręt). Formę Z (heliks lewoskrętny — 12 par zasad na skręt) przyjmują w roztworze o wysokiej sile jonowej charakterystyczne sekwencje złożone z naprzemiennie występujących po sobie G i C.

Badanie struktury DNA w roztworze wodnym (w warunkach fizjologicznych) za pomocą analizy wzoru przecinania wymaga uprzedniego unieruchomienia cząsteczki DNA na płaskiej powierzchni. Cząsteczki DNA ulegają łatwo adsorpcji, np. na powierzchni kryształów fosforanu wapnia. Adsorpcja powoduje, że jedna strona podwójnego heliksu jest niedostępna dla czynników działających w roztworze, druga zaś pozostaje eksponowana. Maksymalnie eksponowane miejsca podwójnego heliksu są najbardziej narażone na przecinanie. Ze względu na periodyczną strukturę DNA, miejsca takie powtarzają się co pełen obrót spirali. Ich rozkład wyznacza zatem długość skoku podwójnego heliksu. Do przecinania DNA zaadsorbowanego na stałych powierzchniach stosuje się często enzym DNazę I (stosunkowo mało specyficzny w stosunku do sekwencji zasad) lub kompleksy żelaza z EDTA. Te ostatnie redukują nadtlenek wodoru, uwalniając silnie reaktywne rodniki hydroksylowe, które

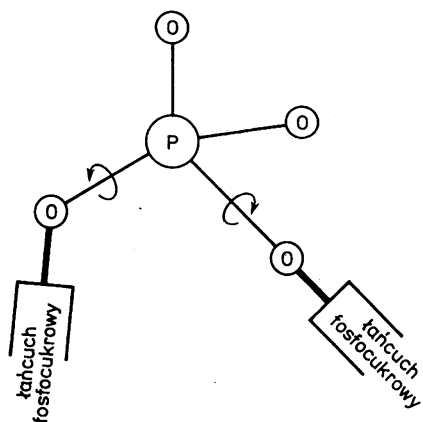
Rys. 2.5. Wyznaczanie skoku podwójnego heliksu DNA za pomocą analizy produktów powstających w wyniku działania DNazy I lub wolnych rodników hydroksylowych. (a) Unieruchomienie cząsteczki DNA na płaskiej powierzchni (np. na kryształach fosforanu wapniowego) powoduje, że na atak nukleazy lub wolnych rodników najbardziej narażone są maksymalnie ekspozycjonowane miejsca znajdujące się po jednej stronie heliksu. (b) Analizę produktów degradacji DNA (po ich uprzedniej denaturacji) przeprowadza się za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Odległości między najsilniejszymi prążkami wyznaczają skok podwójnego heliksu



powodują rozpad wiązań w pierścieniach pentozowych deoksyrybonukleotydów. Produkty powstałe po działaniu DNazy I lub rodników hydroksylowych na DNA denaturuje się i rozdziela za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Odległości między najbardziej intensywnymi prążkami odpowiadają skokowi podwójnego heliksu (rys. 2.5). Za pomocą tej samej metody można wyznaczyć skok podwójnego heliksu w cząsteczce DNA oddziałującej z innymi powierzchniami, np. z powierzchnią histonowej cząstki rdzeniowej w nukleosomie.

Niezależna metoda pomiaru skoku podwójnego heliksu opiera się na analizie liczby topoizomerów zamkniętych (kolistych) cząsteczek DNA o określonej długości. Metoda ta zostanie bliżej opisana w dalszej części rozdziału. Pomiary wykonane dla DNA w roztworze wskazują, że i w tych warunkach na pełny skok heliksu przypada około 10,5 par zasad.

Szkielet fosforanowo-cukrowy DNA jest elastyczny. Zawdzięcza to swobodzie rotacji podstawnika cukrowego wokół wiązania P—O (rys. 2.6). Ważną konsekwencją tej cechy szkieletu jest możliwość zmiany stopnia skręcenia podwójnego heliksu DNA. Na przykład, zmiana taka ma miejsce w wyniku oddziaływania DNA z bromkiem etydyny. Cząsteczki tej substancji są silnie hydrofobowe, mają przy tym wymiary zbliżone do wymiarów pary komplementarnych zasad, a wnikać między warstwy zasad wymuszają utworzenie między nimi szczeliny (o której wspomniano wyżej), a co za tym idzie — rozkręcenie podwójnego heliksu. Po interkalacji bromku etydyny cząsteczka



Rys. 2.6. Szkielet fosfocukrowy jest elastyczny, ponieważ podstawniki cukrowe mają swobodę rotacji wokół wiązania O—P

DNA przyjmuje postać niemal prostej drabiny. Ze względu na ten charakterystyczny efekt, bromek etydyny jest ważnym narzędziem do badania zmian struktury DNA związanych z „rozkrećaniem” podwójnego heliksu.

Naturalne heliksy DNA są prawoskrętne; łańcuchy polinukleotydowe, wydłużając się, okręcają się wokół siebie w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara. Prawoskrętność podwójnego heliksu DNA jest konsekwencją wielkości i przestrzennego ułożenia atomów w deoksyrybonukleotydach. Tylko prawoskrętność umożliwia powstanie stabilnej, regularnej struktury przestrzennej DNA (można to wykazać próbując zbudować heliks lewoskrętny za pomocą czasowych modeli deoksyrybonukleotydów). Nie oznacza to jednak, że nie mogą istnieć lewoskrętne heliksy DNA. Udaje się je otrzymać sztucznie dla krótkich odcinków DNA o charakterystycznych sekwencjach zasad. Tego rodzaju strukturą jest DNA w formie Z. Ma on postać lewoskrętnego heliksu o skoku liczącym 12 par zasad. Jak wykazują badania krystalograficzne DNA w formie Z, lewoskrętny heliks jest strukturą znacznie mniej regularną niż heliks prawoskrętny.

Strukturę podwójnego heliksu DNA utrzymują oddziaływania między zasadami. W naturalnie występującym DNA są to oddziaływania między A i T oraz między G i C. Wymienione zasady tworzą pary A—T i G—C, zwane parami Watsona—Cricka. Ze względu na to, że cztery możliwe formy par Watsona—Cricka (A—T, T—A, G—C i C—G) mają identyczne wymiary, poczynione pierwotnie przez Watsona i Cricka założenie, że pary takie występują w DNA dobrze pasowało do danych strukturalnych wskazujących na jednolitą średnicę podwójnego heliksu. Na istnienie par Watsona—Cricka wskazywały także dane o identycznej zawartości adeniny i tyminy oraz guaniny i cytozyny w DNA z różnych organizmów. Charakterystyczne ułożenie zasad w parach typu Watsona—Cricka (np. 2.7(a)) nie jest jednak jedynym, jakie może występować między oddziałującymi ze sobą A i T oraz G i C. Na rysunku 2.7(b) przedstawiono oddziaływania występujące w parach typu Hoogsteena (Karst Hoogsteen był pierwszym, który wykazał, że w kryształach złożonych

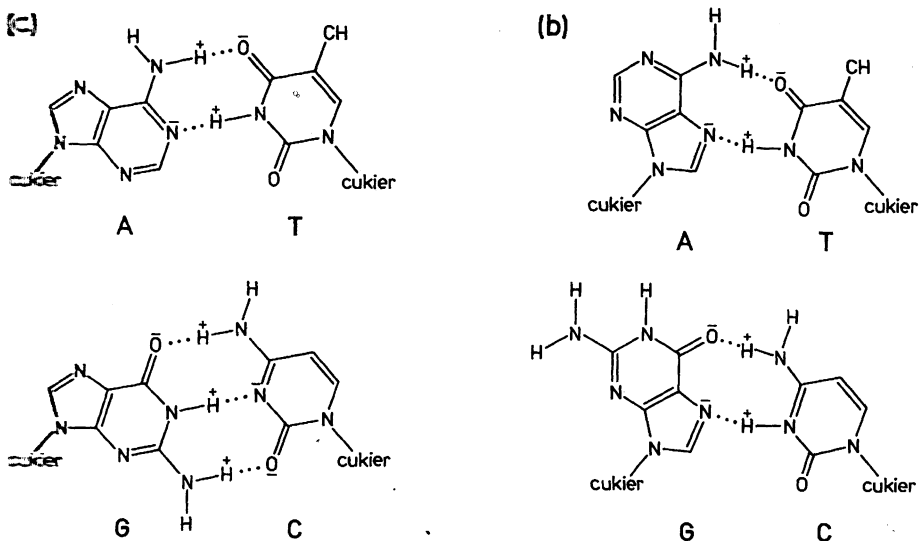


Fig. 2.7. Pary typu Watsona–Cricka (a) i typu Hoogsteena (b). Kropkami zaznaczono wiązania wodorowe między atomami wodoru obdarzonymi cząstkowym ładunkiem dodatnim (+), a atomami tlenu lub azotu obdarzonymi cząstkowym ładunkiem ujemnym (-)

z adeniny i tyminy wygląd pary A–T jest inny niż przewidywali Watson i Crick).

Badania strukturalne naturalnych cząsteczek DNA wykazały, że występują w nich wyłącznie pary typu Watsona–Cricka. Skoro mogą istnieć alternatywne formy par A–T i G–C, dlaczego nie występują one w naturalnych DNA? Główną przyczyną jest niestabilność pary G–C typu Hoogsteena w fizjologicznym pH. Utworzenie tej pary wymaga protonacji jednego z atomów azotu cytozyny, co jest możliwe dopiero po obniżeniu pH do 4–5. Para ta ma przy tym tylko dwa wiązania wodorowe, jest więc mniej stabilna niż para pary G–C typu Watsona–Cricka. Oddziaływania typu Hoogsteena, mimo że najprawdopodobniej nie występują w podwójnym heliksie DNA, odgrywają bardzo ważną rolę przy tworzeniu tzw. potrójnego heliksu, struktury, w której do fragmentu podwójnego heliksu DNA przyłączony jest, komplementarny do jednej z nici, trzeci łańcuch polinukleotydu. Oddziałuje on z podwójnym heliksem DNA, tworząc pary typu Hoogsteena. Szuczne indukowanie struktury potrójnego heliksu w określonych rejonach DNA za pomocą syntetycznych, komplementarnych do wybranych sekwencji, sond jest obiecującą metodą selektywnej ingerencji w ekspresję aparatu genetycznego.

Oddziaływania typu Hoogsteena występują także w kompleksach między DNA a wieloma lekami o działaniu przeciwnowotworowym. Wiedza o potencjalnych możliwościach powstawania par typu Hoogsteena w różnych rejonach DNA ma kapitalne znaczenie dla opracowania leków, oddziałujących w ściśle określonym miejscu genomu.

Oprócz oddziaływań typu Hoogsteena oraz występujących w parach typu Watsona–Cricka możliwe są także oddziaływania prowadzące do powstania par nietypowych, np. G—T lub A—C. Występują one np. w kompleksach między zasadami w mRNA a trzecią zasadą antykodonu w tRNA. Zjawisko to warunkuje występujący w procesie translacji efekt tolerancji w trzeciej zasadzie kodonu. Teoretycznie takie nietypowe pary mogłyby istnieć także w DNA. Powodują one jednak wyraźne zaburzenie regularnej struktury podwójnego heliksu; są w związku z tym łatwe do wykrycia przez komórkowe systemy naprawcze, które potrafią je wydajnie usuwać.

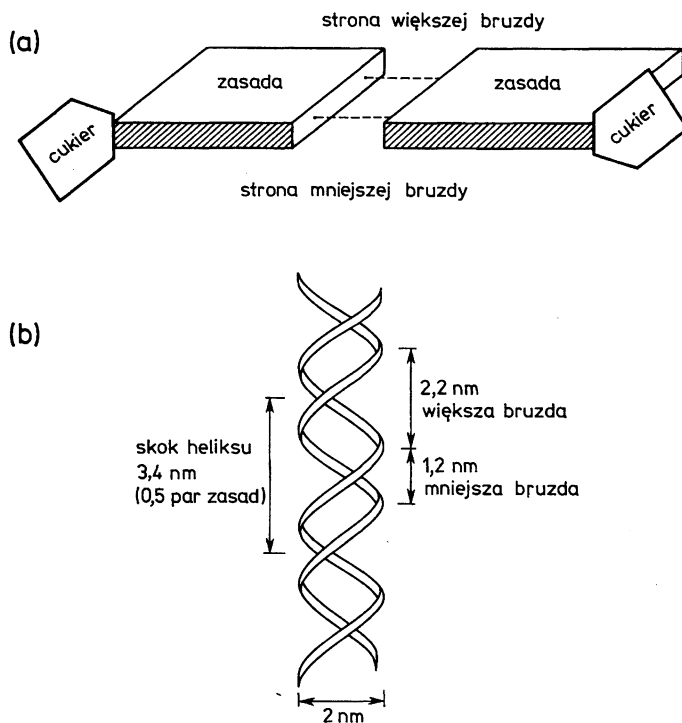
2.2. Lokalna sekwencja zasad w DNA wywiera silny wpływ na konformację i właściwości podwójnego heliksu

Jednym z podstawowych celów badań strukturalnych nad DNA i kompleksami DNA z różnymi ligandami jest wyjaśnienie na poziomie molekularnym podłoża specyficzności oddziaływań DNA z innymi makrocząsteczkami, przede wszystkim białkami. Wiemy, że lokalne sekwencje zasad w DNA determinują specyficzność oddziaływań z takimi białkami, jak represory i aktywatory transkrypcji, polimerazy RNA, nukleazy (np. nukleazy restrykcyjne), a nawet kompleksy histonów w nukleosomach. Co jednak fizycznie określa specyficzna sekwencja zasad: ułożenie w odpowiednim porządku miejsc wiązania dla reszt aminokwasowych, lokalną geometrię podwójnego heliksu, czy elastyczność umożliwiającą dostosowanie się do krzywizny powierzchni białka?

2.3. Na powierzchni podwójnego heliksu występują dwie bruzdy

Na powierzchni podwójnego heliksu DNA przebiegają, owijając się spiralnie wokół podłużnej osi, dwie równoległe bruzdy (rowki). W przypadku DNA w formie B jedna z bruzd, o średnicy około 2,2 nm, nazywana jest większą druga zaś, o średnicy około 1,2 nm — mniejszą. Asymetria bruzd wynika z faktu, że pierścienie pentozowe cukrów leżą bliżej jednego z dwóch dłuższych brzegów każdej z komplementarnych par zasad (rys. 2.8). Brzeg bliższy cząsteczkom cukrów tworzy dno mniejszej bruzdy, brzeg przeciwny stanowi dno większej bruzdy. Należy jednak pamiętać o tym, że geometria bruzd zależy od formy, jaką przyjmuje podwójny heliks. Na przykład w przypadku podwójnego heliksu w formie A, obie bruzdy mają identyczne wymiary.

Bruzdy są tymi obszarami w cząsteczce DNA, przez które inne cząsteczki mogą uzyskać dostęp do wnętrza podwójnego heliksu. Wymiary i geometria bruzd stanowią więc bardzo ważny element rozpoznawczy dla łączących się z DNA ligandów. W dalszej części opisane zostaną czynniki, od których zależy lokalna geometria bruzd.



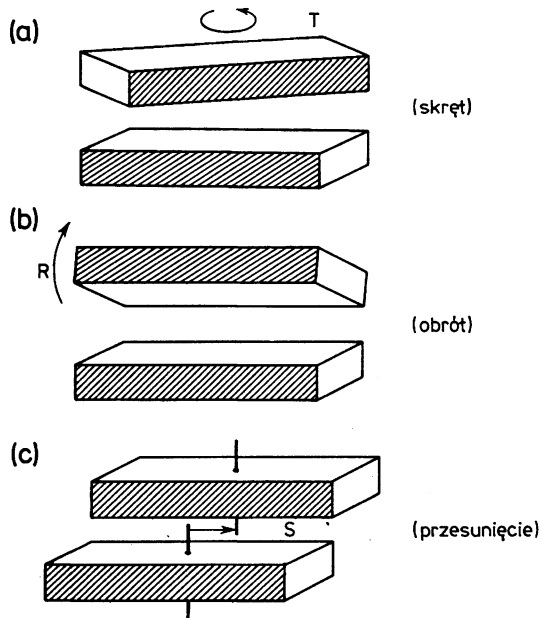
Rys. 2.8. Mniejsza i większa bruzda na powierzchni DNA. (a) Asymetria ułożenia cząsteczek cukrów w stosunku do krawędzi zasad jest przyczyną różnych wymiarów bruzd. (b) Bruzdy w DNA w formie B — schemat

2.4. Parametry służące do opisu lokalnej struktury podwójnego heliksu

W odróżnieniu od cząsteczek białka, które w zależności od sekwencji aminokwasów mogą przyjmować różne formy przestrzenne, generalny typ struktury przestrzennej DNA, podwójny heliks, jest taki sam bez względu na sekwencję zasad. Tylko bardzo dokładne badania, a w szczególności analiza rentgenowska fragmentów DNA o określonej sekwencji, ujawniają w strukturze podwójnego heliksu zakłócenia i odstępstwa od regularności, wynikające z cech lokalnego układu zasad. Najważniejszą z tych cech jest sposób oddziaływania sąsiadujących warstw zasad (ang. stacking).

Drew i Calladine (Cambridge, Anglia) zaproponowali metodę ścisłego opisu lokalnej struktury podwójnego heliksu za pomocą niewielkiej liczby parametrów, określających relacje sąsiadujących warstw zasad.

Na rysunku 2.9. pokazano, jakie parametry opisują wzajemne ułożenie dwóch prostopadłościennych bloków wyobrażających sąsiadujące warstwy zasad w podwójnym heliksie DNA. T — (ang. twist) określa kąt skręcenia



Rys. 2.9. Podstawowe parametry określające ułożenie względem siebie sąsiadujących warstw zasad w podwójnym heliksie DNA

w stosunku do siebie płaszczyzn wokół podłużnej osi heliksu. R — (ang. roll) określa kąt rozchylenia sąsiadujących płaszczyzn względem osi podłużnej, natomiast S — (ang. slide) wskazuje wielkość przesunięcia w stosunku do siebie, względem osi podłużnej, płaszczyzn zasad w warstwach. W cząsteczce DNA w formie B kąt T wynosi około 34° , wiadomo jednak, że jest to wartość uśredniona dla całej cząsteczki. Lokalnie kąt T może przybierać inne wartości. W idealnej, prostej cząsteczce w formie B wartość R powinna być bliska 0, wiadomo jednak, że lokalnie może ona wynosić od $+20^\circ$ do -10° (znak „+” oznacza, że zasady rozchylają się w kierunku mniejszej bruzdy, znak „-” oznacza, że rozchylają się w kierunku większej bruzdy). Wielkość przesunięcia (S) jest silnie ograniczona przez łańcuch fosforanowo-cukrowy i może wynosić od $+0,2$ nm do $-0,1$ nm (znak „+” oznacza w tym przypadku przesunięcie górnej warstwy w prawo w stosunku do dolnej, patrząc od strony mniejszej bruzdy).

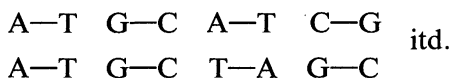
Do podanego opisu, który traktuje pary zasad jak sztywne jednolite bloki, należy dodać jeszcze jedną istotną cechę zasad w komplementarnej parze. Jest nią możliwość występowania w pojedynczej parze skręcenia śmigłowego (ang. propeller-twist) płaszczyzn zasad w stosunku do siebie (ryc. 2.10). Przyczyną skręcenia śmigłowego zasad w pojedynczej parze jest dążenie do maksymalnie

Rys. 2.10. Skręcenie śmigłowe zasad w pojedynczej parze

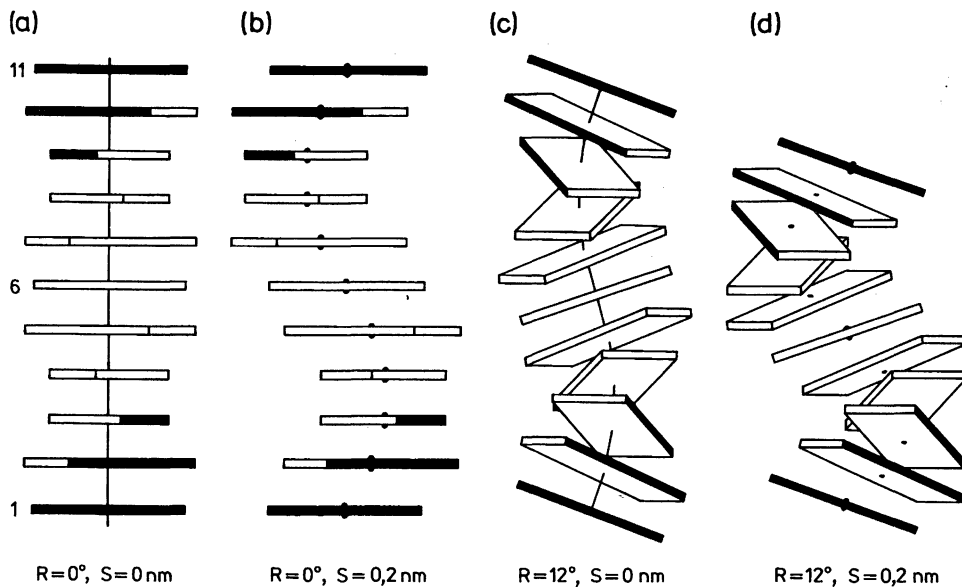


silnych oddziaływań hydrofobowych w sąsiadujących warstwach. Skręcenie to (w DNA może ono wynosić $10-20^\circ$) jest przyczyną lekkiego odkształcenia wiązań wodorowych łączących zasady.

Zaproponowana przez Drewa i Calladine'a metoda precyzyjnego opisu struktury DNA, oparta na geometrycznej analizie oddziaływania między sąsiadującymi warstwami zasad, nie pozwala na przewidywanie struktury dużych fragmentów DNA na podstawie znajomości ich sekwencji. Mimo iż warstwy utworzone przez konkretne pary, a więc np:



różnią się wartościami R, T i S, a także stopniem skręcenia śmigłowego w poszczególnych parach, dane rentgenograficzne, pochodzące z analizy dwuniciowych oligodeoksynukleotydów o różnych sekwencjach, wskazują, że dla każdego typu sąsiedztwa zasad w warstwach (a więc, czytając wzdłuż jednej nici: GC, CG, GG, CC, AA, AT itd.) istnieje nie jedna, a cały zakres konfiguracji (określonych parametrami T, R i S), które mogą one przyjmować. Rzeczywista konfiguracja dwóch sąsiadujących warstw zależy przede wszystkim od kontekstu sekwencyjnego, w którym te warstwy się znajdują. Tym niemniej, posługiwanie się, w celu opisu struktury DNA, parametrami wyznaczającymi ściśle relacje między sąsiadującymi warstwami zasad, daje dobre

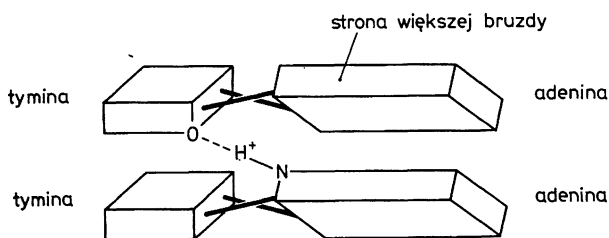


Rys. 2.11. Zależność ogólnej konformacji DNA od oddziaływań sąsiadujących warstw zasad. Jeden pełny skok podwójnego heliksu dla DNA o stałym $T = 36^\circ$ i zmiennych wartościach R i S: (a) odpowiada DNA w formie B, (d) odpowiada DNA w formie A, (b) i (c) stanowią struktury pośrednie między formą A i formą B. Struktury (b) i (c) wykryto za pomocą analizy rentgenowskiej w naturalnym DNA (wg Calladine C.R. i Drew H. R., za pozwoleniem)

wyobrażenie o tym, jak bardzo na lokalną strukturę DNA może wpływać nawet niewielka, lecz powtarzająca się zmiana w oddziaływaniach między kolejnymi warstwami. Ilustruje to rysunek (rys. 2.11) przedstawiający fragmenty czterech cząsteczek DNA (każdy o długości odpowiadającej jednemu pełnemu skokowi heliksu), w których, przy niezmiennym kącie skręcenia między warstwami zasad ($T = 36^\circ$), zmieniano kąt obrotu R ($0-12^\circ$) i przesunięcie S ($0-0,2$ nm).

2.5. Struktura fragmentów DNA zawierających sekwencje bogate w AT

Wpływ lokalnej sekwencji na konformację DNA ujawnia się najwyraźniej w przypadku sekwencji bogatych w AT. Analiza krystalograficzna fragmentów DNA o sekwencji $d(AAAAAA)-d(TTTTTT)$ wykazuje istnienie silnego skręcenia śmigłowego zasad w parze A—T, daleko posunięte zwężenie mniejszej bruzdy oraz występowanie dodatkowego, nietypowego wiązania wodorowego między zasadami w sąsiadujących warstwach (rys. 2.12).



Rys. 2.12. Szczególne cechy sąsiadujących warstw A—T. Widoczne jest silne skręcenie śmigłowe zasad oraz dodatkowe, nietypowe wiązanie wodorowe między N^+ adeniny i O^- tyminy łączące od strony większej bruzdy zasady w sąsiadujących warstwach

Konsekwencją istnienia dodatkowego międzywarstwowego wiązania wodorowego jest prosty przebieg i znaczna sztywność fragmentów oligo(dA)—oligo(dT). Rozkład oddziaływań hydrofobowych między warstwami zasad w homopolimerze oligo(dA)—oligo(dT) umożliwia ściśle uporządkowane ułożenie wzdłuż szkieletu DNA cząsteczek wody (co najmniej 2 na każdą parę nukleotydów). Prowadzi to do wytworzenia „kręgosłupa hydratacyjnego” dodatkowo zwiększającego sztywność cząsteczki. Ma to bardzo poważne konsekwencje biologiczne. Na przykład, długie homopolimery opisanego typu nie mogą tworzyć nukleosomów, ponieważ brak im dostatecznej elastyczności niezbędnej do owinięcia się wokół białkowego oktameru, tworzącego rdzeń tej struktury.

Umieszczenie w ciągu oligo(dA)—oligo(dT) pary G—C prowadzi do zaburzenia sztywności całego fragmentu i lokalnego rozszerzenia mniejszej bruzdy.

Zupełnie odmienne pod względem właściwości od homopolimerów oligo(dA)—oligo(dT) są fragmenty oligo[d(A—T)], tj. fragmenty o sekwencji:



gdzie w sąsiadujących warstwach leżą nad sobą na przemian mała pirymidyna (T) i duża puryna (A). Między takim warstwami nie dochodzi do maksymalnie silnych oddziaływań hydrofobowych (pociągnęłoby to za sobą poważne odkształcenie podwójnego heliksu) i usztywnienia struktury. Fragmenty oligo[d(A—T)] są w związku z tym bardzo elastyczne.

2.6. Lokalne sekwencje określają podatność DNA na rozkręcanie i zginanie

Lokalne rozkręcenie i denaturacja podwójnego heliksu jest niezbędnym początkowym etapem najważniejszych procesów, w których bierze udział DNA, tj. replikacji i transkrypcji. Analiza oddziaływań między sąsiadującymi warstwami w różnych układach zasad pozwala dość łatwo zidentyfikować sekwencję, której podatność na rozkręcanie będzie największa. Powinna ona zawierać raczej pary A—T niż G—C, ponieważ połączone dwoma wiązaniami wodorowymi A—T są bardziej podatne na denaturację niż połączone trzema wiązaniami G—C. Leżące naprzemiennie puryna i pirymidyna, tj. układ:



odznaczają się najniższą spośród wszystkich sekwencji stabilnością, wynikającą z oddziaływania płaszczyzn zasad w warstwach (bezpośrednio nad sobą znajduje się tu najmniejsza powierzchnia zasad). W warstwach, w których w jednym łańcuchu bezpośrednio nad sobą leżą puryna (adenina) i pirymidyna (tymina) może w związku z tym dochodzić do zmniejszenia kąta skręcenia nawet do wartości $T = 28^\circ$. W porównaniu z resztą DNA, dla którego $T = 34^\circ$, jest to struktura już częściowo rozkręcona. Do jej dalszego rozkręcenia potrzebna jest zatem odpowiednio niższa energia.

W rejonach promotorowych wielu genów (szczególnie u bakterii) występuje charakterystyczna sekwencja składająca się z ciągu ułożonych naprzemiennie puryn i pirymidyn, gdzie puryną jest adenina, a pirymidyną — tymina. Jest to tzw. „kaseta TATA” (ang. TATA-box). Zgodnie z przedstawioną analizą właściwości tego typu sekwencji, wyróżniać będzie się ona spośród innych w DNA zwiększoną podatnością na rozkręcanie i denaturację. Nie wiadomo jeszcze jaka jest dokładnie rola kasety TATA w inicjacji transkrypcji (sekwencja TATA nie występuje w promotorach wielu genów eukariotycznych), jest jednak wysoce prawdopodobne, że kluczowe znaczenie ma właśnie jej podatność na rozkręcanie i denaturację.

Z punktu widzenia funkcji biologicznych równie istotna, jak podatność na rozkręcanie, jest naturalna skłonność pewnych fragmentów DNA do zaginania się (ang. bending). Występowanie zagięć w cząsteczkach DNA jest zjawiskiem powszechnym. Istnienie zagiętych odcinków DNA wykazano w genomach wirusów, bakterii i wszystkich badanych pod tym względem przedstawicieli eukariontów. Rozróżnienie między podatnością na zaginanie w określonej stronie (np. w wyniku oddziaływania z cząsteczką białka) a naturalnie występującym zagięciem, cechującym pewne cząsteczki DNA w roztworze, bywa w literaturze dość płynne. Odkrycie (pod koniec lat 70.) naturalnie zagiętych cząsteczek DNA nastąpiło w wyniku badania przyczyn powodujących niezrozumiałe spowalnianie tempa migracji pewnych fragmentów DNA w trakcie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Okazało się, że niektóre cząsteczki DNA, np. takie, które zawierały bakteryjny rejon *att* (miejsce integracji bakteriofaga λ), a także fragmenty restrykcyjne otrzymane po trawieniu minikólek mitochondrialnego DNA z *Trypanosoma* (DNA kinetoplastowy) wykazują zagięcie osi heliksu, które jest naturalną właściwością DNA (nie wynika z oddziaływania z innymi ligandami).

Zaginanie się DNA wzdłuż osi podłużnej umożliwia jego oddziaływanie z wieloma różnymi powierzchniami białkowymi. Klasycznym przykładem kompleksu, którego powstaniu sprzyja naturalne zagięcie DNA, jest nukleosom.

W nukleosomie, który jest podstawową jednostką strukturalną chromosomów eukariotycznych, wokół zbudowanej z białek histonowych cząstki rdzeniowej owinięte są w postaci lewoskrętnego superheliksu (superhelikalne formy DNA opisane są w dalszej części rozdziału) niemal dwa pełne zwoje DNA. Długość DNA stanowiącego jeden zwój wynosi 80 par zasad. Klug i współpracownicy (Cambridge, Anglia), na podstawie analizy sekwencji kilkuset fragmentów DNA wyizolowanych z oczyszczonych pojedynczych nukleosomów, stwierdzili występowanie w nich charakterystycznych preferencji dotyczących periodyczności rozmieszczenia określonych motywów sekwencyjnych. I tak, motyw:

A A

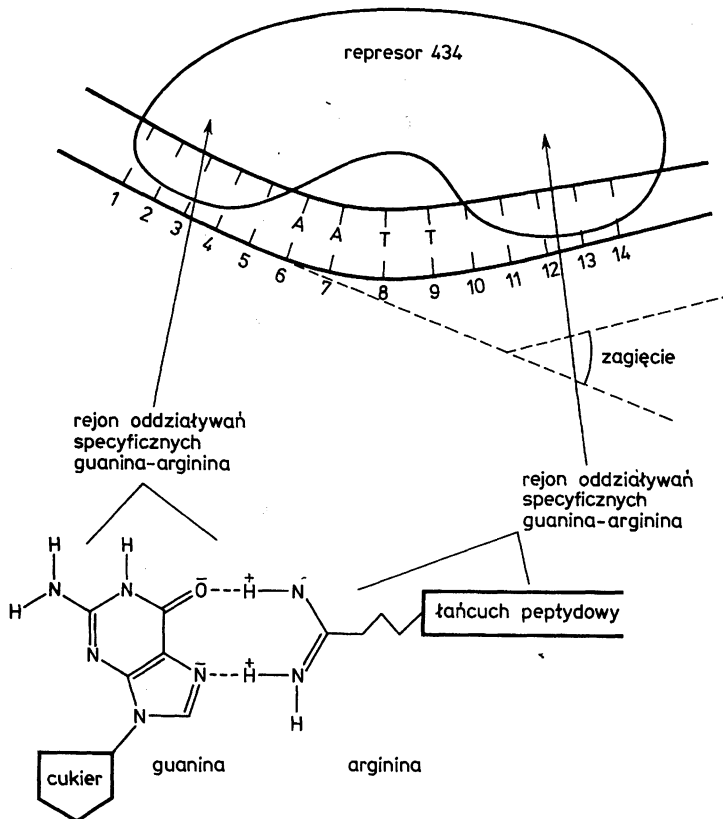
T T

(który zapisywać będziemy jako AA/TT) rozmieszczony jest preferencyjnie z periodycznością odpowiadającą skokowi podwójnej spirali w taki sposób, że mniejsza bruzda skierowana jest do wewnątrz superheliksu, w stronę powierzchni cząstki rdzeniowej.

Z identyczną preferencją co do periodyczności, lecz przesunięte o 5 par zasad w stosunku do miejsc zajmowanych przez AA/TT i z mniejszą bruzdą skierowaną na zewnątrz, występują dwunukleotydy GC. Wzór rozmieszczenia motywów AA/TT (charakteryzujących się zwężoną mniejszą bruzdą) i GC powtarza się zatem periodycznie co jeden skok podwójnego heliksu (w nukleosomowym DNA odpowiada to ok. 10,2 par zasad). Ze względu na charak-

terystyczną geometrię odcinków oligo(dA)—oligo(dT) rozmieszczenie ich w postaci krótkich sekwencji (4–6 par zasad) w fazie odpowiadającej skokowi heliksu powoduje zaginanie się DNA w jedną stronę. Efekt ten związany jest z powtarzającym się w fazie zwężeniem mniejszej bruzdy. Tego rodzaju preferencyjne rozmieszczenie motywów sekwencyjnych w DNA jest prawdopodobnie głównym czynnikiem wyznaczającym położenie cząstki rdzeniowej w stosunku do sekwencji DNA, czyli tzw. pozycjonowanie nukleosomów. Nukleosomy układają się więc tak, by dopasować się do mechanicznych właściwości DNA, a nie do specyficznych sekwencji zasad. Właściwości mechaniczne podwójnego heliksu determinowane są oczywiście przez określone rozmieszczenie zasad. Jest to zatem jeszcze jeden element, który należy brać pod uwagę w rozpatrywaniu sposobów i kierunków ewolucji sekwencji DNA.

Zaginanie DNA występuje także w przypadku jego oddziaływania z białkami innymi niż histony. Jednym z lepiej poznanych przykładów jest tworzenie kompleksu między DNA a fagowym „białkiem 434” (zwanym też represorem 434), pełniącym funkcję represora transkrypcji. Sekwencja DNA, którą rozpo-



Rys. 2.13. Wiązanie represora 434 z sekwencją rozpoznającą obejmuje dwa etapy: docking i sondowanie charakterystycznych sekwencji w celu wytworzenia wiązań wodorowych między resztami argininy a atomami azotu i tlenu w guaninie

znaje represor 434 liczy 14 par zasad i zawiera sekwencję AATT. Sekwencja ta działa podobnie, jak analogiczna sekwencja w DNA nukleosomowym; umożliwia zaginanie się DNA wokół cząsteczki białka represora 434. Zmiana tej sekwencji na taką, która nie wykazuje szczególnej podatności na zaginanie, np. na sekwencję GGCC, powoduje ok. 300-krotne zmniejszenie powinowactwa represora do całego rozpoznawanego fragmentu DNA. Dopiero po wygięciu rozpoznawanego odcinka DNA, odpowiednie domeny białka represora mogą „wypróbować” charakterystyczne sekwencje DNA rozmieszczone po obu stronach wygięcia (rys. 2.13).

W wielu przypadkach rozpoznawanie przez białko (lub innego rodzaju ligand) specyficznej sekwencji DNA przebiega w podobnym do opisanego wyżej, dwustopniowym procesie. Najpierw dochodzi do rozpoznania ogólnej geometrii DNA (określonej np. przez charakterystyczne wygięcia) i chwilowego zakotwiczenia ligandu (ang. docking), później zaś następuje właściwe „sondowanie” układu zasad na dnie mniejszej lub większej bruzdy. Rozpoznawana sekwencja DNA musi zatem zawierać zarówno informację geometryczną umożliwiającą docking, jak i odpowiedni układ zasad odpowiadający charakterystycznemu ułożeniu podstawników w ligandzie. Ciekawe, że w przypadku wiązania się z DNA niektórych specyficznie z nim oddziałujących białek (np. represora tryptofanowego z *E. coli*, który łączy się z liczącym 186 par zasad odcinkiem operatorowym) w ogóle nie dochodzi do tworzenia wiązań wodorowych między zasadami a aminokwasami. Specyficzność wiązania dimerycznego represora tryptofanowego zależy w całości od zdolności operatora do przyjmowania ogólnej konformacji, która umożliwia optymalny kontakt z ligandem.

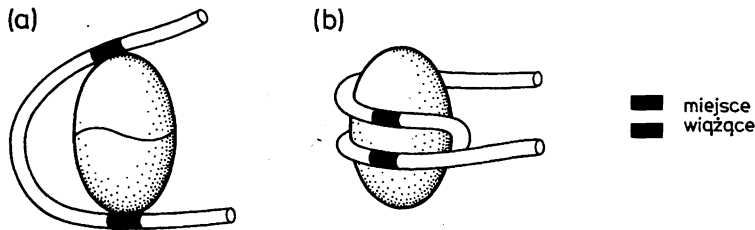
2.7. Architektura DNA a inicjacja transkrypcji

Wiele białek funkcjonujących jako tzw. czynniki transkrypcyjne (p. rozdz. 8) nie oddziałuje ze specyficznymi sekwencjami (np. w rejonie promotora transkrypcji), lecz wywiera efekt przez kontrolę konformacji DNA. Białka te powodują, że konkretny rejon DNA przybiera określoną formę przestrzenną (architekturę), co umożliwia dopiero dołączenie innych składników kompleksu transkrypcyjnego.

Dobrym przykładem, ilustrującym działanie tego typu „architektonicznych” czynników transkrypcyjnych, jest dimeryczne białko UBF, czynnik transkrypcyjny specyficzny dla genów kodujących rRNA dużej podjednostki rybosomalnej. Dimer UBF zawiera 10 charakterystycznych domen (tzw. domen HMG) wiążących DNA. Każda z domen może potencjalnie powodować zagięcie heliksu DNA o 130° (jedna domena HMG oddziałuje z fragmentem o długości 20 par zasad). Rozkład domen w dimerze UBF jest bardzo charakterystyczny i umożliwia wiązanie z DNA w taki sposób, że każda z nich oddziałuje z rejonami odległymi o dwa pełne skoki heliksu. Ponieważ miejsca

wiązania w DNA wypadają w związku z tym stale po tej samej stronie heliksu, cały fragment o długości ok. 200 par zasad owija się ściśle wokół dimeru UBF. Przypomina to bardzo owinięcie DNA wokół rdzeniowej cząstki nukleosomu. Wymuszenie tego rodzaju architektury DNA służy prawdopodobnie do zbliżenia i precyzyjnego zorientowania względem siebie (np. co do kierunku przebiegu i stron heliksu) dwóch (lub więcej) miejsc wiążących inne czynniki transkrypcyjne. W przypadku UBF może to być czynnik transkrypcyjny, zwany SL1, którego dwa miejsca wiążące (znajdują się one we fragmencie DNA, z którym wiąże się UBF) odległe są od siebie o 120 par zasad.

Podobną rolę czynnika architektonicznego, determinującego zdolność do transkrypcji, mogą spełniać umieszczone w specyficznych miejscach nukleosomy. Na przykład, w rejonie LTR (ang. long terminal repeat) wirusa powodującego raka sutka u myszy znajduje się specyficznie umiejscowiony nukleosom, którego DNA zawiera dwa odległe o 80 par zasad miejsca wiązania receptora glukokortykoidów. Miejsca te są zbliżone i precyzyjnie zorientowane

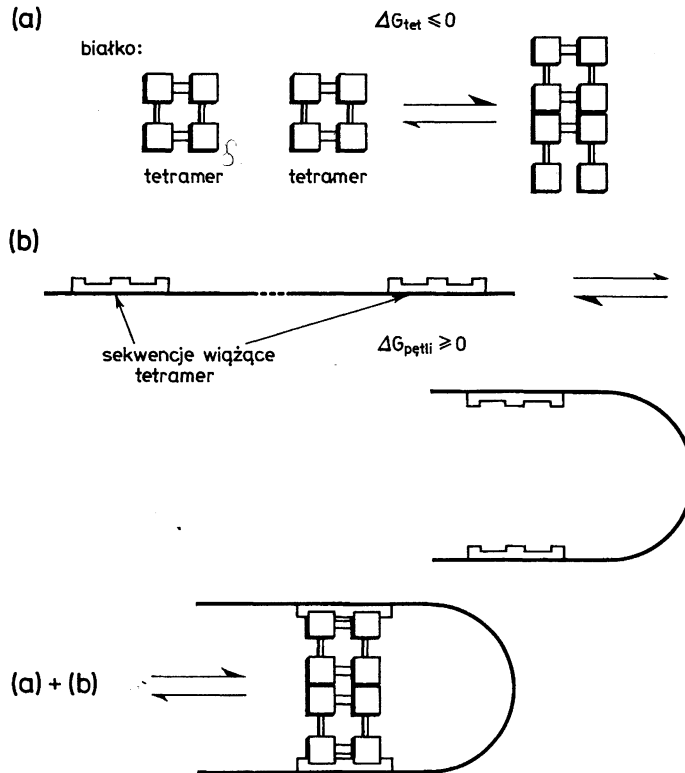


Rys. 2.14. Czynniki powodujące zmianę architektury DNA. (a) Owinięcie DNA wokół dimerycznego białka UBF. (b) Owinięcie DNA wokół białkowego rdzenia nukleosomu (wg Calladine, Drew, Understanding DNA; The Molecule & How It Works. Academic Press)

w stosunku do siebie na skutek owinięcia DNA wokół powierzchni nukleosomu. Przypuszcza się, że właśnie taka orientacja jest niezbędna do inicjacji przez receptor glukokortykoidów lokalnego rozdysocjowania chromatyny i rozpoczęcia transkrypcji. Podobnie, w genie witelogeniny u żaby *Xenopus laevis* pozycjonowany nukleosom umożliwia zbliżenie rejonów promotorowego oraz enhancerowego i w konsekwencji — preinicjację transkrypcji. Zasadę działania pozycjonowanych nukleosomów i białek typu UBF zilustrowano na rysunku 2.14.

2.8. Pętle w DNA

W odróżnieniu od oddziaływań wymagających ścisłego owinięcia DNA wokół cząsteczki białka (np. w nukleosomie lub kompleksie z represorem 434) naturalne zagięcie, a tym samym charakterystyczne rozmieszczenie sekwencji typu AA/TT, ma znacznie mniejsze (lub żadne) znaczenie w przypadku dużych pętli, powstających na skutek kooperatywnych oddziaływań między białkami



Rys. 2.15. Tworzenie pętli na skutek kooperatywnego oddziaływania białek łączących się z odległymi od siebie rejonami DNA

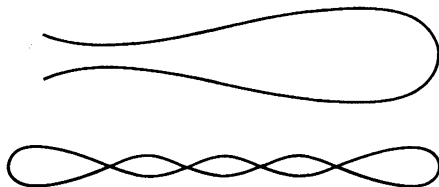
wiązającymi się w odległych od siebie rejonach DNA. Powstawanie tego rodzaju pętli występuje np. w przypadku wiązania się represora λ do leżących zdalek od siebie miejsc operatorowych, w przypadku wielu białek związanych z regulacją transkrypcji u prokariotów (np. represor Lac), a także białek biorących udział w replikacji i rekombinacji DNA (rys. 2.15). Geometria pętli zależy od jej wymiarów (im jest dłuższa, tym mniejsze zgięcie przypada na jedną parę nukleotydów), a także od tego, czy miejsce wiązania cząsteczek białka znajduje się po tej samej, czy po przeciwnych stronach heliksu. W tym drugim przypadku oprócz zginania DNA potrzebna jest jeszcze zmiana kąta skręcenia podwójnego heliksu lub stopnia jego superhelikalności.

2.9. Superhelikalne formy DNA

Cząsteczka DNA, której końce zostały unieruchomione, pod wpływem powstających w niej napięć torsyjnych może ulegać dodatkowo (w stosunku do wewnętrznego skręcenia podwójnego heliksu) zwinieniu w przestrzeni. W istocie, tylko w praktyce laboratoryjnej mamy do czynienia z niewielkimi

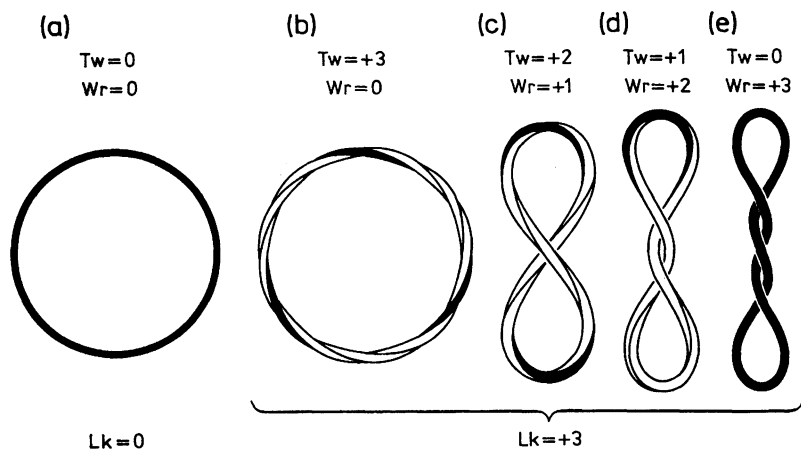
liniowymi cząsteczkami DNA o wolnych końcach. Takie cząsteczki nie wykazują oczywiście napięć wewnętrznych. Te ostatnie, jeśli powstają, są natychmiast neutralizowane przez obrót wolnych końców cząsteczki wokół osi podłużnej heliksu. *In vivo* DNA rzadko występuje w postaci krótkich odcinków z wolnymi końcami. W komórkach bakterii zarówno główny chromosomowy DNA, jak i DNA plazmidów nie mają wolnych końców, ich cząsteczki mają formę zamkniętego koła. W komórkach eukariontów DNA chromosomowy zorganizowany jest w domeny o kształcie pętli, których podstawy unieruchomione są w macierzy jądrowej. Pojedyncza pętla zachowuje się pod wpływem napięć wewnętrznych tak, jak DNA z unieruchomionymi końcami lub DNA kolisty.

Przyczyną powstawania napięć torsyjnych w cząsteczce DNA jest każda zmiana stopnia wewnętrznego skręcenia podwójnego heliksu, która nie może być zneutralizowana przez obrót wolnych końców. W długich cząsteczkach DNA łatwo dochodzi do powstania lub utraty kilku skrętów heliksu. Na ogół jest to uboczny efekt procesów, w których DNA ulega lokalnemu rozpleceniu (np. podczas transkrypcji, replikacji lub naprawy), może także to wynikać z dodania lub wypadnięcia nukleosomu. W celu zilustrowania efektów zmiany stopnia skręcenia DNA często przytacza się łatwe do wykonania doświadczenie z fragmentem przewodu elektrycznego lub papierowej taśmy. Jeżeli, unieruchomiwszy jeden z końców przewodu, skręcimy drugi kilkakrotnie wokół osi podłużnej, a następnie połączymy na stałe oba końce, to kolisty przewód, zamiast leżeć płasko na stole, ulegnie zwinięciu w przestrzeni, równoważąc w ten sposób napięcia wewnętrzne (rys. 2.16).



Rys. 2.16. Fragment przewodu elektrycznego, do którego wprowadzono wewnętrzne napięcie, unieruchamiając jeden z końców i kilkakrotnie skręcając drugi, a następnie łącząc na stałe oba końce. Zamknięty przewód przyjmuje postać superzwiniętą, by zrównoważyć napięcia torsyjne

Zwinięte w przestrzeni, koliste cząsteczki DNA przyjęto nazywać formami superhelikalnymi DNA. Superskręcenie kolistych cząsteczek jest właściwością topologiczną, można je zatem opisać posługując się terminami z dziedziny topologii. W odniesieniu do kolistych cząsteczek DNA opis taki zastosowali po raz pierwszy matematycy James White i Brock Fuller. Za topologiczną przyjmuje się taką właściwość DNA, która (w odróżnieniu od właściwości geometrycznych) nie ulega zmianie pod wpływem odkształceń ciągłych, tj. takich, które nie naruszają integralności szkieletu cząsteczki. Będą to odkształcenia konformacyjne, powstające pod wpływem ciepła lub wiązania się z biał-



Rys. 2.17. Właściwości topologiczne DNA można opisać za pomocą wielkości T_w i W_r . (a) Kolistą cząsteczką DNA w postaci całkowicie zrelaksowanej (a), (b), (c), (d), (e) Formy tej samej cząsteczki z różną liczbą dodatkowych skrętoń

kami i innymi ligandami. W przeciwieństwie do nich odkształcenia nieciągłe, które polegają na przecięciu jednej lub obu nici DNA, np. na skutek działania nukleaz, topoizomeraz, promieni UV itp. zmieniają topologiczne właściwości cząsteczki. Na rysunku 2.17 zilustrowano sens fizyczny dwóch wielkości charakteryzujących superhelikalne cząsteczki DNA (w rzeczywistości wielkości te nadają się do opisu każdej struktury, którą można przedstawić za pomocą połączonej w koło, dwustronnej taśmy).

T_w , czyli liczba skrętoń (ang. twist), wskazuje ile razy tworzący koło DNA został skręcony. Dla DNA, który jest rozkręcony w stosunku do cząsteczki w stanie zrelaksowanym, T_w ma wartość ujemną. Jeżeli DNA został dodatkowo skręcony w stosunku do formy zrelaksowanej, to charakteryzuje go dodatnia wartość T_w .

W_r , czyli liczba zwojów (ang. writhe), wskazuje ile razy dana cząsteczka DNA krzyżuje (przeplata) się ze sobą. W przypadku cząsteczki DNA, do której, przed połączeniem końców, nie wprowadzono żadnych dodatkowych skrętoń (podwójny heliks nie został rozkręcony ani dodatkowo skręcony) — zarówno wartość T_w , jak i W_r wynosi 0 (rys. 2.17(a)).

Wprowadzenie kilku dodatkowych skrętoń przed zamknięciem cząsteczki (w przypadku DNA dodatkowe skręcenie podwójnego heliksu) powoduje zmianę T_w . Cząsteczka DNA na rysunku 2.17(b) ma $T_w = 3$ (wprowadzono do niej trzy dodatkowe skręty). Leży ona płasko na powierzchni, a DNA w żadnym punkcie nie krzyżuje się ze sobą. W_r tej cząsteczki wynosi zatem 0. Każde skrzyżowanie cząsteczki odbywa się kosztem zmniejszenia o 1 wartości T_w (rys. 2.17(c), (d) i (e)).

W trakcie przekształceń topologicznych kolistych cząsteczek DNA (rys. 2.17) zmianie ulegają wartości T_w i W_r , niezmienna pozostaje jednak ich

suma. Wielkość ta nosi nazwę liczby opleceń i wyrażana jest symbolem Lk (ang. linking number). Jak wynika z naszej analizy Lk jest niezależna od kształtu cząsteczki i może się zmienić tylko wtedy, gdy DNA zostanie przecięty. Lk jest miarą liczby opleceń wokół siebie dwóch nici w podwójnym heliksie DNA. W gruncie rzeczy wskazuje ona o ile więcej lub mniej tych opleceń występuje w danej cząsteczce DNA w stosunku do liczby opleceń w tej samej cząsteczce w formie całkowicie zrelaksowanej. Lk przyjmuje tylko wartości całkowite, ponieważ przecięte nici DNA mogą się ze sobą powtórnie połączyć tylko po wykonaniu całkowitego obrotu.

Wartość Lk w kolistych cząsteczkach DNA można mierzyć doświadczalnie. Od wielkości Lk zależy szybkość migracji superhelikalnego DNA w trakcie elektroforezy w żelu agarozowym. Im wyższa wartość Lk (niezależnie od znaku), tym szybciej migruje w żelu kolistą cząsteczka DNA. Z tego powodu w preparatach plazmidowego DNA, analizowanych za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, prążek odpowiadający formie superhelikalnej obserwuje się poniżej prążka odpowiadającego cząsteczce zrelaksowanej. Jeżeli zmierzy się Lk i wyznaczy wartość Wr dla cząsteczki o znanej liczbie zasad (N) można podać liczbę zasad (h) przypadającą na skok podwójnej spirali:

$$h = N/Lk - Wr \quad \text{lub} \quad h = N/Tw.$$

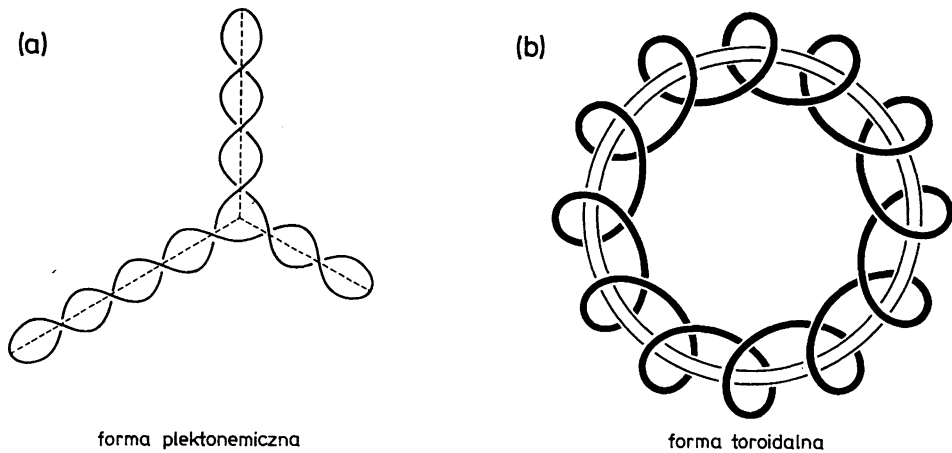
Jest to jedna z metod wyznaczania liczby par zasad, przypadającej na jeden skok heliksu DNA.

2.10. Solenoidowe (toroidalne) i plektonemiczne (przeplecione) superzwinięcie DNA

W cząsteczkach DNA superhelikalność może powstawać z dwóch powodów. Może ona powstać na skutek zmiany liczby skrętów w cząsteczce wyjściowej (zwykle jako wynik częściowego rozkręcenia). Liczba superskrętów jest wprost proporcjonalna do zmiany w Lk: ($\Delta Lk = Lk - Lk_0$, gdzie Lk_0 jest wartością charakteryzującą cząsteczkę wyjściową). W przypadku, gdy zmiana taka zachodzi w kolistej cząsteczce DNA w roztworze, cząsteczka ta przybiera postać plektonemicznie superzwiniętego (przepleczonego) DNA (rys. 2.18(a)).

Drugą powszechną przyczyną superhelikalności jest owijanie się podwójnego heliksu DNA wokół białkowych rdzeni (jak np. w nukleosomie lub kompleksie DNA z białkiem — resolwą) (rys. 2.18(b)). Samo owinięcie DNA wokół rdzenia nie powoduje zmiany Lk. *In vivo* jednak, owijanie się DNA z unieruchomionymi końcami wokół białkowych rdzeni powoduje powstanie dodatkowych kompensujących superskrętów, które są następnie usuwane przez topoizomerazy, co w rezultacie prowadzi do zmiany Lk.

Jakie znaczenie biologiczne ma superhelikalność DNA? Jej rola jest najbardziej istotna w tych procesach, których inicjacja wymaga częściowego rozplecenia podwójnego heliksu DNA, a więc w replikacji i transkrypcji. Z analizy



Rys. 2.18. Plektonemiczne (przeplecione) i solenoidowe (toroidalne) zwinięcie DNA. Jako rezultat superzwinięcia DNA może przeplatać się wielokrotnie tworząc formy plektonemiczne (a) lub owijając się wokół sferycznego rdzenia tworząc formy toroidalne (b)

topologicznej zamkniętych cząsteczek DNA wynika, że zmiany T_w mogą być niwelowane przez odpowiednie zmiany W_r . Oznacza to, że częściowo rozkręcona cząsteczka DNA (kolista lub o unieruchomionych końcach) przyjmuje korzystniejszą energetycznie formę topologiczną o wyższej wartości W_r (przeplecioną lub owiniętą wokół białkowego rdzenia, jak w nukleosomie). W rzeczywistości może ona jednak oscylować między formą o wysokim T_w i niskim W_r oraz formą o niskim T_w i wysokim W_r (L_k nie ulega zmianie). Tego rodzaju oscylacje, w obecności odpowiednich czynników białkowych, mogą ułatwiać rozpoczynanie procesów replikacji i transkrypcji. Wiele genów ulega wydajnej transkrypcji tylko wtedy, gdy zawierający je DNA jest superskręcony (naturalnie występujące DNA cechuje superskręcenie ujemne). Wspomniane oscylacje mogą także sprzyjać powstawaniu szczególnych struktur DNA (np. struktur krzyżowych) w rejonach, w których występują odpowiednie sekwencje zasad.

3. REPLIKACJA DNA

Replikacja DNA jest procesem zapewniającym przekazywanie informacji genetycznej z komórek rodzicielskich do komórek potomnych w sposób prawie doskonały. Doskonałość ta jest osiągnięta nie tylko dzięki bardzo precyzyjnemu mechanizmowi polimeryzacji nowych łańcuchów DNA, lecz także dzięki udziałowi systemów ochronnych, zdolnych do wykrywania i naprawy wszelkiego typu błędów i uszkodzeń w DNA, powstałych albo podczas replikacji, bądź w cząsteczce już zreplikowanej. Oba systemy — syntezy i naprawy DNA — są zdolne do odróżniania własnych nici DNA od nici obcych, nici uszkodzonych od nici prawidłowych oraz nici rodzicielskich od nowo zsyntetyzowanych i do natychmiastowego włączania działań niezbędnych do zachowania niezmięnionej budowy własnego DNA. Dzięki tym systemom błędy powodujące powstawanie mutacji pojawiają się w żywych organizmach niezmiernie rzadko, średnio raz na 10^9 – 10^{10} prawidłowo włączonych nukleotydów.

Chociaż podstawowy mechanizm replikacji został niejako intuicyjnie przewidziany w roku 1953 przez Watsona i Cricka, w stwierdzeniu: „każdy łańcuch DNA służy jako matryca do budowy nowego, identycznego łańcucha DNA”, poznawanie szczegółów tego mechanizmu zajęło wiele lat i do dzisiaj nie zostało zakończone. Przybywają stale liczne nowe, ważne informacje, które składają się na coraz doskonalszy obraz procesu przekazywania informacji genetycznej. Z konieczności więc informacje o przebiegu procesu replikacji DNA przedstawione w niniejszym rozdziale zostały ograniczone tylko do wiadomości według oceny autora najważniejszych.

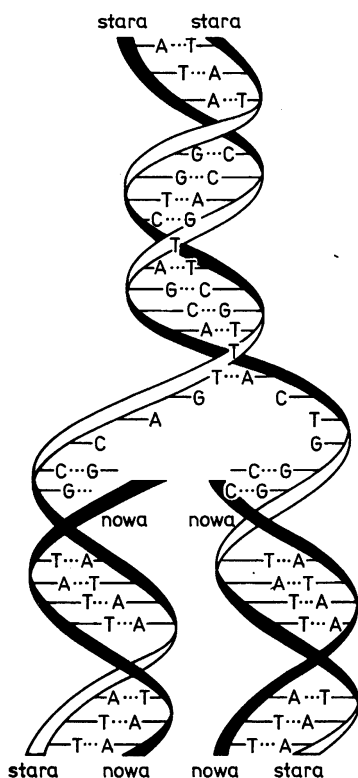
3.1. Podstawowe reguły procesu replikacji DNA

Jednym z najbardziej fascynujących odkryć współczesnej biologii jest stwierdzenie uniwersalności podstawowych procesów biochemicznych zachodzących w żywych komórkach. Dotyczy to zarówno biosyntezy podstawowych

cegiełek budulcowych wszystkich organizmów, jak: aminokwasy, cukry, kwasy tłuszczowe czy nukleotydy, jak i budowania z tych cegiełek białek, skrobi, tłuszczów czy kwasów nukleinowych. W replikacji DNA procesy zachowane w ciągu ewolucyjnym i wspólne dla wszystkich komórek dają się ująć w następujące reguły.

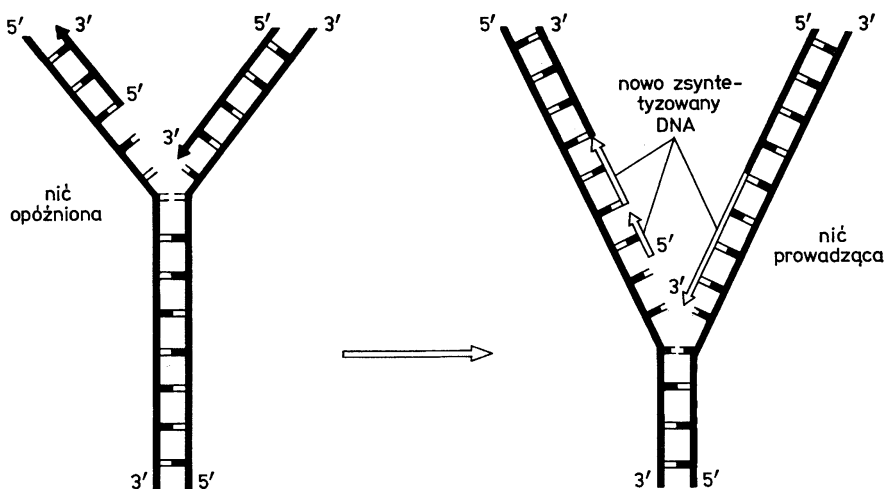
3.1.1. Replikacja jest procesem semikonserwatywnym

Synteza nowych nici DNA może zachodzić tylko z udziałem nici rodzicielskich służących jako matryce. Są one dokładnie kopiowane, dając w efekcie dwie identyczne, nowe cząsteczki dwuniciowego DNA, z których każda zawiera jedną nić pierwotną i jedną nowo zsyntetyzowaną (rys. 3.1).



Rys. 3.1. Model replikacji dwuniciowej cząsteczki DNA, zaproponowany w roku 1953 przez Watsona i Cricka

Rozdzielające się w miejscu syntezy łańcuchy matrycowego DNA tworzą „widelki replikacyjne”. Ponieważ wszystkie polimerazy DNA katalizują dołączanie pojedynczych trifosforanów nukleotydowych tylko do wolnej grupy 3'-OH, synteza DNA może przebiegać tylko w jednym kierunku — od końca 5' do 3'. Ponieważ obie nici matrycowe, zorientowane względem siebie w przeciwnych kierunkach (p. budowa DNA), są kopiowane w obrębie tych samych widelków jednocześnie, tylko jedna z powstających nowych nici



Rys. 3.2. Budowa widełek replikacyjnych

DNA może być wydłużana w sposób ciągły, zgodnie z kierunkiem przesuwania się widełek. Druga musi być syntetyzowana w kierunku przeciwnym do ruchu widełek, w postaci krótkich fragmentów (fragmentów Okazaki, nazwanych tak na cześć ich odkrywcę — Reiji Okazaki) łączonych następnie w jedną ciągłą nić. Widełki replikacyjne mają więc strukturę asymetryczną (rys. 3.2). Nić syntetyzowana w sposób ciągły w kierunku ruchu widełek nosi nazwę nici prowadzącej (ang. leading strand), a nić syntetyzowana w sposób nieciągły — nici opóźnionej (ang. lagging strand). O prawdziwości takiej struktury widełek replikacyjnych świadczą ich obrazy uzyskane w nowoczesnych mikroskopach elektronowych. Na zdjęciach widać jednoniciowe regiony DNA, zawsze po jednej stronie widełek. Jeśli widełki replikacyjne poruszają się jednocześnie w obu kierunkach, każda z nici rodzicielskiego DNA jest jednocześnie matrycą dla syntezy nici prowadzącej (w jednym kierunku) i nici opóźnionej (w kierunku przeciwnym).

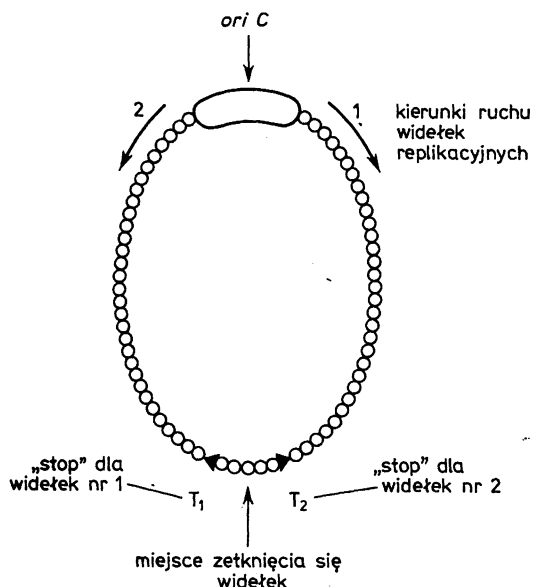
3.1.2. Inicjacja replikacji zachodzi w ściśle określonych sekwencjach nukleotydów zgromadzonych w specyficznych miejscach chromosomu, zwanych „origin”

W organizmach tak ewolucyjnie odległych, jak bakterie i ssaki, podstawowe etapy procesu replikacji przebiegają w sposób bardzo podobny. W ściśle określonym miejscu (lub miejscach) genomu nici DNA rozdzielają się tworząc „oczko” lub „widełki” replikacyjne. Miejsce to zawiera specyficzne sekwencje, z których jedne służą do wiązania białek inicjatorowych, w obrębie innych nici rozdzielają się umożliwiając rozpoczęcie replikacji, a jeszcze inne służą do przyłączenia białek wspomagających proces replikacji. Bez względu na to, czy komórka ma tylko jeden chromosom, czy też ma ich wiele, DNA ulega

replikacji zawsze tylko raz na każdy cykl podziałowy. Inicjacja replikacji jest więc sygnałem, od którego rozpoczyna się podział komórki i z tego względu podlega bardzo ścisłej i precyzyjnej kontroli. Przyjęło się nazywać miejsca inicjacji replikacji angielskim terminem „origin” (*ori*).

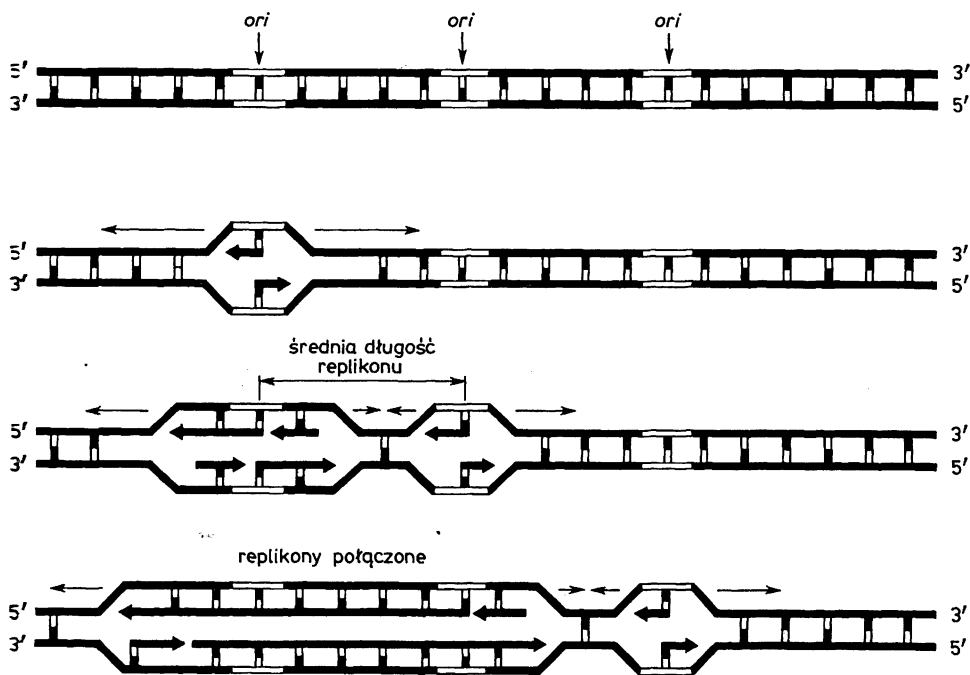
3.1.3. Replikon — jednostka replikacji

Za jednostkę replikacji (replikon) przyjęto uważać odcinek DNA, zawierający miejsce inicjacji replikacji oraz wszystkie sekwencje fizycznie do niego przylegające, które są pod jego kontrolą i replikują się razem z nim. Replikon może też zawierać sygnały kończące replikację (rys. 3.3). Ponieważ replikacja



Rys. 3.3. Model replikonu *E. coli*. Specyficzne miejsca inicjacji replikacji DNA oznaczone jest symbolem *ori C*. Miejsca terminacji replikacji, oznaczone literami T₁ i T₂, znajdują się po przeciwnej stronie genomu, poza rzeczywistym miejscem zetknięcia się widełek

jest kontrolowana tylko na poziomie inicjacji, raz rozpoczęta — przebiega aż do zakończenia syntezy całego replikonu. W bakteriach replikon obejmuje cały chromosom, stąd też pojedyncze miejsce inicjacji kontroluje replikację całego genomu, włączając ten proces tylko jeden raz na każdy cykl podziału komórkowego. W chromosomach organizmów eukariotycznych replikacja rozpoczyna się jednocześnie w wielu miejscach inicjacji rozmieszczonych wzdłuż chromosomowego DNA (rys. 3.4); komórki tych organizmów mają więc bardzo wiele replikonów w każdym chromosomie. Replikony te są relatywnie małe, a szybkość syntezy DNA w chromosomach eukariotów jest mniejsza o jeden do dwóch rzędów wielkości w porównaniu do bakterii (tab. 3.1). Mimo to szybkość replikacji całego genomu eukariotycznego wielokrotnie przewyższa szybkość replikacji genomu bakteryjnego. Dzieje się tak dzięki jednoczesnemu włączaniu bardzo wielu replikonów. Na przykład w komórkach embrionalnych *Drosophila* czas replikacji całego genomu wynosi 3 min, przy szybkości syntezy



Rys. 3.4. Eukariotyczny DNA zawiera wiele replikonów, które mogą ulegać aktywacji w różnym czasie

Tabela 3.1. Charakterystyka replikonów eukariotycznych

Organizm	Liczba replikonów na genom	Średnia wielkość replikonu (Kb)	Szybkość replikacji (nukl./min)
Bakterie (<i>E. coli</i>)	1	4 700	50 000
Drożdże (<i>S. cerevisiae</i>)	500	40	3 600
Owady (<i>D. melanogaster</i>)	3 500	40	2 600
Płazy (<i>X. laevis</i>)	15 000	65–300	500
Ssaki (<i>M. musculus</i>)	25 000	150	2 200
Rośliny (<i>V. faba</i>)	35 000	300	—
Rośliny (<i>P. sativum</i>)	22 000	65–450	—

DNA ok. 20-krotnie mniejszej niż w komórkach bakterii i długości DNA 40-krotnie większej, podczas gdy czas replikacji genomu bakteryjnego wynosi 40 min. Wielkość replikonów eukariotycznych może się zmieniać w zależności od tego czy replikacja DNA zachodzi w komórkach embrionalnych, czy w dojrzałych komórkach somatycznych. Świadczy to, że replikony eukariotyczne nie mają wbudowanych sygnałów końca replikacji. Wydaje się, że miejsca inicjacji, aktywne w czasie rozwoju embrionalnego, stają się nieaktywne w późniejszych fazach rozwoju, co wydatnie zwiększa wielkość replikonów, zwalniając jednocześnie szybkość replikacji. Ponieważ w cyklu komórkowym

każdy replikon może ulegać aktywacji tylko jeden raz, a wiadomo, że nie wszystkie replikony są aktywowane jednocześnie, powstaje problem — w jaki sposób replikony już zreplikowane są odróżniane od tych, które dopiero czekają na swoją kolej. Próby wytłumaczenia mechanizmów regulacji kolejności włączania replikonów znajdują się jeszcze w stadium hipotez.

3.1.4. Replikacja DNA jest inicjowana przez krótkie odcinki RNA służące jako startery dla polimerazy DNA

Polimerazy DNA nie mogą rozpocząć syntezy nowych łańcuchów DNA, mogą je tylko wydłużać. Dlatego synteza DNA zaczyna się od budowania krótkich odcinków RNA o wolnych grupach końcowych 3'-OH (starterów), do których polimerazy DNA dołączają kolejne trifosfonukleotydy. Poza nielicznymi wyjątkami za syntezę tych odcinków RNA odpowiedzialne są wyspecjalizowane enzymy — primazy. Synteza starterów jest niezbędna zarówno w rozpoczynaniu nowej rundy replikacyjnej w miejscu inicjacji, jak i w syntezie fragmentów Okazaki. Przed połączeniem fragmentów w jedną ciągłą nici startery są wycinane i usuwane, a powstałe przerwy uzupełniane.

Replikacja nie zawsze rozpoczyna się od starterowego RNA. Może rozpocząć się przez kowalencyjne dołączanie nukleotydów do wolnej grupy 3'-OH w miejscu przecięcia jednej z nici dupleksu lub przez wydłużanie jednolitego końca DNA zwiniętego w formę „szpilki do włosów”, może też rozpoczynać się od terminalnego białka, z wykorzystaniem do inicjacji grupy —OH jednego z aminokwasów.

3.1.5. Replikacja DNA sterowana jest przez duże, wieloenzymatyczne kompleksy

W obrębie widełek replikacyjnych, oprócz polimerazy DNA i primazy, współdziała jednocześnie wiele białek zapewniających płynny przebieg replikacji. Tworzą duże kompleksy, dla których przyjęto nazwę replizomu, podobnie jak dla kompleksu inicjacyjnego — primozomu.

3.1.6. Struktura chromosomów wywiera wpływ na proces replikacji

Kształt cząsteczki DNA — czy jest kolistą czy liniową, jedno- czy dwuniciową — decyduje o mechanizmie jej replikacji. Szczególnie istotny wpływ na proces replikacji ma konformacja chromosomów, a mianowicie ich stan zwinięcia superhelikoidalnego, struktura dwuniciowego heliksu, podatność na zginanie oraz łatwość rozdzielania nici podwójnego heliksu w miejscach inicjacji. Zależy to od wielu czynników, które wywierając wpływ na replikację, nie zawsze muszą brać w niej bezpośredni udział.

3.1.7. Replikacja DNA jest ściśle związana z procesem transkrypcji

Związki między obu tymi procesami wyrażają się nie tylko przez syntezę starterowego RNA. Transkrypcja okazała się niezbędna także do aktywowania miejsc inicjacji replikacji DNA, zarówno w komórkach bakterii, jak i w komórkach eukariontów. Aktywowanie to może być realizowane bądź przez transkrypcję obszaru inicjacji replikacji, bądź też obszarów sąsiednich, nieraz odległych od miejsca inicjacji. W komórkach eukariontów obszary inicjacji aktywowane są przez faktory transkrypcyjne, te same, które aktywują sekwencje promotorowe transkrypcji. Faktory te, łącząc się ze specyficznymi sekwencjami DNA wewnątrz obszarów inicjacji lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie, ułatwiają wiązanie się białek inicjatorowych do sekwencji *ori* albo aktywują utworzony wcześniej kompleks inicjacyjny.

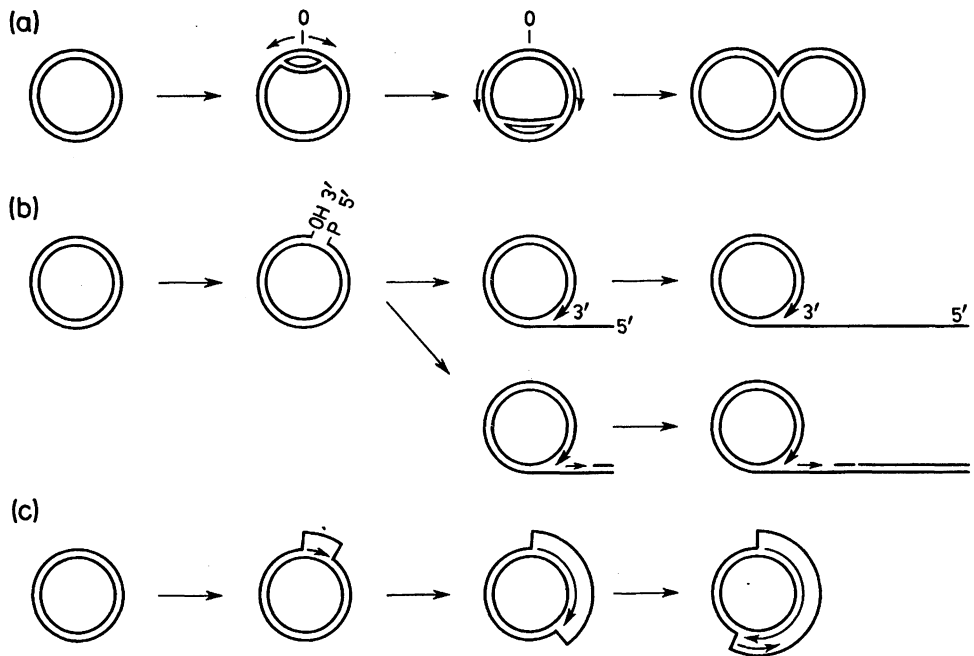
3.1.8. Terminacja replikacji może być zapisana w sekwencji genomu

W DNA komórek bakterii oraz niektórych plazmidów miejsce zakończenia replikacji jest zdefiniowane przez specyficzne sekwencje *ter* (*terminus*), w których widełki replikacyjne ulegają zatrzymaniu. W DNA komórek eukariontów sekwencje te nie występują, a replikacja ulega zakończeniu w momencie zetknięcia się widełek replikacyjnych podążających ku sobie z przeciwnych kierunków. Widełki replikacyjne przyjmują rozmaite kształty.

1. Replikacyjne „oczko” lub forma theta (θ). Jeżeli replikacja DNA rozpoczyna się wewnątrz dwuniciowej struktury chromosomów liniowych lub kolistych, widełki replikacyjne tworzą charakterystyczną strukturę „oczka replikacyjnego”, powiększającego się w miarę oddalania się widełek. Gdy chromosom jest kolisty, powiększające się „oczko” przyjmuje charakterystyczną formę przypominającą grecką literę — θ . (rys. 3.5(a)). Stąd replikację kolistych cząsteczek dwuniciowego DNA określa się często replikacją typu θ .

2. Replikacja wg modelu obracającego się koła. Jeżeli w kolistej cząsteczce DNA replikacji podlega tylko jedna z dwóch nici dupleksu, to synteza rozpoczyna się od przecięcia jednej nici. Wolna grupa 3'-OH utworzona w miejscu przecięcia staje się miejscem startu syntezy DNA, skąd polimeraza DNA wydłuża przeciętą nić, wędrując po kolistej drugiej nici — matrycy — jak po obwodzie koła. Ponieważ powstająca coraz dłuższa cząsteczka jednoniciowego DNA jest połączona kowalencyjnie z nicią macierzystą, może ona zawierać wiele powtórzeń replikowanego genomu. Mechanizm ten może także prowadzić do utworzenia cząsteczki dwuniciowego DNA, jeśli powstająca pojedyncza nić stanie się matrycą dla nici komplementarnej, syntetyzowanej przez fragmenty Okazaki. Ten typ replikacji nosi także nazwę replikacji typu sigma (σ) (rys. 3.5(b)).

3. Replikacja wg modelu przemieszczającej się pętli (D loop, R loop). Ten mechanizm replikacji jest inicjowany bezpośrednio przez transkrypcję. Występuje powszechnie podczas replikacji mitochondrialnego DNA. Transkrypcja



Rys. 3.5. Różne formy widełek replikacyjnych. (a) Forma powiększającego się „oczka”, które w kolistym chromosomie przybiera kształt litery θ . (b) Forma σ lub forma „obracającego się koła” prowadzi do powstawania bardzo długich cząsteczek DNA, jedno- lub dwuniciowych, będących wielokrotnym powieleniem genomu matrycy. (c) Forma powiększającej się pętli (D-loop, R-loop) jest typową formą replikacji DNA, inicjowanej przez polimerazy RNA. W tym typie replikacji miejsca inicjacji replikacji każdej z nici są przestrzennie rozdzielone

przechodząca przez mitochondrialne *ori* odsuwa jedną nić tworząc pętlę. Specyficzne przecięcie nici RNA z wytworzeniem wolnej grupy 3'-OH umożliwia dołączenie się polimerazy DNA i wydłużanie startera, czemu towarzyszy poszerzanie się pętli. Mechanizm ten powoduje asymetryczną replikację DNA. Najpierw synteza DNA przebiega tylko na jednej matrycy, dopiero potem rozpoczyna się na matrycy drugiej (rys. 3.5(c)). Według podobnego mechanizmu przebiega replikacja plazmidu *ColE1*.

3.2. Inicjacja procesu replikacji DNA

Inicjacja replikacji DNA w miejscu *ori* rozpoczyna się zawsze przez przyłączenie się białek inicjatorowych do specyficznych sekwencji DNA wewnątrz tego miejsca. Przyłączone białka powodują zmiany w strukturze DNA ułatwiające otwarcie się „oczka” oraz regulują dołączanie się białek replikacyjnych niezbędnych do rozpoczęcia syntezy DNA.

Jakiegokolwiek zaburzenia procesu replikacji DNA mają zawsze fatalne następstwa dla komórek. Dlatego wszystkie mutanty replikacyjne są zawsze

mutantami warunkowo letalnymi, zwykle wrażliwymi na temperaturę, to znaczy zdolnymi do replikacji, a więc i do wzrostu tylko w określonej temperaturze, zwanej permissyjną. Zwiększenie tej temperatury powyżej pewnej granicy powoduje śmierć komórki — są to warunki restrykcyjne. W komórkach *E. coli* mutanty takie zostały oznaczone symbolem *dna* i w zależności od zachowań w warunkach restrykcyjnych dzielą się na dwie klasy:

(a) mutanty „slow-stop”, wolno reagujące na warunki restrykcyjne, zdolne do zakończenia rozpoczętego cyklu replikacyjnego, lecz niezdolne do rozpoczęcia nowego. Zawierają defekty w białkach odpowiedzialnych za inicjację replikacji DNA;

(b) mutanty „quick-stop”, natychmiast odpowiadające zahamowaniem replikacji po przeniesieniu do warunków restrykcyjnych. Są to mutanty elongacyjne. Ponieważ niektóre enzymy, np. helikazy uczestniczą zarówno w inicjacji, jak i w elongacji replikacji, fenotyp „quick-stop” może dotyczyć także inicjacji. Zaburzenia w syntezie prekursorów syntezy DNA powodują również natychmiastowe zatrzymanie procesu replikacji. Obecnie poznane są praktycznie wszystkie enzymy replikacji DNA w komórkach *E. coli* oraz ich geny, co pozwala sądzić, że mechanizm replikacji DNA w tym organizmie został całkowicie wyjaśniony.

3.2.1. Inicjacja replikacji w dwuniciowej cząsteczce bakteryjnego DNA

Najlepiej poznanym przykładem tego typu inicjacji jest inicjacja replikacji w chromosomie bakterii *E. coli*. W chromosomie tym jest tylko jedno miejsce inicjacji, położone na 84 min mapy genetycznej i nosi nazwę *oriC*. Obejmuje 245 par zasad o bardzo charakterystycznej strukturze, typowej dla całej rodziny *Enterobacteriaceae* (rys. 3.6.). Występują w niej cztery 9-nukleotydowe fragmenty o identycznej sekwencji nukleotydów:

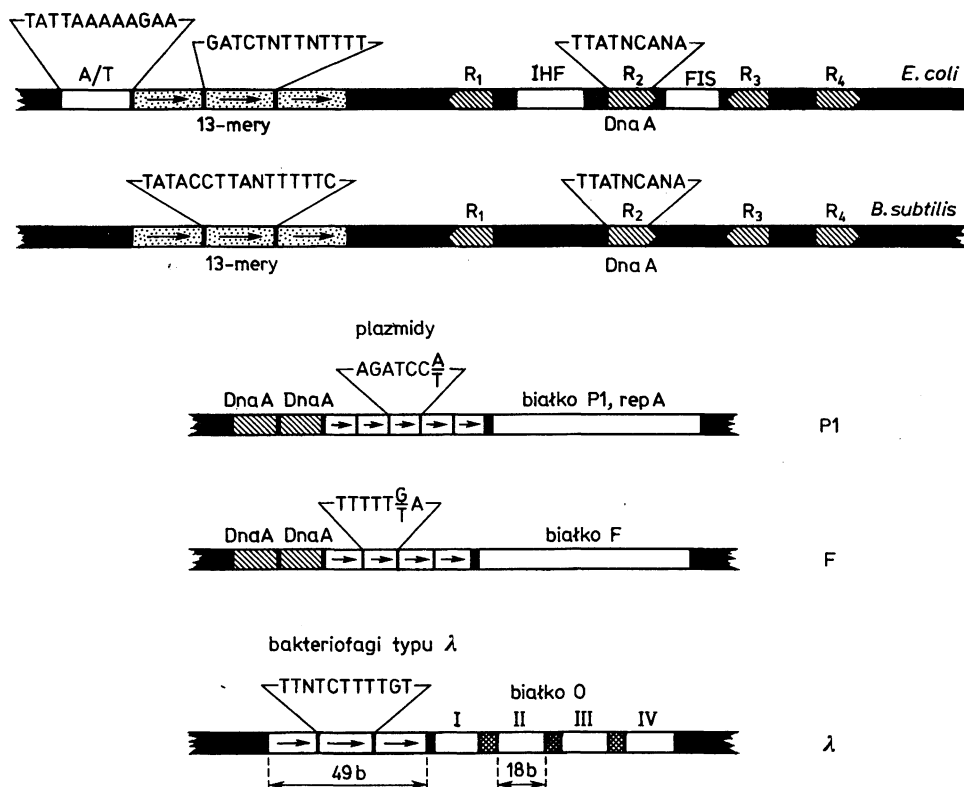
T T A T N C A N A ,

które są ułożone po dwa, przeciwstawnie do siebie ($\leftarrow \rightarrow$), oraz trzy fragmenty 13-nukleotydowe, o sekwencji:

G A T C T N T T N T T T T ,

uszeregowane tandemowo, jeden za drugim ($\rightarrow \rightarrow \rightarrow$). Towarzyszy im dodatkowo sekwencja zbudowana tylko z par A—T. Fragmenty DNA znajdujące się między tymi sekwencjami mają tylko ściśle określone długości przy dość dowolnym składzie nukleotydowym, jednak w całym odcinku *oriC* liczba par A—T znacznie przewyższa liczbę par G—C. Rozpoczęcie cyklu replikacyjnego przebiega przez wiele etapów.

1. Aktywowanie *oriC*. Miejsce inicjacji replikacji DNA najpierw ulega aktywowaniu przez transkrypcję. Bakteryjne *oriC* otaczają z obu stron dwa promotory, z których ważniejszy — *gidA* — steruje syntezą RNA w lewo od

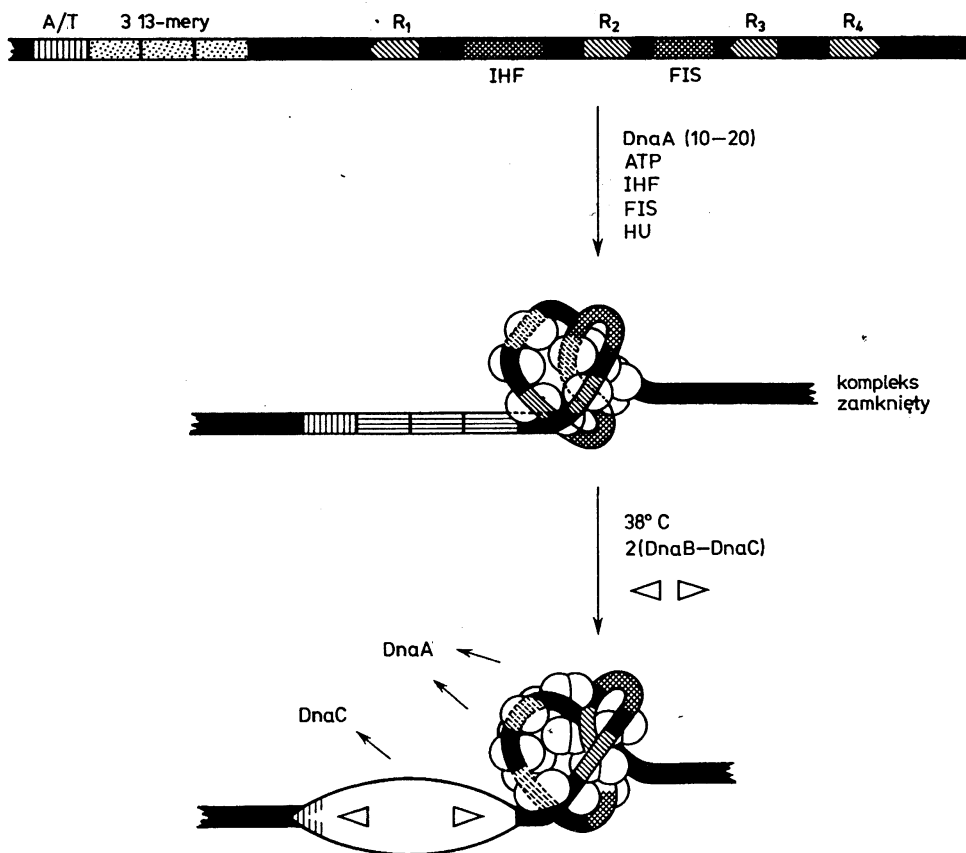


Rys. 3.6. Budowy miejsc inicjacji replikacji *ori* w DNA bakterii niektórych plazmidów i bakteriofagów wykazują duże podobieństwa strukturalne. Wszędzie można wyróżnić region rozpoznawany przez białko inicjatorowe i region bogaty w pary A—T, który jako pierwszy ulega denaturacji (wg A. Kornberg, *DNA Replication*. 1992)

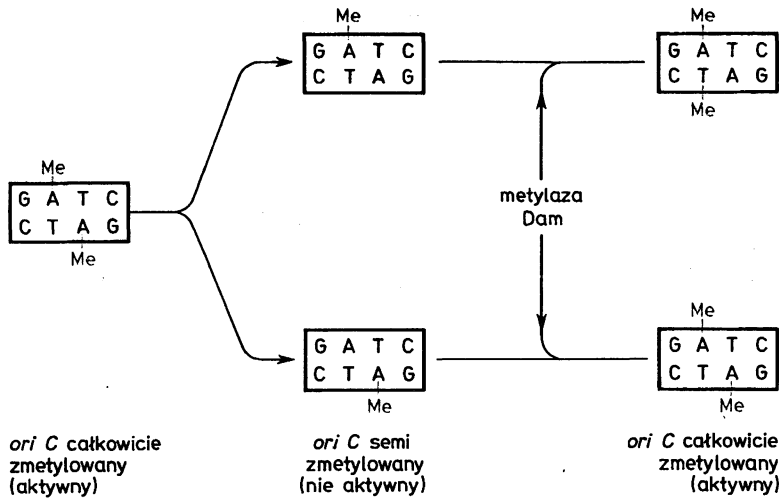
oriC. Transkrypcja, nie przechodząc przez miejsce inicjacji, powoduje jego aktywację przez zwiniecie całego odcinka DNA w dodatkowe lewoskrętne superzwoje, niezbędne do otwarcia dwuniciowej struktury heliksu.

2. 9-nukleotydomowe sekwencje są miejscem wiązania specyficznego białka inicjatorowego, produktu genu *dnaA*. Białko to, o masie 52 000 Da, rozpoznaje te sekwencje i dołącza się do nich w sposób kooperatywny, łącząc się nie tylko z DNA, ale i ze sobą, tworzy duży agregat liczący 10–20 dimerowych cząsteczek białka. Jest to tzw. kompleks zamknięty. W obecności ATP oraz wspomagających białek chromatyny bakteryjnej FIS i IHF oraz HU, DNA ulega silnemu zginaniu, owijając się wokół białek DnaA. Powstałe w cząsteczce DNA silne naprężenia powodują zrywanie wiązań wodorowych w obszarze odcinków 13-nukleotydomowych, kolejno, począwszy od odcinka położonego najbliżej kompleksu. Białko DnaA wykazuje aktywność ATPazy i wykorzystuje energię ATP do dalszego rozdzielania nici, zapoczątkowanego przez powstałe w DNA napięcia. Tworzy się kompleks otwarty. Rola obecnych w kompleksie białek HU nie jest w pełni ustalona.

3. Do kompleksu otwartego przyłącza się helikaza replikacyjna, produkt genu *dnaB*. Helikaza występuje w cytoplazmie w połączeniu z innym białkiem replikacyjnym, produktem genu *dnaC*, w formie heksameru $(DnaB)_6 \cdot (DnaC)_6$, o masie 480 000 Da. DnaC służy do wprowadzenia helikazy do kompleksu otwartego, w którym reaguje z DnaA, uwalniając aktywną formę helikazy — $(DnaB)_6$. Helikaza rozwija dalej nici DNA w obie strony, wypierając niepotrzebne już białko DnaA, a rozdzielone nici są stabilizowane białkami SSB. Tworzy się „oczko” replikacyjne o wielkości 45–60 par zasad, przygotowane do włączenia w proces inicjacji primazy, produktu genu *dnaG*, który katalizuje syntezę starterowego RNA. Synteza ta kończy etap inicjacji, rozpoczynając proces elongacji (rys. 3.7). Kluczową rolę w procesie inicjacji odgrywa inicjatorowe białko DnaA. Poza otwarciem widełek, jego obecność decyduje o włączeniu w proces inicjacji helikazy DnaB, zawsze jednak w asyście białek



Rys. 3.7. Inicjacja replikacji DNA w komórkach *E. coli*. W wyniku oddziaływania białka inicjacyjnego DnaA oraz białek chromatyny bakteryjnej IHF i FIS na strukturę obszaru *ori* następuje rozdzielenie się nici DNA w obrębie sekwencji 13-merowych i otwarcie pierwszych widełek replikacyjnych (wg B. Woelker & W. Messer, *Nucl. Acid Res.*, 21: 5025–5033, 1993)

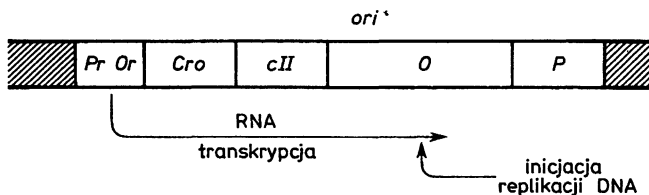


Rys. 3.8. Sygnały regulacji replikacji DNA mogą być wbudowane w strukturę DNA

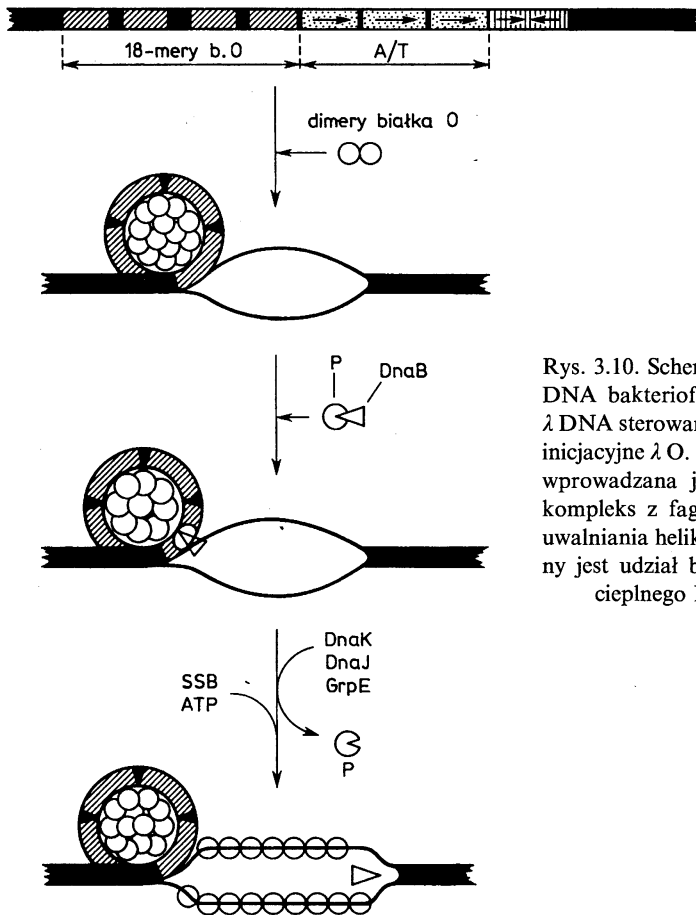
replikacją obecne w obu niciach sekwencje są zmetylowane. Replikacja wprowadzając nie zmetylowane zasady do nici potomnych powoduje, że powstaje sytuacja, w której wszystkie zasady jednej nici są zmetylowane, a drugiej wolne. Ponieważ inicjacja wymaga obecności całkowicie zmetylowanego DNA w obszarze *oriC*, ulega więc zahamowaniu, aż do czasu wstawienia brakujących grup metylowych do DNA (rys. 3.8).

3.2.2. Inicjacja replikacji DNA bakteriofaga λ

Inicjacja replikacji DNA faga λ , podobnie jak inicjacja replikacji bakteryjnego DNA, wymaga również aktywowania specyficznego miejsca inicjacji *ori λ* za pomocą transkrypcji. Aktywowanie to spełnia jeszcze dodatkową rolę — dostarcza białka inicjatorowego λ O, niezbędnego do rozpoczęcia replikacji. Obraz regionu *ori λ* przedstawiony jest na rysunku 3.9. Znajduje się wewnątrz genu białka λ O, który wspólnie z drugim białkiem replikacyjnym λ P tworzą jeden operon. Inicjacja replikacji wymaga, oprócz udziału białek fagowych λ O i λ P, także udziału wielu białek bakteryjnych. Budowa *ori λ* jest podobna



Rys. 3.9. Inicjacja replikacji faga λ wymaga aktywacji obszaru *ori λ* przez transkrypcję, rozpoczynającą się z wczesnego promotora *Pr*



Rys. 3.10. Schemat inicjacji replikacji DNA bakteriofaga λ . Inicjacja replikacji λ DNA sterowana jest przez fagowe białko inicjacyjne λ O. Bakteryjna helikaza DnaB wprowadzana jest w obszar *ori* λ jako kompleks z fagowym białkiem λ P. Do uwalniania helikazy z kompleksu niezbędny jest udział bakteryjnych białek szoku cieplnego DnaK, DnaJ i GrpE

do budowy *oriC* (rys. 3.10). Po prawej stronie, w obszarze 49 par zasad znajdują się trzy 11-nukleotydowe sekwencje bogate w pary AT — odpowiedniki bakteryjnych sekwencji 13-nukleotydowych. Miejsce wiązania białka λ O znajduje się po lewej stronie, gdzie występują cztery 18-nukleotydowe sekwencje ułożone parami, przeciwstawnie do siebie — jak w *oriC*. Wiążą one białko λ O w formie dimerów, co powoduje wygięcie DNA i zerwanie wiązań wodorowych w obszarze sekwencji 18-nukleotydowych. Białko λ P, podobnie jak bakteryjne białko DnaC, wprowadza do otwartego „oczka” helikazę bakteryjną — białko DnaB. Ponieważ fagowe białko λ P wiąże bardzo silnie DnaB, włączona do widełek helikaza pozostaje w kompleksie z białkiem λ P i jest nieaktywna. Do aktywacji wymaga udziału trzech białek bakteryjnych: DnaJ, DnaK i GrpE. Są to białka szoku cieplnego, które w normalnych warunkach nie biorą udziału w replikacji bakteryjnego DNA, jednak okazały się niezbędne do zachowania aktywności DnaA w podwyższonej temperaturze, oraz przy replikacji DNA faga λ i niektórych plazmidów. Uwalniają one

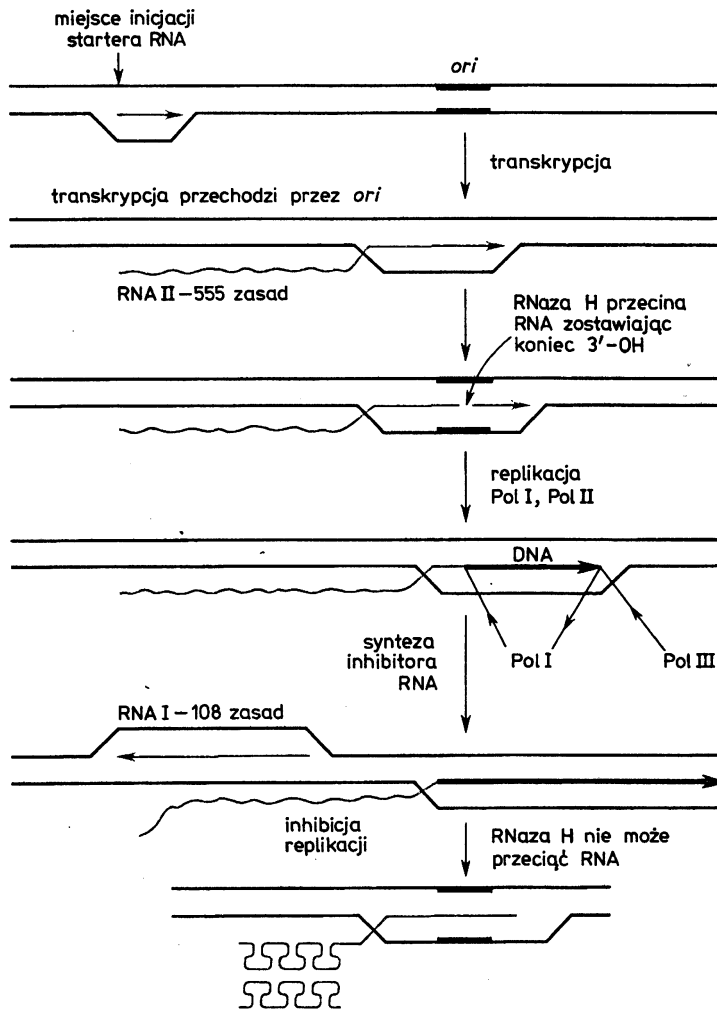
helikazę DnaB od białka λ P, przywracając jej aktywność potrzebną zarówno do rozwijania podwójnego heliksu, jak i do włączania primazy w obręb widełek.

3.2.3. Inicjacja replikacji przez polimerazę RNA — formowanie pętli D i R

W omówionych dotąd przykładach, udział transkrypcji w inicjacji replikacji ograniczał się tylko do aktywowania obszaru inicjacji. Może ona jednak brać bezpośredni udział, inicjując replikację przez syntezę starterów, zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych.

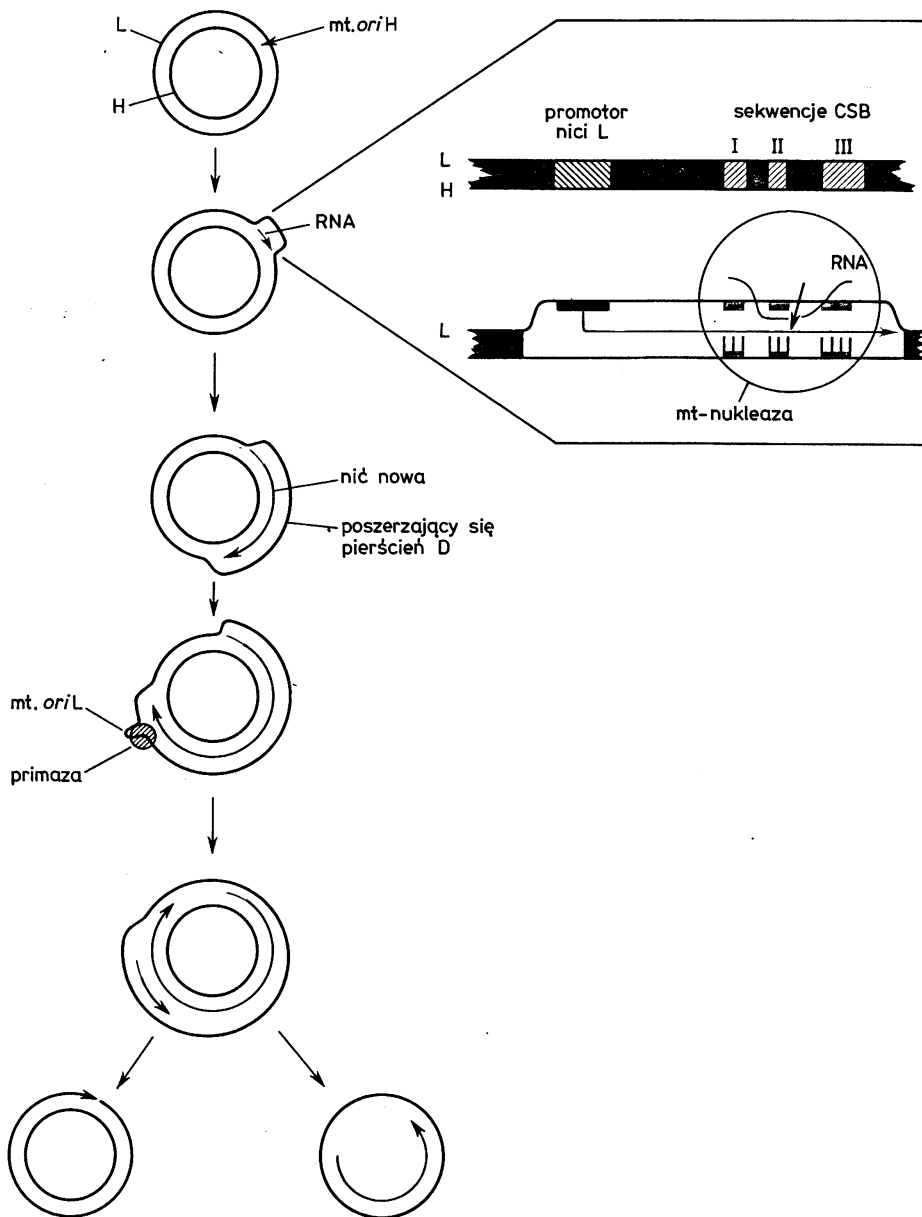
Przykładem takiego mechanizmu inicjacji w komórkach bakterii jest replikacja plazmidu *ColE* 1, którego liczba w komórce utrzymywana jest na stałym poziomie 20 kopii. Replikacja rozpoczyna się od syntezy cząsteczki RNA (RNA II), w odległości 555 par zasad powyżej miejsca startu syntezy DNA i przebiega przez *ori* plazmidu. Nić DNA nie będąca matrycą jest odsuwana, tworząc powiększającą się pętlę, nazwaną pętlą R. W obrębie *ori*, powstający łańcuch RNA powiązany wiązaniami wodorowymi ze swoją matrycą, ulega przecięciu przez RNazę H — specyficzny enzym hydrolizujący tylko cząsteczki hybrydowe RNA–DNA — co powoduje wytworzenie wolnej grupy 3'-OH, od której rozpoczyna się synteza nici prowadzącej DNA, katalizowana wyjątkowo przez bakteryjną polimerazę I DNA. Dopiero po zsyntetyzowaniu łańcucha DNA o długości ok. 100 nukleotydów, polimeraza I zostaje zastąpiona przez właściwą replikazę — holoenzym polimerazy III DNA (p. elongacja). W tym miejscu rozpoczyna się także synteza nici opóźnionej. Kontrola replikacji tego plazmidu też jest realizowana za pomocą transkrypcji. Na komplementarnej matrycy DNA jest syntetyzowana inna cząsteczka RNA (RNA I) o długości 108 nukleotydów. Ponieważ jest ona także komplementarna do starterowego RNA, może tworzyć z nim strukturę dwuniciową. Wytworzenie tej struktury (rys. 3.11) zapobiega hydrolizie starterowego RNA przez RNazę H, a tym samym replikacji DNA. Hamujące działanie RNA I jest wspomagane przez białko Rom, którego gen znajduje się tuż poniżej miejsca startu replikacji. W ten sposób starterowy RNA (RNA II) jest regulatorem pozytywnym replikacji, a RNA I i białko Rom są regulatorami negatywnymi.

Przykładem podobnego mechanizmu inicjacji, zaobserwowanego w komórkach eukariotów, jest mechanizm inicjacji replikacji mitochondrialnego DNA (mt DNA). Synteza DNA w mitochondriach zachodzi w ciągu całego cyklu komórkowego, podwajając ilość mt DNA w tym samym tempie, w jakim następuje podział komórek. W komórkach ssaków genom mitochondrialny zbudowany jest z kolistej, dwuniciowej cząsteczki DNA, zwiniętej w ujemne superzwoje. Replikacja obu nici DNA zachodzi w sposób asynchroniczny. Każda z nici DNA ma swoje miejsce inicjacji, których aktywacja zachodzi oddzielnie. Replikacja zaczyna się od nici H, której *ori* znajduje się w jedynym nie kodującym obszarze mt DNA, w którym, poza *ori* H, stwierdzono także



Rys. 3.11. Synteza DNA plazmidu *Col E1* jest inicjowana i regulowana przez RNA

występowanie sygnałów startu transkrypcji. Inicjacja rozpoczyna się od syntezy RNA z promotora nici L, położonego ok. 100 par zasad powyżej *ori H*. Powstająca cząsteczka RNA hybryduje z nicią H, odsuwając nić L, co w mikroskopie elektronowym tworzy obraz przesuwającej się pętli, czyli pętli D (ang. displacement loop). W obrębie *ori H* hybrydowa cząsteczka RNA–DNA ulega bardzo precyzyjnemu przecięciu, stając się starterem dla mitochondrialnej polimerazy DNA. Przecięcie jest katalizowane przez enzym zawierający 136-nukleotydowy odcinek RNA, identyczny u wszystkich gatunków ssaków. Mitochondrialna polimeraza DNA (polimeraza γ) katalizuje syntezę DNA z szybkością ok. 10 nukleotydów/s. Gdy około 70% nici H ulegnie replikacji, widelki odsłaniają *ori* nici L. Jest to 30-nukleotydowa



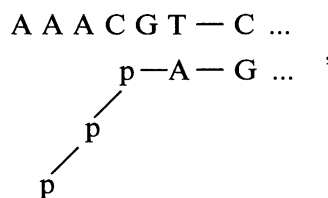
Rys. 3.12. Schemat asymetrycznej replikacji mitochondrialnego DNA. Do aktywacji inicjacji replikacji nici H potrzebny jest udział mitochondrialnej polimerazy RNA, specyficznej mitochondrialnej endonukleazy oraz promotora transkrypcji. Replikacja nici L rozpoczyna się po odsłonięciu sekwencji rozpoznawanej przez primazę. Startery obu nici wydłużane są przez mitochondrialną polimerazę γ DNA (wg Chang, Clayton; 1989, *Cell* 56:131 — zmodyf.)

sekwencja, przyjmująca automatycznie strukturę „szpilki do włosów”. Jest ona rozpoznawana przez primazę, co staje się sygnałem do startu syntezy nici L. Przebieg syntezy mt DNA przedstawia rysunek 3.12.

3.2.4. Inicjacja replikacji w jednoniciowej cząsteczce DNA

Genomy wielu bakteriofagów zbudowane są z jednoniciowego, kolistego DNA, który oznacza się znakiem (+). Replikacja ich genomów przebiega w dwóch etapach. W etapie pierwszym nić (+) zostaje przekształcona w kolistą cząsteczkę dwuniciową po dosyntytyzowaniu nici komplementarnej (-). Cząsteczka ta nosi nazwę formy replikacyjnej (RF). W etapie drugim syntetyzowane są duże ilości nici (+), dla których matrycą jest właśnie forma replikacyjna.

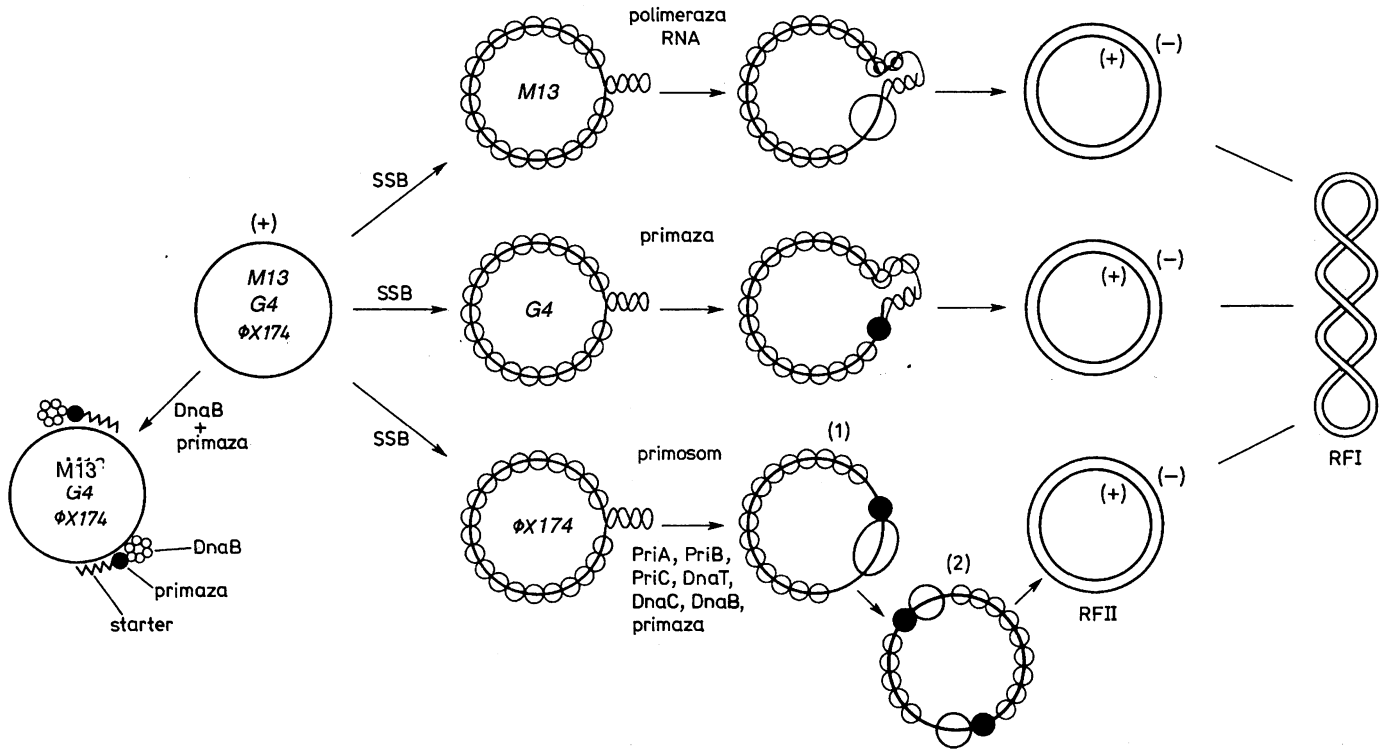
Proces syntezy formy RF w bardzo prostych genomach fagów *M13* czy *G4* przebiega w sposób następujący. Nić (+) zawiera swoistą sekwencję zasad łatwo tworzącą strukturę „szpilki do włosów”. Jest to miejsce inicjacji (*ori*). Po wnknięciu do komórki bakterii nić (+) zostaje pokryta białkami SSB, stabilizującymi jednoniciową strukturę DNA. Tylko odcinek o strukturze „szpilki do włosów” pozostaje od nich wolny. Może się więc do niego dołączyć polimeraza RNA lub primaza i rozpocząć syntezę startera. Enzymy te rozwijając strukturę „szpilki do włosów” i wykorzystując odcinek DNA wolny od białek SSB syntetyzują startery zwykle o długości 11 ± 1 nukleotydów. Po zetknięciu się z białkami SSB enzymy odrywają się od matrycy, pozostawiając na niej starter z wolną grupą 3'-OH, co umożliwi dołączenie się polimerazy DNA III. Rozpoczyna się proces syntezy DNA, przebiegający dookoła matrycy aż do kontaktu z początkiem starterowego RNA. Za jego usunięciem i dosyntytyzowanie brakującego odcinka DNA odpowiada polimeraza DNA I. Powstająca zrelaksowana forma cząsteczki RF nosi nazwę RF II. Ligacja ostatniej przerwy i zwinięcie cząsteczki w ujemne superzwoje przekształca RF II w formę RF I, gotową do syntezy nowych cząsteczek fagowego genomu (rys. 3.13). Jeśli w warunkach *in vitro* matryca zostanie pozbawiona białek SSB, inicjacja replikacji zachodzi w sposób niespecyficzny, tylko z udziałem primazy i helikazy *DnaB*. Primaza rozpoznaje w tych warunkach sekwencję:



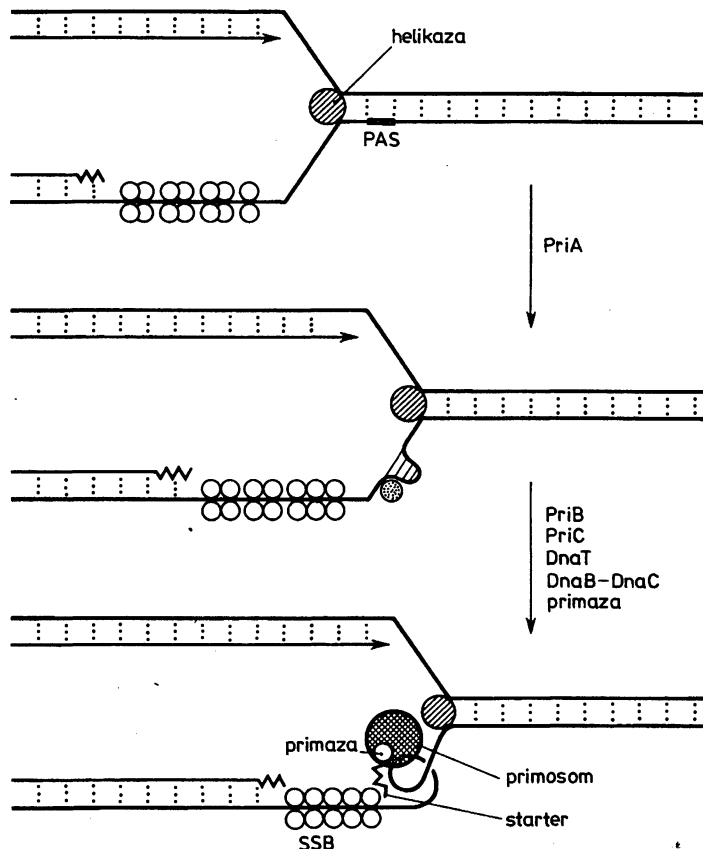
która nie musi występować w formie szpilki. Powstające w tych warunkach startery charakteryzują się bardzo zróżnicowaną długością.

3.2.5. Budowa primosomu

Inicjacja replikacji na jednoniciowej matrycy DNA przez samą primazę jest niemożliwa, jeśli matryca pokryta jest białkami SSB stabilizującymi tę strukturę. W takim przypadku proces inicjacji staje się bardziej złożony i wymaga udziału wielu białek bakteryjnych tworzących razem duży kompleks inicjacyjny, nazwany primosomem. Przykładem może być inicjacja formy replikacyjnej faga *ΦX 174*. Miejsce inicjacji replikacji tego faga obejmuje odcinek DNA



Rys. 3.13. Przekształcenie fagowego jednoniciowego DNA w dwuniciową formę replikacyjną (RF) może być inicjowane przez polimerazę RNA (*M13*), primazę (*G4*) lub przez bakteryjny kompleks inicjacyjny — primosom (*phiX174*). Inicjacja replikacji zachodzi w sposób niespecyficzny, bez udziału białek SSB, przy udziale DnaB i primazy bakteryjnej

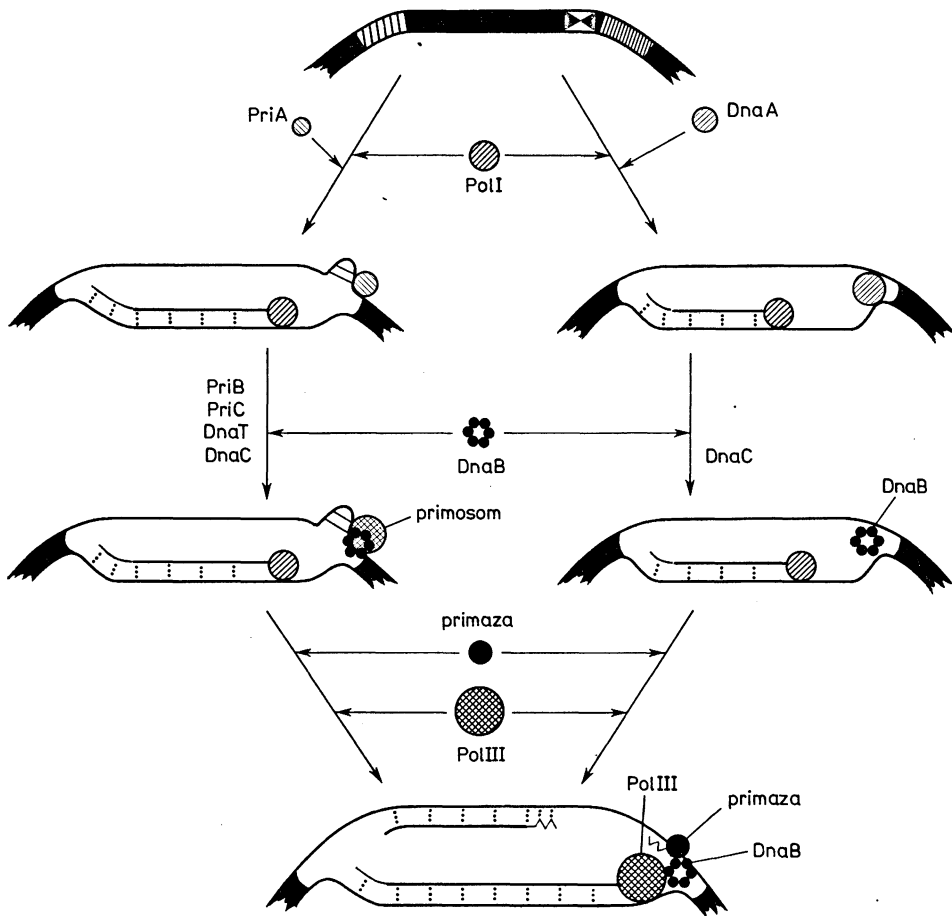


Rys. 3.14. Rola primosomu w inicjacji fragmentów Okazaki

o długości 55 nukleotydów, o strukturze „szpilki do włosów”, który nazwano PAS (ang. primosome assembly site). Miejsce to jest rozpoznawane przez cztery białka primosomu — produkty genów *priA*, *priB*, *priC* i *dnaT*. Białko Pri A, o dawnej nazwie *n'*, jest helikazą o kierunku działania $3' \rightarrow 5'$. Rozpoznaje sekwencję PAS i łączy się z nią jako pierwsze; do niego dołączają się pozostałe białka kompleksu oraz główna helikaza replikacyjna — $(DnaB)_6$. Przyłączenie się primazy — DnaG kończy formowanie primosomu. Dzięki obecności dwóch helikaz — PriA i DnaB primosom może poruszać się po jednoniciowej matrycy DNA w obu kierunkach $3' \rightarrow 5'$ i $5' \rightarrow 3'$. Usuwa także z matrycy białko SSB, przygotowując ją do replikacji. Sekwencje PAS występują zarówno w DNA bakteryjnym, jak i w DNA plazmidów i bakteriofagów. Łatwość przemieszczania się primosomów wzdłuż jednoniciowych matryc sugeruje ich zaangażowanie w syntezę fragmentów Okazaki. Po zakończeniu kolejnej inicjacji fragmentu, primosom może bez rozpadu przesunąć się do miejsca startu następnego fragmentu. Zapętlenie matrycy syntezy nici opóźnionej sprawia, że primosom, poruszając się zgodnie z ruchem widełek, będzie inicjował syntezę DNA na nici zorientowanej w kierunku przeciwnym do ruchu widełek (rys. 3.14).

3.2.6. Równocześnieść obu typów primosomów

Inicjacja replikacji DNA w komórkach bakterii zależy więc od obecności dwóch typów sekwencji: 9-nukleotydowych — rozpoznawanych przez białko DnaA oraz sekwencji PAS — rozpoznawanej przez białka PriA, PriB i PriC. Ostatnio udało się wykazać, że oba rodzaje inicjacji mogą się wzajemnie zastępować bez żadnej szkody dla replikowanego DNA. Metodami inżynierii genetycznej wprowadzono do DNA plazmidu *pBR 322*, w miejscu inicjacji nici opóźnionej, sekwencję PAS i dwie przeciwstawnie uszeregowane sekwencje — T T A T N C A N A — wiążące białko DnaA. Jak wiadomo, replikacja nici ciągłej jest w tym plazmidzie inicjowana przez polimerazę RNA i w początkowym okresie prowadzona jest tylko na jednej nici przez polimerazę I DNA, aż do odsłonięcia miejsca inicjacji na odsuwanej nici drugiej. Wtedy rozpoczyna



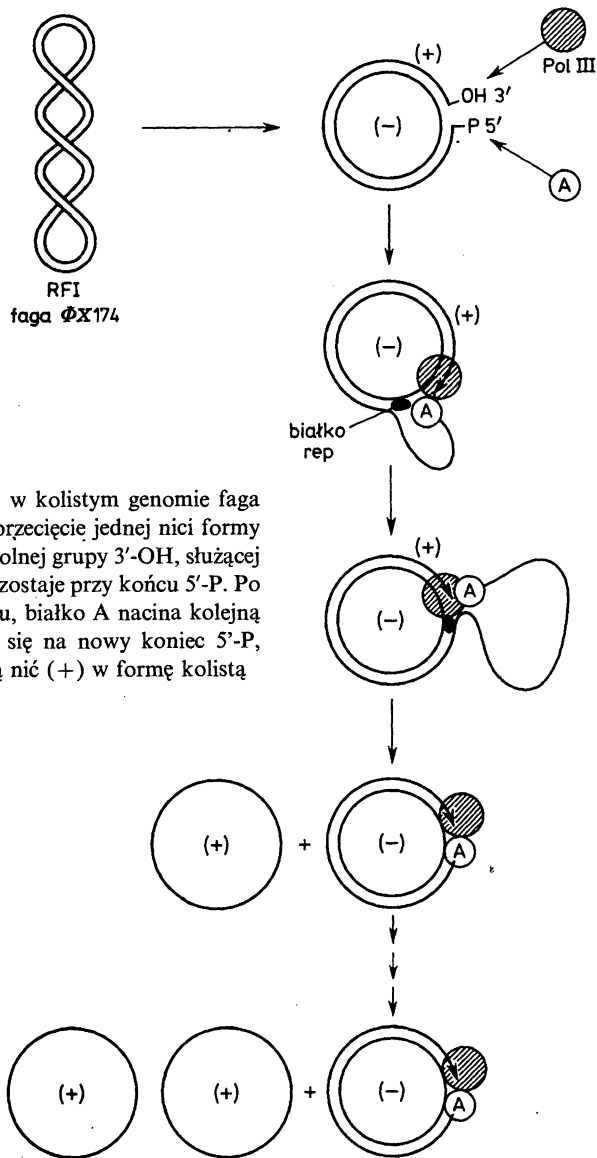
Rys. 3.15. Schemat inicjacji syntezy nici opóźnionej DNA w plazmidzie *pBR 322*, obrazujący równocześnieść drogi inicjacji replikacji zależnej od PriA i od DnaA

się synteza DNA na nici opóźnionej oraz wymiana polimerazy I DNA na polimerazę III na nici ciągłej. Okazało się, że synteza nici opóźnionej rozpoczyna się równie wydajnie z sekwencji PAS, jak i z sekwencji DnaA. W przypadku braku bądź to białka DnaA, bądź też DnaT nie zaobserwowano żadnego zmniejszenia wydajności replikacji. Wydaje się, że również w replikacji bakteryjnego DNA oba typy primosomów mogą inicjować syntezę fragmentów Okazaki, podwójnie zabezpieczając prawidłowy przebieg replikacji (rys. 3.15).

3.2.7. Inicjacja replikacji DNA przez nacinanie jednej z nici w kolistym dwuniciowym genomie. Replikacja typu obracającego się koła

Badanie replikacji faga $\Phi X174$, poza poznaniem mechanizmu inicjacji fragmentów Okazaki, doprowadziło także do odkrycia innego mechanizmu rozpoczynania syntezy DNA przez nacinanie matrycy. Synteza wielu jednociowych kolistych cząsteczek DNA (nici +), stanowiących genomy fagowe, rozpoczyna się przez nacięcie dwuniciowej formy RF w miejscu inicjacji. Wolna grupa 3'-OH, powstała na końcu przeciętej nici rodzicielskiej, staje się początkiem syntezy nowych cząsteczek genomowego DNA, bez konieczności syntezy starterów. Proces ten nie wymaga aktywacji przez transkrypcję, a do jego przebiegu wystarcza udział jednego białka fagowego — specyficznej endonukleazy kodowanej przez gen *A*, bakteryjnej helikazy Rep, białek SSB wiążących jednociowy DNA i polimerazy DNA III, a więc znacznie mniejszej liczby enzymów niż omówione wcześniej mechanizmy replikacji.

Białko A o masie 60 000 Da jest zdolne do cięcia i łączenia nici DNA bez straty energii. Przecina nić (+) dwuniciowej formy replikacyjnej genomu $\Phi X174$ zwiniętej tylko w strukturę superhelikoidalną (RFI), rozpoznając w niej 4-nukleotydową sekwencję inicjacyjną T G A T. Cięcie następuje między dwiema zasadami purynowymi G i A, z wytworzeniem wolnej grupy 3'-OH przy reszcie guaninowej. Równocześnie cząsteczka białka wiąże się kowalencyjnie z adeniną przez uwolnioną resztę fosforanową. W obecności helikazy Rep i z udziałem ATP, posuwa się wzdłuż matrycy wokół cząsteczki DNA, coraz bardziej odsuwając nić (+). Polimeraza DNA III wykorzystuje wolny koniec 3'-OH do wydłużania łańcucha (+). Po ponownym dojściu do miejsca inicjacji, białko A nacina je powtórnie, przemieszczając się na nowo utworzony koniec 5'-P, czemu towarzyszy ligowanie nici uwolnionej. Ligacja zachodzi kosztem energii uwolnionej w czasie przecinania nowej nici DNA (rys. 3.16). Jeśli syntetyzowana nić nie ulega przecinaniu, to tworzy się długa, jedno- lub dwuniciowa cząsteczka DNA, zbudowana z połączonych ze sobą tandemowo wielu genomów danego faga, które później muszą być odpowiednio pocięte. Podczas syntezy dwuniciowego DNA nić uzupełniająca tworzy się oczywiście przez syntezę fragmentów Okazaki.



Rys. 3.16. Synteza nici prowadzącej w kolistym genomie faga $\Phi X174$ może być inicjowana przez przecięcie jednej nici formy RF w miejscu *ori*, z wytworzeniem wolnej grupy 3'-OH, służącej jako starter. Nacinające białko A pozostaje przy końcu 5'-P. Po zakończeniu każdego pełnego obrotu, białko A nacina kolejną nić DNA w miejscu *ori* i przenosi się na nowy koniec 5'-P, zamykając jednocześnie uwolnioną nić (+) w formę kolistą

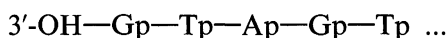
3.2.8. Inicjacja replikonów liniowych.

Starterowy RNA może być zastępowany przez cząsteczki białkowe

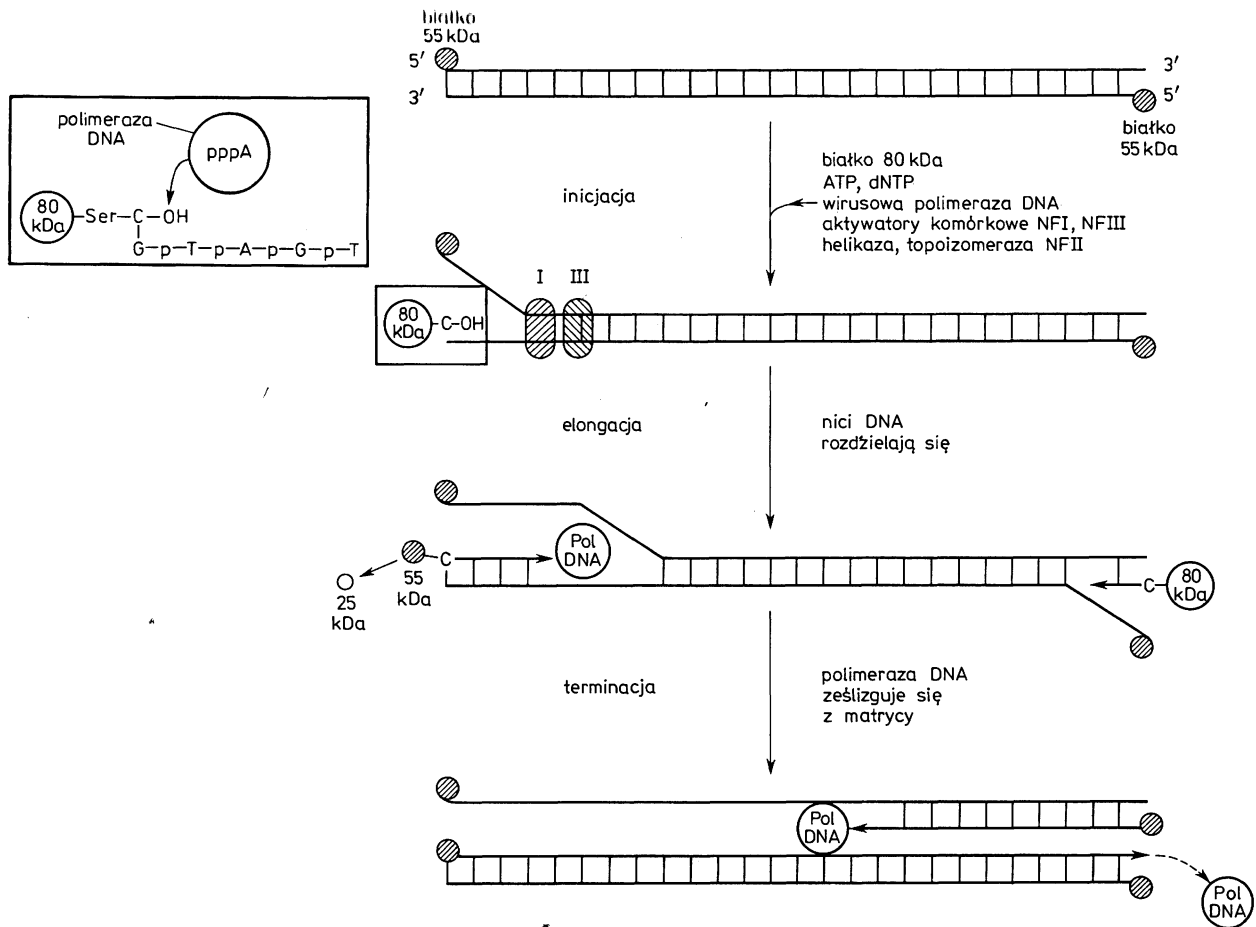
Zdolność wszystkich polimeraz DNA do prowadzenia syntezy tylko w kierunku $5' \rightarrow 3'$ stwarza trudności przy syntezie zakończeń cząsteczek liniowych. Ponieważ polimerazy DNA nie mają możliwości uzupełnienia braków powstałych w sekwencjach łańcuchów po usunięciu starterów na obu końcach $5'$,

w każdym cyklu replikacyjnym następowałoby skracanie cząsteczek DNA, co oczywiście jest niemożliwe. Problemy te są rozwiązywane w różny sposób przez różne typy komórek. W komórkach bakterii, w czasie syntezy dwuniciowych liniowych genomów, np. faga λ , najpierw powstają długie struktury zawierające wiele cząsteczek fagowego DNA, połączonych tandemowo w jedną długą nić. Są one następnie przecinane na poszczególne genomy. Niepełne cząsteczki końcowe mogą być degradowane, podczas gdy wszystkie pozostałe są prawidłowymi genomami faga. W mitochondrialnym, liniowym genomie *Paramecium* końce replikonów tworzą struktury „szpilki do włosów”, co praktycznie likwiduje wolne końce DNA. Chromosomy organizmów wyższych mają na swych końcach specyficzne struktury ochronne, nazwane telomerami. Będzie o nich mowa w dalszej części rozdziału.

Niektóre wirusy eukariotyczne oraz bakteriofagi o chromosomach liniowych wykształciły zupełnie odmienny sposób inicjacji replikacji, który pozwala na ominięcie wspomnianej trudności. Czynniki inicjującymi i jednocześnie starterami replikacji stają się cząsteczki białka, które dostarczają wolne grupy —OH, umożliwiające rozpoczęcie replikacji przez polimerazę DNA. Dawcami tych grup są aminokwasy: seryna, treonina lub tyrozyna. Białka inicjujące ten typ replikacji zostają na stałe związane z łańcuchem DNA, którego syntezę zainicjowały. Przykładem tak zorganizowanej replikacji DNA jest replikacja adenowirusa. Genom adenowirusa jest zbudowany z jednej dużej liniowej cząsteczki dwuniciowego DNA, w której 5'-końcowe nukleotydy (są nimi cytozyny) związane są wiązaniami kowalencyjnymi, przez reszty seryny, z cząsteczkami białek o masie 55 000 Da (rys. 3.17). Replikacja DNA adenowirusa przebiega w sposób następujący. Obszar inicjacji o długości 51 nukleotydów zawiera trzy domeny. Do domeny pierwszej (od 1. do 18. nukleotydu), zaczynającej się sekwencją:



dołącza się wirusowe białko inicjacyjne o masie 80 000 Da. Domena ta jest także miejscem dołączenia wirusowej polimerazy DNA. Do domeny drugiej i trzeciej dołączają się białka jądrowe NFI i NFIII, będące w rzeczywistości aktywatorami (promotorami) transkrypcji. Czynniki te zwiększają wydajność replikacji ok. 50-krotnie. Oba czynniki wymagają uprzedniej aktywacji przez fosforylację — w sposób typowy dla eukariontów. Wirusowa polimeraza DNA rozpoznaje te trzy białka i katalizuje reakcję polimeryzacji, dołączając do cytozyny kowalencyjnie związanej z białkiem 80 kDa pierwszy nukleotyd — adeninę. Nić komplementarna wirusowego DNA, związana z białkiem 55 kDa, zostaje odsunięta i natychmiast pokryta wirusowym białkiem SSB, a utworzony kompleks replikacyjny dołącza kolejne nukleotydy, zgodnie z sekwencją matrycy. Po zakończeniu replikacji polimeraza DNA ześlizguje się z matrycy, a inicjacyjne białko 80 kDa ulega częściowej proteolizie, przekształcając się w trwale związane z DNA białko 55 kDa. Nić komplementarna syntetyzowana jest niezależnie, dokładnie według tego samego mechanizmu.

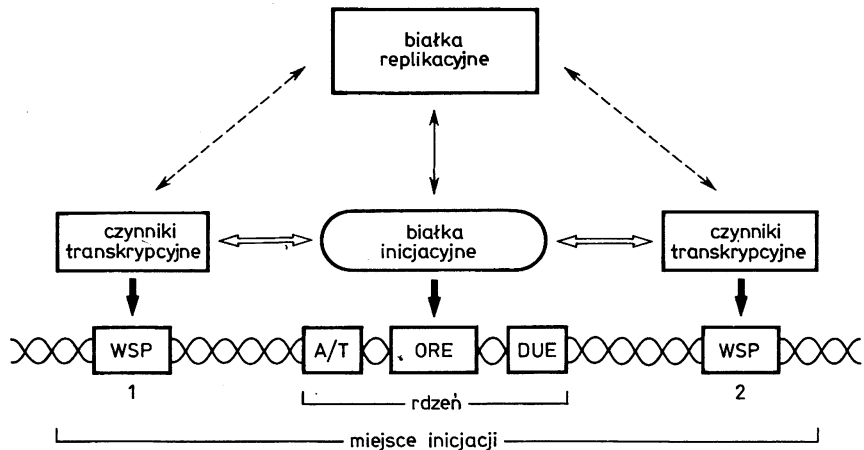


Rys. 3.17. Schemat inicjacji replikonów liniarnych. Replikacja genomu adenowirusa jest inicjowana przez wirusowe białko 80 kDa, niezależnie od siebie na dwóch końcach wirusowego DNA. Białko wiąże kowalencyjnie cytozynę, która staje się starterem dla wirusowej polimerazy DNA. Synteza DNA wymaga obecności komórkowych czynników transkrypcyjnych NFI i NFIII aktywowanych przez fosforylację

W komórkach bakterii także stwierdzono występowanie tego typu mechanizmu. Replikacja linearnego genomu faga $\Phi 29$ zachodzi w sposób zaskakująco podobny do replikacji adenowirusa, z udziałem fagowego białka terminalnego o masie 31 kDa, inicjującego replikację obu nici DNA przez grupę —OH seryny. Podobnie jak w przypadku adenowirusa, replikacja wymaga obecności fagowej polimerazy DNA oraz fagowych białek wiążących jednoniciowe DNA (białek SSB). Do bardziej interesujących przykładów, ilustrujących podobne mechanizmy inicjacji, należy replikacja genomu wirusa Polio zbudowanego z jednoniciowego RNA, gdzie do końca 5' cząsteczki wirusowego RNA dołącza się peptyd zbudowany z 22 aminokwasów, pełniący funkcję białka inicjatorowego dla polimerazy RNA.

3.2.9. Inicjacja replikacji DNA w komórkach eukariontów

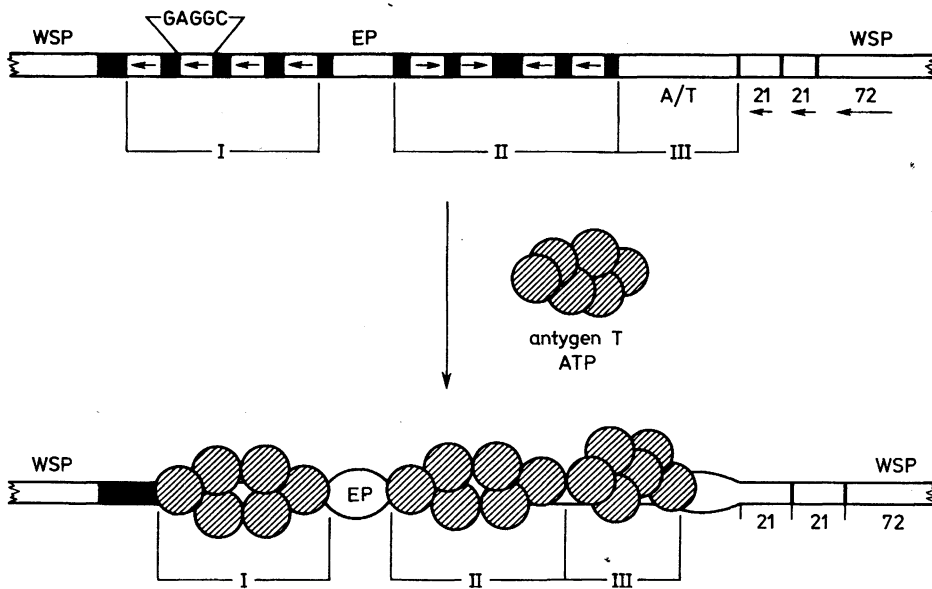
Ze względu na wielkość genomów eukariotycznych oraz ich złożoną strukturę, proces inicjacji replikacji DNA w tych organizmach jest poznany w mniejszym stopniu. Jednak te dane, które udało się uzyskać, wskazują, że podstawowy mechanizm inicjacji jest podobny do mechanizmów występujących w bakteriach. Dotyczy to zarówno replikacji w komórkach eukariotycznych prostych genomów, np. replikacji wirusa SV40, jak i replikacji znacznie bardziej skomplikowanych genomów drożdży. Schematyczny obraz miejsca inicjacji replikacji eukariotycznego DNA przedstawia rysunek 3.18. Położone w centrum schematu sekwencje rozpoznawane przez białka inicjacyjne noszą nazwę ORE (ang. origin recognition element). Sąsiadują z nimi sekwencje ulegające rozwijaniu w „oczko” replikacyjne o nazwie DUE (ang. DNA unwinding element).



Rys. 3.18. Schemat budowy miejsca inicjacji replikacji DNA w komórkach prostych eukariontów. Miejsce inicjacji zawiera rdzeń obejmujący sekwencje DNA, rozpoznawane przez białka inicjacyjne (ORE) oraz sekwencje ulegające rozwijaniu (A—T i DUE). Otaczają je sekwencje wspomagające (WSP), będące miejscami dołączania czynników transkrypcyjnych (wg DePampilis 1993. *Curr. Biol.* 5: 434 — zmodyf.)

ding element), przy czym niektóre z nich mogą być szczególnie bogate w pary A—T. Stanowią one podstawowe sekwencje miejsca inicjacji. W odróżnieniu od komórek bakteryjnych, sekwencjom tym zawsze towarzyszą sekwencje wspomagające, będące miejscami wiązania białek aktywujących transkrypcję. W procesie inicjacji replikacji DNA w komórkach eukariotycznych, białka inicjujące współdziałają więc nie tylko z sekwencjami inicjatorowymi w DNA i białkami replikacyjnymi, jak helikazy, primazy czy polimerazy DNA, lecz również z białkami transkrypcji, których wpływ na replikację przypomina działanie enhancerów. Przykładem może być replikacja genomu wirusa SV40 w zakażonych komórkach zwierzęcych.

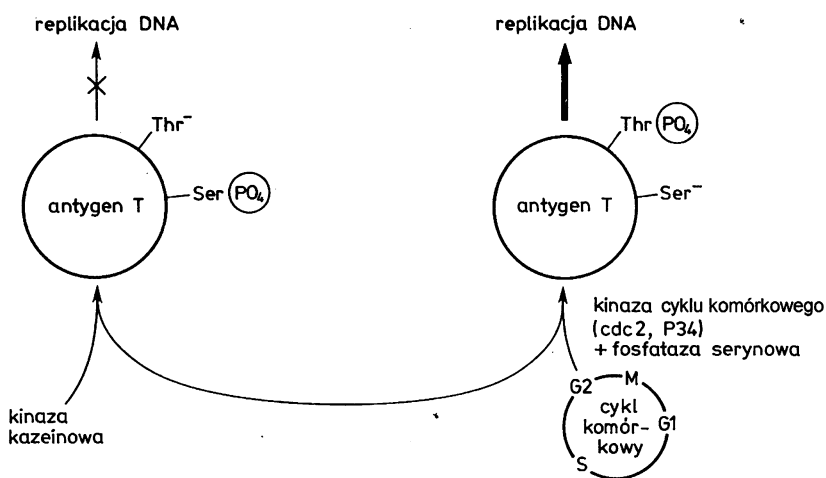
Wirus ten należy do rodziny wirusów Papowa — o chromosomie zbudowanym z kolistej, dwuniciowej cząsteczki DNA — o wielkości około 5000 par zasad. Replikacja wirusowego DNA zależy prawie całkowicie od aparatu enzymatycznego komórki gospodarza. Miejsce inicjacji replikacji znajduje się w nie kodującym obszarze ok. 450 par zasad, zawierającym także sygnały regulacji transkrypcji. Minimalny obszar *ori* obejmuje 64 pary nukleotydowe o dosyć skomplikowanej strukturze. Wyróżnia się w nim 3 regiony wiążące białko inicjatorowe, którym jest antygen T, jedyne białko wirusowe biorące udział w replikacji. Regiony te zawierają po cztery sekwencje G A G G C



Rys. 3.19. Budowa miejsca inicjacji replikacji wirusa SV 40. Wyróżnia się w nim 3 regiony wiązania białka inicjatorowego antygeny T, dołączającego się w formie heksamerów. Otoczone są przez 72-nukleotydowe obszary wspomagające replikację, wiążące faktory transkrypcyjne (WSP). Obszary EP i A—T są miejscami rozwijania nici matrycy. Antygen T pozostaje związany z DNA, działając w czasie elongacji jako helikaza. We wczesnym etapie infekcji miejsce inicjacji jest obszarem promotorowym do syntezy mRNA dla białek wirusowych. Dołączenie się antygeny T blokuje transkrypcję, jednocześnie rozpoczynając replikację

uszeregowane po dwie, przeciwstawnie do siebie ($\rightarrow\leftarrow$), co tworzy struktury palindromowe. Region centralny zawiera dodatkowo po prawej stronie odcinek 17-nukleotydowy zbudowany z par A—T, a po lewej odcinek 15-nukleotydowy, w którym na jednej nici występują tylko puryny, a na drugiej pirymidyny. Są to miejsca rozdzielania się nici. Po prawej stronie sekwencji *ori* znajdują się dwie sekwencje wiążące promotory wczesnej transkrypcji i dwie sekwencje enhancerowe (rys. 3.19).

Po wnikięciu wirusowego DNA do komórki promotory te służą do syntezy mRNA dla antygeny T. Dopiero po wyprodukowaniu dużej ilości antygeny T replikacja może się rozpocząć, a przyłączenie się antygeny T do sekwencji *ori* powoduje zablokowanie transkrypcji. Antygen T wiąże się z DNA w formie heksamery. Jego aktywność replikacyjna regulowana jest w sposób właściwy tylko dla eukariontów — przez wybiórczą fosforylację. Miejscem wiązania się antygeny T z DNA jest odcinek peptydowy, znajdujący się przy końcu aminowym cząsteczki białka (N), gdzie występują reszty seryny i treoniny. W pobliżu końca karboksylowego (C), odpowiedzialnego za przyłączanie białek replikacyjnych komórki gospodarza, stwierdza się również obecność seryny i treoniny. Środek cząsteczki antygeny T wiąże ATP. Ufosforylowanie reszt serynowych czyni to białko nieaktywnym w procesie inicjacji, natomiast fosforylacja reszt treoninowych aktywuje je. Fosforylacja i defosforylacja katalizowana jest przez kinazy i fosfatazy cyklu komórkowego, co ściśle wiąże ten proces z podziałem komórki. Schemat regulacji aktywności antygeny T przedstawia rysunek 3.20.



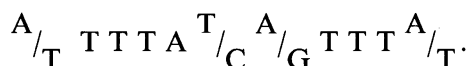
Rys. 3.20. Schemat regulacji aktywności antygeny T przez fosforylację seryny i treoniny

Antygen T pełni centralną rolę w replikacji wirusowego DNA. Poza aktywowaniem miejsca inicjacji bierze udział w rozwijaniu nici DNA jako helikaza, steruje też przyłączeniem komórkowej polimerazy DNA α (z primazą)

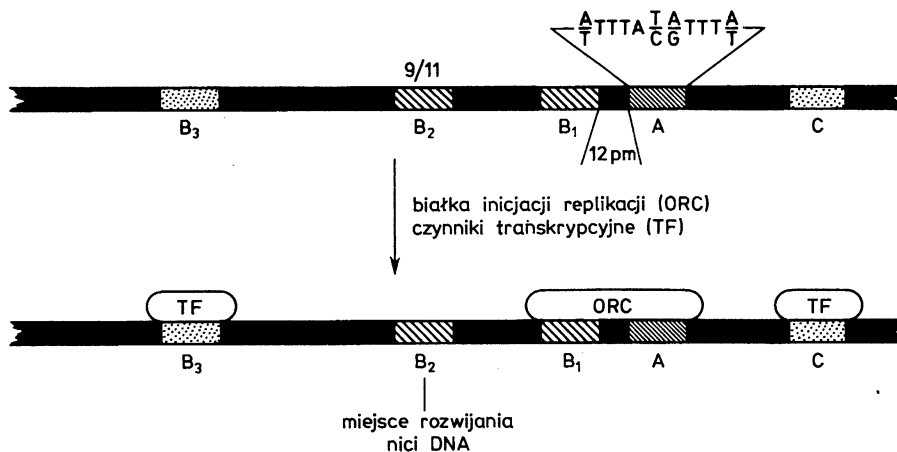
do utworzonych widełek replikacyjnych. Sekwencje promotorowe odgrywają również bardzo ważną rolę w replikacji — dołączone do nich białka promotorowe zwiększają wydajność replikacji w komórkach aż stukrotnie.

3.2.10. Inicjacja replikacji DNA w komórkach drożdży. Sekwencje ARS

Mechanizm inicjacji replikacji chromosomalnego DNA został zbadany tylko w komórkach drożdży, dzięki występowaniu w nich plazmidów o autonomicznej replikacji DNA. Sekwencje inicjacyjne replikacji *ori* zostały najpierw wykryte w genomach tych plazmidów; stąd pochodzi ich nazwa ARS (ang. autonomously replicating sequences). Potem stwierdzono ich obecność w DNA chromosomalnym, gdzie występują w tej samej liczbie co replikony oznaczone metodami autoradiograficznymi (400–500 sztuk). Sekwencje ARS zbudowane są w sposób następujący. Obejmują odcinek DNA o długości 100–200 par nukleotydów, umiejscowiony zawsze w nie kodujących przestrzeniach międzygenowych. Wyróżnia się w nim 11-nukleotydowy odcinek DNA o ściśle zachowawczej sekwencji, identycznej dla wszystkich ARS:



Jest to domena A, w której każda zmiana nukleotydu powoduje inaktywację ARS. Towarzyszą jej trzy dodatkowe domeny, oznaczone B₁, B₂ i B₃. Są to również krótkie sekwencje bogate w pary A—T, lecz nie mają już tak ściśle zachowawczej sekwencji. Zamiany pojedynczych nukleotydów oraz niewielkie insercje lub delecje nie mają większego wpływu na aktywność ARS, natomiast usytuowanie domen B względem domeny A oraz orientacja nukleotydów we wszystkich domenach muszą być zachowane. Rola poszczególnych domen została wyjaśniona dopiero niedawno, po odkryciu białek inicjujących replikację DNA. Drożdżowe białka inicjujące tworzą kompleks zbudowany z 6 (lub 8) różnych polipeptydów o nazwie ORC (ang. origin recognition complex). Kompleks ten wiąże się z domeną A oraz B₁, usytuowaną w odległości 12 par zasad od domeny A, po stronie 3' łańcucha DNA. Przyłączenie się białek ORC do sekwencji ARS powoduje owijanie się nici DNA wokół kompleksu, połączone z silnym jej zginaniem. Powstałe naprężenia rozdzielają nici DNA w obszarze B₂ — miejscu otwarcia widełek. Położona dalej domena B₃ jest miejscem, w którym ulega przyłączeniu aktywator transkrypcji ABF1. W niektórych obszarach ARS podobne miejsca aktywacji występują po obu stronach sekwencji *ori*. Dołączenie się aktywatora (lub aktywatorów) zwiększa wydajność replikacji nawet 1000-krotnie, przy czym dla procesu replikacji istotna jest sama ich obecność; rodzaj promotora odgrywa mniejszą rolę, na przykład wymiana promotora *ABF1* na promotor *GAL4* nie powoduje żadnych różnic w wydajności replikacji. Izolowanie sekwencji ARS razem z towarzyszącymi im białkami wykazało, że zarówno białka ORC, jak i aktywatory transkrypcji dołączają się do DNA jeszcze przed replikacją w fazie G₁. Aktywacja pow-

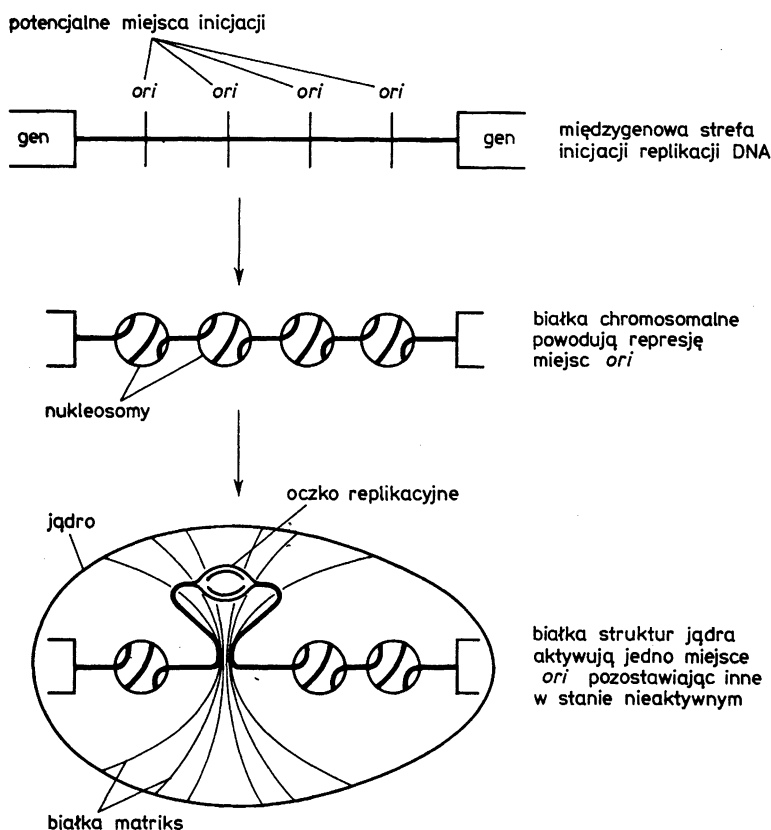


Rys. 3.21. Schemat struktury obszaru inicjacyjnego ARS w genomie drożdżowym

stałych kompleksów zachodzi na przełomie fazy G₁ i S, przez specyficzną wielostopniową fosforylację katalizowaną przez system kinaz cyklu komórkowego. Struktura obszaru ARS przedstawiona jest na rysunku 3.21.

3.2.11. Inicjacja replikacji DNA w komórkach wyższych eukariontów

W DNA komórek wyższych eukariontów nie udało się wykryć sekwencji DNA, które odpowiadałyby sekwencjom ARS. Dokładne badania replikacji DNA zachodzącej w obrębie wybranych genów o znanej sekwencji, jak np. w genie reduktazy dihydrofolianowej czy deaminazy adenozyminy wykazały, że inicjacja replikacji DNA podlega tym samym zasadom co w prostych organizmach jednokomórkowych, jest jednak regulowana w inny sposób. W typowym chromosomie eukariotycznym występują nie tyle miejsca inicjacji co strefy inicjacyjne o długości do 10 000 par zasad. Występują one zawsze w obszarach międzygenowych. Replikacja rozpoczyna się wewnątrz każdej strefy, zawsze w jednym krótkim odcinku DNA o wielkości 200–500 par nukleotydów, chociaż odcinki te mogą występować w różnych miejscach strefy, podczas różnych rund replikacyjnych. Jeśli jednak taką strefę, po wycięciu z chromosomu, podda się replikacji *in vitro*, to wytworzy się na niej cały szereg oczek replikacyjnych równocześnie. Świadczy to, że każda strefa zawiera wiele potencjalnych miejsc inicjacji znajdujących się pod ścisłą kontrolą białek struktury chromatinu i białek szkieletowych macierzy jądrowej (matriks). Wydaje się, że białka struktury chromatinu uniemożliwiają dostęp białek inicjacyjnych do DNA, są więc represorami replikacji, natomiast białka struktur jądrowych promują ekspozycję wybranego miejsca DNA przez rozluźnienie struktury chromatinu w tym obszarze. Umożliwia to przyłączenie się białek inicjacyjnych i otwarcie „oczka” replikacyjnego. Faktory transkrypcyj-



Rys. 3.22. Schemat aktywowania miejsc inicjacji replikacji DNA w genomach wyższych eukariontów przez białka chromatyny i macierzy jądrowej (matriks). Białka chromatynowe i nie zidentyfikowane dotąd białkowe składniki jądrowego matriks powodują represję potencjalnych miejsc *ori* z jednoczesnym zaktwowaniem jednego z nich (w centrum rys.). W miejscu tym rozpoczyna się dwukierunkowa replikacja całego replikonu (wg DePampilis 1993, *Curr. Biol.* 5: 434 — zmodyf.)

ne, oprócz aktywowania widełek replikacyjnych, mogą także pełnić rolę czegoś w rodzaju czynnika licencyjnego dla transkrypcji. Ich obecność w DNA wskazywałaby miejsce rozwijania struktury chromatyny przez czynniki jądrowe. Po odpadnięciu podczas przejścia widełek replikacyjnych, ich brak stanowiłby gwarancję, że replikacja danego replikonu nie powtórzy się podczas tego samego cyklu podziałowego komórki (rys. 3.22).

3.3. Elongacja DNA

Elongacja, podobnie jak inicjacja, wymaga udziału wielu białek enzymatycznych potrzebnych do syntezy nowych cząsteczek DNA. Nie wystarcza do tego tylko aktywność polimerazy DNA; potrzebna jest aktywność topoizomerazy i helikazy do rozwijania i rozdzielania łańcuchów matrycy, białek SSB do utrwalania struktury matryc w obrębie widełek, wreszcie primazy do syntezy

starterowego RNA podczas syntezy fragmentów Okazaki na matrycy nici opóźnionej. Enzymy te tworzą kompleks, który powstaje na początku replikacji i rozpada się po jej zakończeniu; może istnieć tylko w asocjacji ze strukturą widełek replikacyjnych. Kompleks ten został nazwany „replisomem”.

Ażeby wyróżnić te polimerazy, które uczestniczą w syntezie DNA jako składniki kompleksu replikacyjnego, nazywa się je replikazami DNA.

3.3.1. Polimerazy DNA

Wszystkie polimerazy DNA, zarówno te będące replikazami, jak i takie, których rola w metabolizmie komórek nie została ustalona, prokariotyczne i eukariotyczne, katalizują reakcję wydłużania syntetyzowanego łańcucha DNA przez kolejne dołączanie nukleotydów do wolnej grupy 3'-OH tak, że wybór substratu — jednego z czterech trifosforanów deoksyrybonukleotydów zależy zarówno od matrycy, jak i od enzymu, a kierunek syntezy jest zawsze taki sam — 5' → 3'.

Tabela 3.3. W komórkach *E. coli* występują trzy polimerazy DNA

Właściwości	Polimeraza DNA I	Polimeraza DNA II	Polimeraza DNA III
Wielkość	109 000	120 000	> 250 000
Budowa	monomer	monomer	heteromultimer
Liczba cząsteczek na komórkę	400	~ 40	10–20
Aktywność:			
polimeryzacji 5' → 3'	+	+	+
egzonukleazy 3' → 5'	+	+	+
egzonukleazy 5' → 3'	+	–	–
Aktywność względna (w stosunku do Pol. I)	(1)	0,05	15
Geny struktury	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE), dnaN, dnaX, dnaQ</i>
Fenotypy mutacji	naprawa DNA, spadek żywotności tylko po uszkodzeniu egzonukleazy 5' → 3'	naprawa DNA, brak efektów mutacji	zahamowanie replikacji; mutanty tylko warunkowo letalne
Matryce:			
dwuniciowe z pęknięciami	+	–	–
dwuniciowe z dużymi przerwami	+	+	+
jednoniciowe ze starterem	+	–	+
Wierność replikacji:	1 błąd na 10 ⁿ prawidłowo włączonych zasad		
w obecności domeny kontrolnej	5 × 10 ⁷	?	5 × 10 ⁹
przy braku domeny kontrolnej	10 ⁵	?	7 × 10 ⁶

Polimerazy DNA nie wykazują żadnej specyficzności w stosunku do kopiowanych matryc; nie rozróżniają więc sekwencji zasad w łańcuchu matrycowym. Różnią się między sobą budową, szybkością katalizy, procesywnością, czyli zdolnością do wielokrotnego powtarzania reakcji polimeryzacji bez odłączania się od układu matryca–starter, obecnością lub brakiem współdziałających podjednostek białkowych czy aktywności nukleolitycznych, wreszcie wymaganiami w stosunku do struktury matryc, które mogą wykorzystywać. Polimerazy osiągają niezwykłą dokładność w procesie polimeryzacji, dzięki dwóm etapom kontroli. O wyborze dołączanego nukleotydu decyduje matryca, której zasady mogą tworzyć wiązania wodorowe z zasadami dołączanymi przez polimerazę, a enzym rozpoznaje włączenie właściwej zasady jako przyjęcie prawidłowej struktury przestrzennej przez utworzoną parę zasad. Struktura ta jest jeszcze kontrolowana przez towarzyszącą polimerazie egzonukleazę 3' → 5', zwaną egzonukleazą sprawdzającą. Jeśli wystąpi nieregularność, ostatnia zasada zostaje odłączona jako monofosforan; nie może więc dalej brać udziału w reakcji, robiąc miejsce dla trifosforanu właściwego nukleotydu. Aktywność sprawdzająca występuje we wszystkich polimerazach bakteryjnych oraz w tych polimerazach eukariotycznych, które są replikazami. Wpływ aktywności sprawdzającej na dokładność replikacji jest bardzo duży, zwiększa ją aż o trzy rzędy wielkości (p. tab. 3.3).

3.3.2. Bakteryjne polimerazy DNA

W komórkach bakterii stwierdzono obecność trzech polimeraz DNA (tab. 3.4). Polimeraza DNA I została odkryta najwcześniej, jest także najlepiej zbadana. Zbudowana jest z jednego łańcucha peptydowego o 911 resztach aminokwasowych i masie równej 109 000 Da. Występuje w komórkach jako

Tabela 3.4. Porównanie właściwości egzonukleaz 3' → 5' i 5' → 3' polimerazy I DNA

Właściwości	3' → 5'	5' → 3'
Końcowe nukleotydy substratu	specyficzna — rozpoznaje tylko nukleotydy z grupą 3'-OH	niespecyficzna — rozpoznaje mono-, di-, trifosforany 5'-P w DNA lub RNA
Struktura drugorzędowa substratu	jednoniciowy DNA lub niesparowane końce dupletu	sparowane końce dupletu, regiony dwuniciowe obok pętli D
Aktywność endonukleazy	brak	wycina do 8 nukleotydów od końca 5' dupletu
Produkty hydrolizy	tylko mononukleotydy	mononukleotydy (80%) i oligonukleotydy (20%)
Wpływ konkurencyjnej aktywności polimeryzacyjnej	inhibicja	stymulacja 10-krotna
Proponowana funkcja	kontrola dokładności replikacji	wycinanie starterów RNA, naprawa DNA

monomer i w tej formie bierze udział w reakcji polimeryzacji DNA. W centrum aktywnym zawiera jeden atom cynku, jest więc metaloproteidem. W temperaturze 37°C szybkość polimeryzacji wynosi 670 nukleotydów/min na 1 cząsteczkę enzymu. W komórkach *E. coli* występuje w ilości ok. 400 cząsteczek na komórkę. Ponieważ enzym ten odgrywa dużą rolę w inżynierii genetycznej, przez wprowadzenie genu tej polimerazy do komórek za pomocą litycznej formy faga λ , udało się otrzymać komórki produkujące stukrotnie większe ilości tego enzymu (do 40 000 cząsteczek/komórkę). Polimeraza I, mimo prostej budowy, jest enzymem wielofunkcyjnym. Poza aktywnością polimeryzacyjną ma dwie aktywności egzonukleolityczne o kierunkach działania $3' \rightarrow 5'$ i $5' \rightarrow 3'$. Za pomocą łagodnego trawienia trypsyną enzym można rozdzielić na dwa fragmenty. Fragment większy, o nazwie fragmentu Klenowa i masie 68 000 Da, zawiera aktywności polimerazy i egzonukleazy $3' \rightarrow 5'$. Aktywności te są przestrzennie rozdzielone. Rejon o aktywności polimeryzacyjnej, umieszczony przy końcu C peptydu znajduje się w odległości ok. 3 nm od rejonu o aktywności egzonukleazy sprawdzającej $3' \rightarrow 5'$, co świadczy, że procesy przyłączania nukleotydu do łańcucha DNA i jego ewentualnej eliminacji w wyniku kontroli są przestrzennie rozdzielone. Fragment mniejszy (35 000 Da) zachowuje tylko aktywność egzonukleazy $5' \rightarrow 3'$. Zmieszanie w roztworze obu fragmentów przywraca polimerazie I pełną aktywność pierwotną; muszą więc do siebie przylegać i trzymać się razem mimo braku łączącego je wiązania chemicznego. Wydaje się, że obecna postać polimerazy I powstała w wyniku ewolucji z dwóch odrębnych białek, kodowanych przez dwa różne geny. Egzonukleaza $5' \rightarrow 3'$ nie wykazuje specyficzności substratowej, hydrolizuje zarówno DNA, jak i RNA, odcinając jednorazowo od jednego do kilku nukleotydów. Jej brak powoduje zaburzenia we wzroście bakterii, czego nie obserwuje się przy braku fragmentu Klenowa. Porównanie właściwości egzonukleaz $3' \rightarrow 5'$ i $5' \rightarrow 3'$ polimerazy I DNA przedstawione są w tabeli 3.4. Rolą polimerazy I DNA jest usuwanie odcinków starterowych z fragmentów Okazaki oraz wycinanie uszkodzonych odcinków DNA w procesie naprawy. Polimeraza I DNA ma zdolność do rozpoczynania replikacji w układach *in vitro* z dwuniciowych matryc zawierających tylko jedną przerwę w łańcuchu DNA. Enzym, wykorzystując wolny koniec $3'$ -OH w miejscu pęknięcia, syntetyzuje nową nić, zastępując nić istniejącą w dupleksie. Właściwość ta jest wykorzystywana do specyficznego znakowania syntetyzowanej nici i nosi nazwę „nick translation”. Schemat tej reakcji przedstawia rysunek 3.23. W komórkach bakterii polimeraza ta nie bierze udziału w elongacji łańcuchów DNA, nie jest więc replikazą.

Polimeraza DNA II także zbudowana jest z jednego łańcucha peptydowego o masie 120 000 Da. Występuje w liczbie ok. 40 cząsteczek na komórkę. Zawiera tylko jedną aktywność egzonukleolityczną $3' \rightarrow 5'$. Jej roli w metabolizmie DNA nie udało się ustalić, gdyż mutanty *polB*, pozbawione genu tej polimerazy, nie wykazują żadnych zmian fenotypowych. Może stanowić alternatywną drogę uzupełniania luk w nici nieciągłej, z udziałem RNazy H wycinającej startery, lub bierze udział w naprawie DNA. *In vitro* polimeraza ta

Rys. 3.23. Schemat reakcji „nick translation”

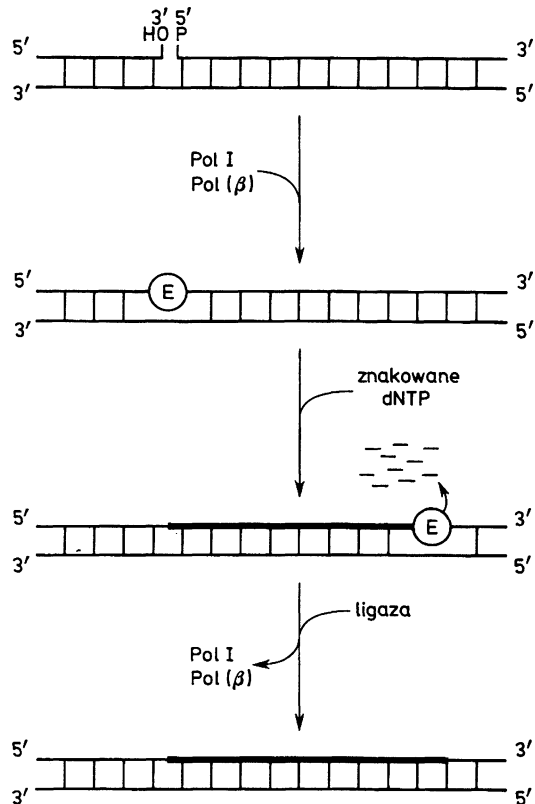


Tabela 3.5. Podjednostki holoenzymu polimerazy DNA III z komórek *E. coli*

Nazwa podjednostki	Masa (Da)	Gen struktury	Funkcja	Nazwy alternatywne
α	132 000	<i>polIC (dnaE)</i>	aktywność polimeryzacyjna	rdzeń polimerazy III polimeraza III'
ϵ	27 500	<i>dnaQ (mutD)</i>	kontrola wierności; aktywna wraz z podjednostką α	
θ	10 000	?	aktywator podjednostki α	
τ	71 000	<i>dnaX</i>	procesywność	kompleks γ polimeraza III*
γ	47 500	<i>dnaX</i>	procesywność,	
δ	35 000	?	współdziałanie z	
δ'	33 000	?	kompleksem pol. III	
χ	15 000	?	w syntezie nici opóźnionej	
ψ	12 000	?		
β	40 600	<i>dnaN</i>	wiązanie enzymu ze starterem-matrycą	holoenzym

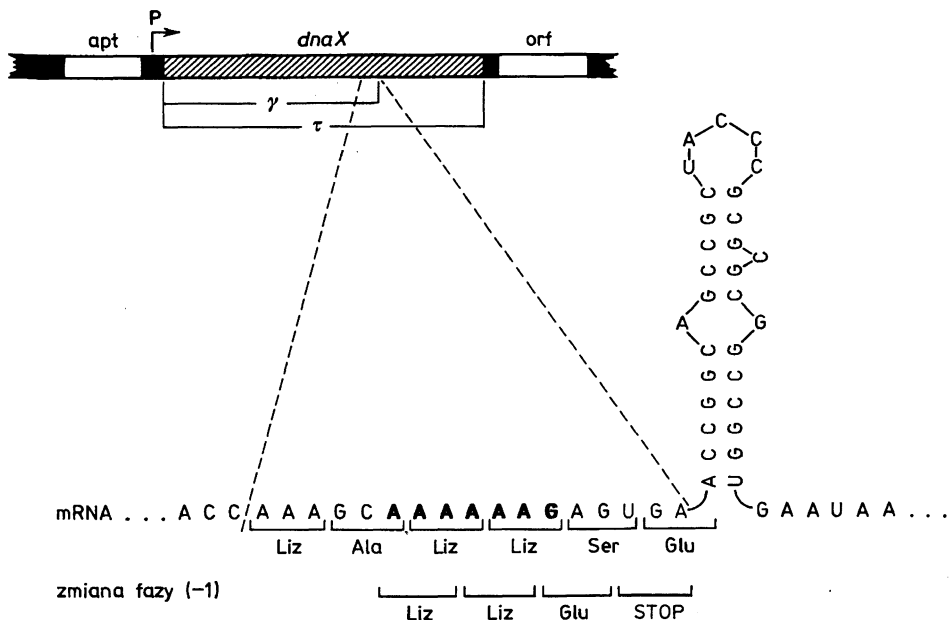
wymaga, jako matrycy, dwuniciowego DNA zawierającego duże luki w jednej z nici. Wymaga obecności białek SSB i udziału ATP.

Polimeraza DNA III jest właściwą replikazą DNA w komórkach bakterii. Występuje w liczbie 10–20 cząsteczek na komórkę, jednakże szybki obrót cząsteczek enzymu w czasie replikacji sprawia, że rzeczywista jej aktywność jest 15 razy większa niż aktywność polimerazy I i aż 300 razy większa niż aktywność polimerazy II. Formą aktywną enzymu jest multimeryczny kompleks, zwany holoenzymem polimerazy III DNA. Skład holoenzymu przedstawia tabela 3.5. Największą podjednostką mającą aktywność polimeryzującą DNA jest podjednostka α , o masie 130 000 Da. Kodowana jest przez gen *polC* (*dnaE*). Z komórek bakterii podjednostkę α wydziela się razem z podjednostkami ϵ i θ , które razem stanowią jednostkę podstawową (rdzeń) enzymu. Podjednostka ϵ jest egzonukleazą sprawdzającą o kierunku działania 3' → 5'. Jest kodowana przez gen *dnaQ*. Oczyszczona do homogenności jest bardzo mało aktywna, ale po połączeniu się z podjednostką α jej aktywność nukleolityczna wzrasta wielokrotnie. Obecność jej jest niezbędna do zachowania dokładności replikacji. Rola niewielkiej pojednostki θ , o masie 10 000 Da nie została wyjaśniona; nieznan jest również jej gen. Rdzeń enzymu wykazuje niską aktywność polimeryzacyjną i bardzo niską procesywność. Ta forma enzymu odłącza się od matrycy po dołączeniu jednego lub najwyżej kilku nukleotydów. Dodanie do rdzenia podjednostki τ , kodowanej wspólnie z podjednostką γ przez gen *dnaX*, powoduje dimeryzację enzymu. Pol III' może już replikować naturalne matryce, np. DNA fagowe, a jego aktywność wzrasta aż 40-krotnie. Jednocześnie wzrasta procesywność enzymu (tab. 3.6). Podjednostka τ jest ATPazą zależną od jednoniciowego DNA i ma właściwość porządkowania struktury jednoniciowego DNA, np. rozwijania struktury „szpilki do włosów”.

Tabela 3.6. Procesywność polimerazy III DNA wzrasta wraz ze wzrostem liczby podjednostek

Skład	Nazwa	Procesywność (liczba dołączonych nukleotydów/dysocjacje)
$(\alpha, \epsilon, \theta)$	rdzeń polimerazy III	1–10 (–)
$(\alpha, \epsilon, \theta)_2 \tau_2$	polimeraza III'	60 (spermidyna)
$(\alpha, \epsilon, \theta)_2 \tau_2 \gamma_2 (\delta, \delta', \chi, \psi)_2$	polimeraza III*	200 (SSB)
$(\alpha, \epsilon, \theta)_2 \tau_2 \gamma_2 (\delta, \delta', \chi, \psi)_2 (\beta_2)_2$	holoenzym	10 ⁵ (SSB)

Kolejna, jeszcze większa, chociaż wciąż niekompletna forma enzymu nosi nazwę polimerazy III*. Zawiera dwie dalsze podjednostki γ i δ , dołączone w formie dimeru. Podjednostki γ i τ powstają ze wspólnego mRNA w wyniku wykorzystania przez rybosomy specyficznej mutacji typu frameshift do wcześniejszej terminacji translacji. Miejsce to charakteryzuje się specyficznym układem 6 kolejnych nukleotydów adeninowych poprzedzających trwałą strukturę „szpilki do włosów”. W takich miejscach rybosomy zatrzymują się i łatwo mogą zmienić fazę odczytu, trafiając na sygnał stop (UGA), co powoduje



Rys. 3.24. Struktura mRNA genu *dnaX* kodującego podjednostki τ i γ holoenzymu polimerazy III DNA. Sekwencja zasad 1420–1436 umożliwiającą zmianę fazy odczytu

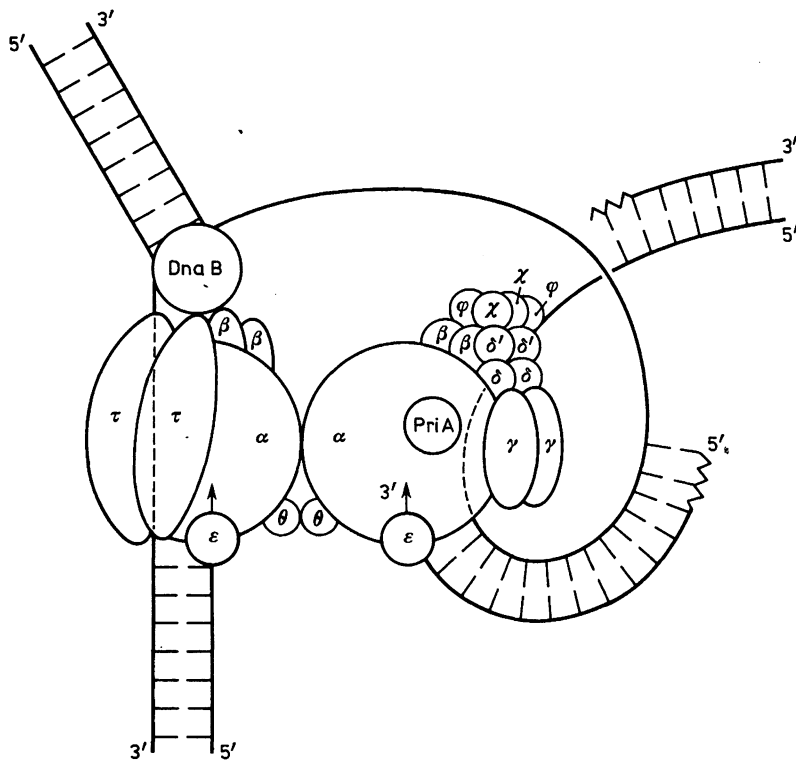
przedwczesną terminację i w efekcie syntezę krótszej podjednostki γ zamiast dłuższej τ (rys. 3.24).

Podjednostkom γ_2 , δ_2 towarzyszy podjednostka δ' (izo δ) oraz dwie małe podjednostki χ i ψ . Dołączenie się kolejnej podjednostki β , produktu genu *dnaN*, przekształca polimerazę III* w strukturę właściwą dla replikazy — holoenzym polimerazy III. Podjednostka β występuje w komórce w dużym nadmiarze w porównaniu do innych podjednostek. Jej rola polega na rozpoznaniu struktury starter-matryca, z którą się wiąże. Do niej dołączają się pozostałe składniki holoenzymu. Bierze także udział w przemieszczaniu się holoenzymu na nowe miejsce matrycy. Formowanie się holoenzymu jest procesem stosunkowo powolnym, *in vitro* tysiąckrotnie wolniejszym od reakcji polimeryzacji, a ponadto wymaga dopływu energii w postaci ATP. Jednak utworzony kompleks staje się trwały, wykazuje procesywność praktycznie nieograniczoną, a po dotarciu do końca 5'-P nowego startera może bez oddysocjowania przesunąć się bardzo szybko na jego koniec 3'-OH, do dołączonej tam wcześniej podjednostki β .

3.3.3. Asymetryczna budowa holoenzymu polimerazy III DNA

Występowanie holoenzymu polimerazy III DNA w formie dimeru nasunęło przypuszczenie, że katalizowanie syntezy obu nici DNA, prowadzącej i opóźnionej, może zachodzić w obrębie jednego kompleksu enzymatycznego. Stało

się to tym bardziej prawdopodobne po stwierdzeniu związania jednoniciowego DNA w pętlę w miejscu inicjacji syntezy starterów, co zmienia kierunek przesuwania się matrycowej nici DNA względem polimerazy o 180°. Trudniejszą kwestią do zrozumienia była konieczność zmiany procesywności polimerazy DNA w obrębie jednego kompleksu. Pytanie — w jaki sposób ten sam kompleks polimerazy DNA jednocześnie zachowuje bardzo wysoką procesywność konieczną podczas syntezy nici prowadzącej oraz traci ją podczas przechodzenia z jednego startera na drugi w czasie syntezy kolejnych fragmentów Okazaki — znalazło wyjaśnienie dopiero niedawno. Okazało się, że dimer holoenzymu polimerazy III DNA nie jest identyczny w swoich obu częściach, różniąc się składem podjednostek (rys. 3.25).



Rys. 3.25. Hipotetyczny obraz asymetrycznej struktury dimeru holoenzymu polimerazy III DNA w obszarze widełek replikacyjnych (wg A. Kornberga, *DNA Replication*. 1992)

Kolejność powstawania dimeru jest następująca. Jako pierwsze wiążą się z DNA podjednostki β_2 , rozpoznając układ starter–matryca. Następnie, z udziałem ATP, dołączają się podjednostki τ_2 (ATP)₂ lub $\delta_2\gamma_2$ (ATP)₂ kierujące przyłączeniem się rdzenia enzymu, czyli trimeru katalitycznego (α , ϵ , θ), czemu towarzyszy odłączenie się 2 cząsteczek ADP. Obecność podjednostki τ zapewnia holoenzymowi wysoką procesywność, a podjednostek $\delta_2\gamma_2$ oraz (δ' ,

$\chi, \psi)_2$ — zdolność do przyłączenia helikazy PriA oraz znacznie mniejszą procesywność, umożliwiającą przeskok z jednej matrycy na drugą. W ten sposób za syntezę nici prowadzącej odpowiada jedna część dimeru z podjednostką τ_2 , a za syntezę nici opóźnionej — część druga z podjednostkami $\delta_2 \gamma_2$ oraz $(\delta', \chi, \psi)_2$. Podjednostka β charakteryzuje się zdolnością do ślizgania się wzdłuż dwuniciowego DNA oraz do silnego wiązania się z jednoniciowym DNA. Może więc łatwo odłączać się od już zsyntetyzowanego DNA i przyłączać się do jednoniciowej matrycy tuż za nowym starterem, ułatwiając przesunięcie się kompleksu polimerazy DNA na nowe miejsce syntezy. W ten sposób połowa dimeru z podjednostką τ będzie stale związana z matrycą nici prowadzącej, podczas gdy druga połowa będzie w sposób periodyczny odłączać się od matrycy, żeby przeskoczyć kolejny starter, nie powodując przy tym rozpadu kompleksu replikacyjnego.

3.3.4. Polimerazy DNA komórek eukariotycznych

Elongacja DNA w komórkach eukariotycznych, różniąc się tylko w szczegółach, podlega tym samym zasadom co omówiona wyżej elongacja DNA komórek bakteryjnych. Synteza starterów katalizowana jest tylko przez eukariotyczne primazy, występujące z reguły w kompleksach z polimerazą DNA α . Jedynym znanym wyjątkiem jest omówiona wcześniej inicjacja replikacji DNA mitochondrialnego. Startery RNA mają zawsze taką samą długość — 10 nukleotydów, natomiast dowolną sekwencję, co wskazuje, że miejsca syntezy starterów nie są określane przez sekwencje matrycy. Fragmenty Okazaki są krótkie, zwykle nie przekraczają odległości dzielącej nukleosomy. Komórki eukariotyczne, podobnie jak komórki bakteryjne, zawierają po kilka rodzajów polimeraz DNA, z których tylko tzw. polimerazy klasy α są rzeczywistymi replikazami DNA. Oprócz nich, w komórkach występują specyficzne polimerazy DNA organelli komórkowych — mitochondriów i chloroplastów oraz polimerazy DNA zaangażowane w naprawę DNA. Podstawowe właściwości polimeraz eukariotycznych przedstawia tabela 3.7.

W skład polimeraz, stanowiących rzeczywiste replikazy DNA, wchodzi trzy odrębne enzymy; wszystkie są niezbędne w replikacji jądrowego DNA. Najdawniej odkrytą i do niedawna uważaną za jedyną replikazę jest polimeraza DNA α . Polimeraza ta nie ma aktywności egzonukleazy sprawdzającej $3' \rightarrow 5'$, natomiast zawsze towarzyszą jej dwie podjednostki zawierające aktywność primazy. Obecnie uważa się, że rola polimerazy α ogranicza się do syntezy starterów i towarzyszących im krótkich odcinków DNA, które są następnie wycinane razem z RNA. W komórkach drożdży polimeraza ta jest kodowana przez gen *POL1* (*CDC17*), a dwie podjednostki primazy — przez geny *RP11* i *RP12*.

Drugą w kolejności odkrycia jest polimeraza DNA δ . Polimeraza ta wykazuje charakterystyczną zależność aktywności od obecności specyficznego czynnika podziałów komórkowych — białka PCNA (ang. proliferating cell

Tabela 3.7. Komórki eukariotyczne mają więcej polimeraz DNA niż komórki bakterii

	Polimerazy DNA				
	α	δ	ϵ	β	γ
Miejsce działania	jądro	jądro	jądro	jądro	mitochondria
Nazwa dawniejsza	α	δ, δ_1	$\delta, \delta_2, \delta_{II}$	β	γ
Geny drożdżowe	<i>POL1</i> (<i>CDC17</i>)	<i>POL3</i> (<i>CDC2</i>)	<i>POL2</i>	<i>POLX*</i>	<i>MIP1</i>
Funkcja	replikacja, synteza starterów	replikacja	replikacja	naprawa DNA	replikacja mitochon- drialnego DNA
Wielkość (kDa)	> 250	170	256	40 (60)	160–300
Podjednostki katalityczne	165–180	125	215	40 (60)**	125
towarzyszące	70, 58, 48	48	55	brak	35, 47
Procesywność	niska	zależna od PCNA	wysoka	niska	wysoka
Aktywność egzonuk- leazy 3' → 5'	brak	obecna	obecna	brak	obecna
Aktywność primazy	obecna	brak	brak	brak	brak
Wierność replikacji	wysoka	wysoka	wysoka	niska	wysoka
Polarność helikazy/ ATPazy stymulującej aktywność	3' → 5'	5' → 3'	3' → 5'	—	—

* Nazwa tymczasowa nowo odkrytego genu.

** Masa drożdżowej polimerazy β DNA.

nuclear antigen). Zależy od niego także procesywność enzymu. Polimeraza ta zbudowana jest z dwóch podjednostek o masach 125 000 i 48 000 Da. Podjednostka większa wykazuje oprócz aktywności syntetyzującej DNA, także aktywność egzonukleazy sprawdzającej 3' → 5'. W komórkach drożdży kodowana jest przez gen *POL3* (*CDC2*).

Trzecią polimerazą replikacyjną jest polimeraza DNA ϵ . Jej aktywność również zależy od obecności PCNA, chociaż charakteryzuje się wysoką procesywnością także przy braku tego antygeny. W jej skład, podobnie jak w przypadku dwóch pozostałych polimeraz DNA, wchodzi wiele podjednostek białkowych, z których największa zawiera oprócz aktywności syntetyzującej DNA, także aktywność egzonukleazy sprawdzającej 3' → 5'. Wszystkie trzy polimerazy DNA mają wspólne sekwencje aminokwasowe centrów katalitycznych dużych podjednostek, dlatego noszą nazwę polimeraz klasy α . W komórkach proliferujących ich aktywności wzrastają równomiernie, a brak któregośkolwiek z tych enzymów jest dla komórek letalny. Występują powszechnie we wszystkich organizmach eukariotycznych. W komórkach eukariotycznych wykryto jeszcze inne polimerazy DNA. Należą do nich polimeraza DNA β i γ . Polimeraza DNA β jest najmniejszą ze wszystkich polimeraz eukariotycznych, o masie cząsteczkowej ok. 40 000 Da. Nie zawiera egzonukleolitycznej aktywności sprawdzającej 3' → 5', a jej aktywność nie podlega zmianom w zależności od cyklu podziałowego komórki. W obecności DNazy V, z którą tworzy

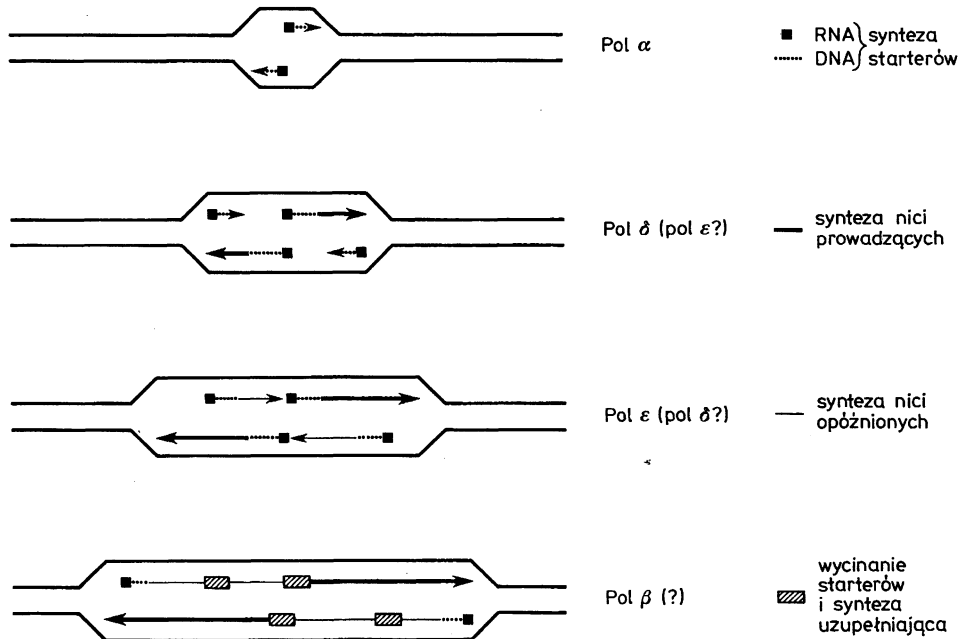
wspólne kompleksy, jest zdolna do reakcji „nick translation” z podobną wydajnością jak polimeraza I DNA z komórek *E. coli*. Ostatnio wykryto ją również w drożdżach; dotychczas wydawało się, że są one pozbawione tej polimerazy. Przypisuje się jej rolę w naprawie DNA.

Polimeraza DNA γ zbudowana jest, podobnie jak polimeraza β , z jednego polipeptydu. Odpowiada za replikację DNA mitochondrialnego i chloroplastowego wg odrębnego mechanizmu omówionego wcześniej.

W komórkach drożdży ostatnio wykryto jeszcze inną polimerazę DNA, produkt genu *REV3*, odpowiedzialną za tzw. naprawę mutageną. Jej brak nie powoduje efektów letalnych, nie bierze więc udziału w replikacji DNA. Przypisuje się jej również rolę w naprawie DNA. W komórkach innych eukariontów podobnej polimerazy jeszcze nie znaleziono.

3.3.5. Budowa eukariotycznych widełek replikacyjnych

W replikację genomów eukariotycznych zaangażowane są wszystkie trzy replikazy DNA, α , δ , i ϵ . Mogą one wspólnie utworzyć asymetryczny kompleks replikacyjny (replisom), w którym polimeraza α rozpoczyna replikację w miejscu inicjacji przez syntezę startera nici ciągłej i krótkiego odcinka DNA z nim związanego. Następnie za replikację tej nici odpowiada polimeraza ϵ (lub δ ?). Replikację nici opóźnionej również rozpoczyna polimeraza α , odpowiadając za syntezę starterów dla fragmentów Okazaki. Wydłużanie tych fragmentów

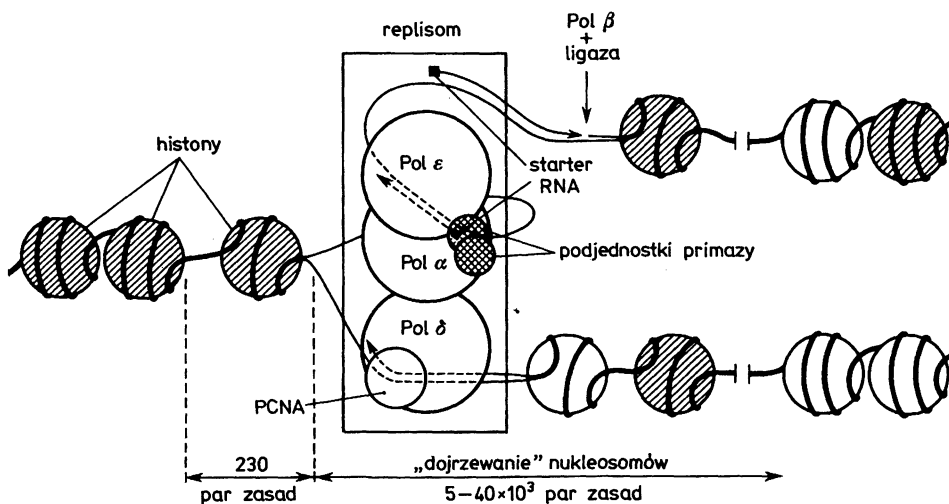


Rys. 3.26. Prawdopodobne funkcje eukariotycznych polimeraz DNA w procesie replikacji

najprawdopodobniej katalizowane jest przez polimerazę δ ze względu na możliwość regulowania jej procesywności za pomocą PCNA. Oprócz PCNA w replikacji uczestniczą także inne białka wspomagające, wśród nich — stosunkowo dobrze poznany aktywator replikacji A1. Proponowany udział poszczególnych polimeraz w replikacji przedstawia rysunek 3.26.

3.3.6. Udział histonów w replikacji

DNA w komórkach eukariotycznych przyjmuje zawsze strukturę nukleosomową, zarówno w obszarach nie zreplikowanych, jak i w obrębie replikującego się „oczka”. Zahamowanie syntezy histonów powoduje zawsze zahamowanie replikacji. Ponieważ w czasie replikacji ilość DNA ulega podwojeniu, ilość histonów również musi ulegać podwojeniu. Sposób podziału histonów między powstające cząsteczki DNA był długo nieznan. Dzisiaj przyjmuje się, że w obrębie widełek histony ulegają dysocjacji i tworzą wspólną pulę z histonami nowo zsyntetyzowanymi. Po przejściu widełek dołączają się do obu nici zsyntetyzowanego DNA w sposób dowolny, bez rozróżniania histonów starych od nowych, tworząc strukturę, w której pierwszy nukleosom na nici wyprzedzającej powstaje w odległości ok. 110–125 nukleotydów od początku widełek, a na nici opóźnionej — ok. 350 nukleotydów, przy czym odstęp między nukleosomami są większe niż w niciach nie zreplikowanych. Może to stanowić jeden z sygnałów zabezpieczających dane fragmenty DNA przed przedwczesną powtórą replikacją. Strukturę pierwotną nukleosomy osiągają dopiero w odległości ok. 40 000 nukleotydów od początku widełek (rys. 3.27).



Rys. 3.27. Schemat budowy widełek replikacyjnych w chromosomach komórek eukariotycznych

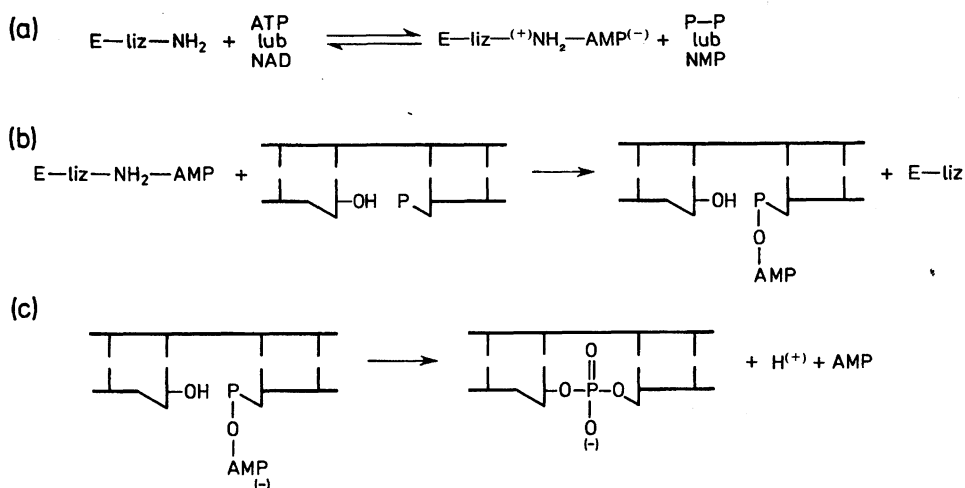
3.3.7. Białka wspomagające replikację

1) Ligazy polinukleotydowe. Ligazy katalizują syntezę wiązania fosfodiesterowego między sąsiadującymi resztami 3'-OH i 5'-P nukleotydów połączonych wiązaniami wodorowymi z matrycową nicią DNA. W czasie replikacji łączą fragmenty Okazaki w jedną długą nić. Ligazy bakteryjne wymagają obecności NAD jako koenzymu i źródła energii. Ligazy wszystkich eukariontów oraz bakteriofagów *T4* i *T7* wykorzystują do tego celu ATP. Reakcja przebiega trójstopniowo:

(a) aktywowanie enzymu przez utworzenie wiązania między NAD lub ATP z resztą aminową ε lizyny obecną w cząsteczce enzymu. Uwalnia się NMP lub pirofosforan;

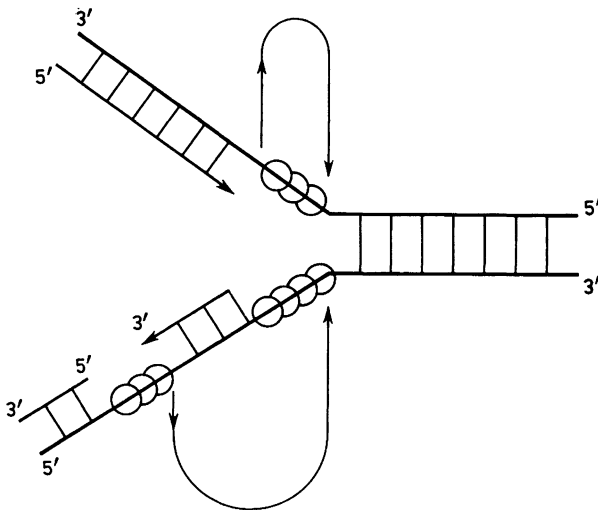
(b) dołączenie zaktywowanego enzymu do końca 5'-P łańcucha DNA w miejscu jego przerwania;

(c) wytworzenie wiązania fosfodiesterowego między końcem 3'-OH i zaktywowanym końcem 5'-P z uwolnieniem enzymu i AMP (rys. 3.28).



Rys. 3.28. Schemat działania ligazy. Łączenie przerw w łańcuchach DNA wymaga udziału ATP (ligazy eukariotyczne) lub NAD (ligazy bakteryjne). (a), (b), (c) — kolejne etapy reakcji

Ligazy bakteryjne i fagowe zbudowane są z jednego łańcucha peptydowego i mają charakterystyczny, wydłużony kształt cząsteczki. W ligazowych mutantach termowrażliwych, w temperaturze restrykcyjnej, nagromadzają się liczne, krótkie fragmenty DNA, co świadczy, że brak ligazy nie blokuje replikacji. W komórkach bakterii liczba cząsteczek ligazy odpowiada liczbie cząsteczek polimerazy I DNA, co sugeruje ścisłe współdziałanie tych enzymów w replikacji. W komórkach eukariontów występują co najmniej dwie ligazy różniące się wielkością, lecz o takiej samej funkcji. W komórkach drożdży znany jest gen kodujący ligazę I (*CDC9*).



Rys. 3.29. Schemat przemieszczania się białek SSB w obszarze widełek replikacyjnych

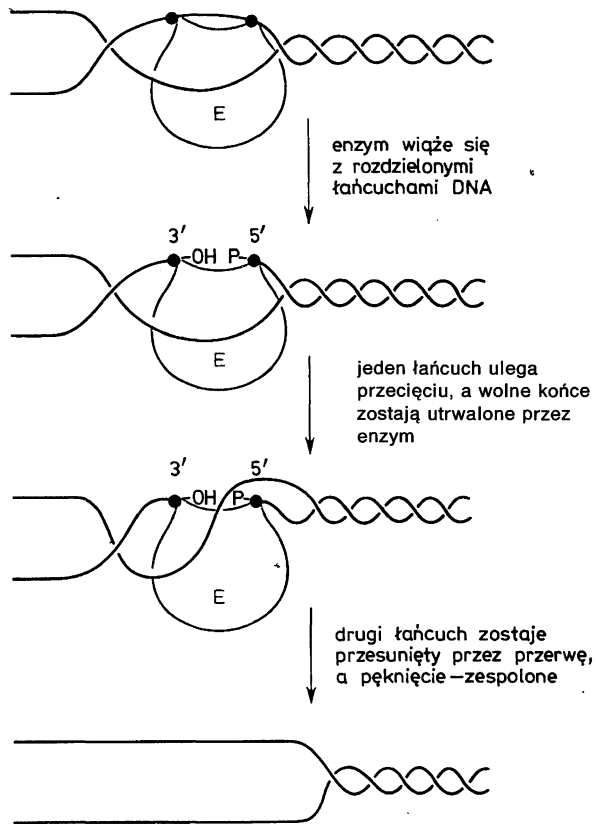
2. Białka stabilizujące jednoniciową strukturę DNA. Białka te — SSB (ang. single-strand binding proteins) wykazują silne powinowactwo do jednoniciowego DNA. Wiążą się z DNA w stosunku stechiometrycznym i współdziałają ze sobą tak, że pokrywają cały obszar szkieletu fosfocukrowego łańcucha, pozostawiając zasady sterzące na zewnątrz. W czasie replikacji ulegają przemieszczaniu z jednych odcinków matrycy na inne, co zwiększa stopień ich wykorzystania (rys. 3.29). Charakteryzują się dużą specyficznością oraz zdolnością do współdziałania z innymi białkami, co czyni je niezbędnymi we wszystkich procesach metabolizmu DNA. Białka SSB komórek *E. coli* występują w formie tetramerów o bardzo trwałej strukturze, z których każdy pokrywa 36-nukleotydowy odcinek DNA o dowolnej sekwencji. Białka SSB komórek ludzkich (RF-A) i innych eukariontów zbudowane są z trzech podjednostek. Eukariotyczne białka SSB współdziałają z polimerazami DNA, zwiększając aktywność inicjacyjną polimerazy DNA α oraz procesywność polimeraz δ i ϵ . Wiele bakteriofagów i wirusów zawiera geny swoistych białek SSB, niezbędnych w replikacji ich genomów.

3. Helikazy — białka rozwijające podwójny heliks DNA. Helikazy wykorzystują energię hydrolizy ATP do zmiany kształtu swojej cząsteczki, podobnie jak białka mięśniowe, co umożliwia im wykonywanie pracy mechanicznej. Mogą posuwać się wzdłuż dwuniciowego DNA, rozdzielając nici i poszerzając widełki replikacyjne, lub wzdłuż jednoniciowej matrycy, umożliwiając polimeryzację DNA (np. białko PriA primosomu). Enzymy te należą do dużej grupy ATPaz, których zmiany konformacyjne, zależne od energii pobieranej przy hydrolizie ATP, mają ogromne znaczenie w przenoszeniu energii we wszystkich systemach biologicznych. Helikazy mają określony kierunek działania: łączą się w sposób specyficzny z jednym ramieniem widełek, działając albo w kierunku $5' \rightarrow 3'$ albo $3' \rightarrow 5'$. *In vivo* oba typy helikaz współdziałają ze sobą, zapewniając płynny ruch widełek do przodu.

4. Topoizomerazy relaksują skręcenie podwójnego heliksu. Schematyczny, płaski obraz widełek replikacyjnych nie uwzględnia skręcenia nici wzdłuż osi heliksu. W rzeczywistości rozłączenie nici DNA musi spowodować jeden pełny obrót podwójnej nici DNA na każde 10 rozłączonych par zasad. Zapewnienie ciągłego ruchu widełek replikacyjnych spowodowałoby obracanie się całego chromosomu z wielką szybkością. W rzeczywistości obroty chromosomów sterowane są przez enzymy działające jak „odwracalne nukleazy”. Przez nacinanie i łączenie nici DNA umożliwiają one obroty tylko niewielkich odcinków chromosomu. Każda reakcja nacinania i łączenia pozwala na jeden swobodny obrót. Topoizomerazy dzieli się na dwie grupy:

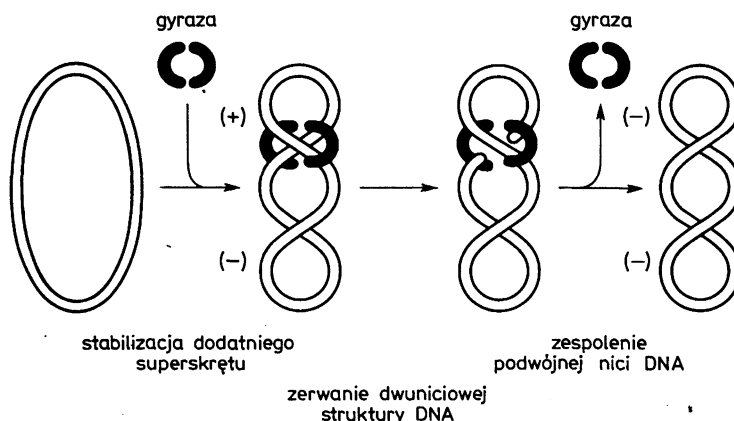
- (I) enzymy nacinające tylko jedną nić podwójnego heliksu;
- (II) enzymy nacinające obie nici DNA jednocześnie.

Najlepiej poznanym enzymem grupy (I) jest topoizomeraza *E. coli*, produkt genu *topA*. Enzym reaguje z DNA zwinionym w zwoje ujemne, tworząc kompleks z DNA, w którym jedna nić ulega przecięciu, a enzym przez resztę tyrozynową wiąże się z wolną grupą fosforanową 5'-P wiązaniem wysokoenergetycznym. Druga nić DNA ulega stabilizacji przez resztę cząsteczki białkowej enzymu. Po kontrolowanym obrocie przeciętej nici, relaksującym



Rys. 3.30. Schemat działania topoizomerazy I. Enzym katalizuje reakcję relaksowania zwojów podwójnego heliksu tuż przed otwartymi widełkami replikacyjnymi

dupleks, następuje odtworzenie wiązania fosfodiesterowego w DNA i uwolnienie enzymu. Enzym wiąże się tylko do miejsc o już rozdzielonych łańcuchach, musi więc działać bardzo blisko widełek replikacyjnych (rys. 3.30). Ponieważ w czasie obrotu nić nie przecięta ulega przesunięciu przez powstałą przerwę na drugiej nici, enzym może łączyć ze sobą kolisty DNA w struktury zaplecione na kształt ogniwo łańcucha. Rola takich struktur DNA w komórce jest nieznana. Topoizomerazy grupy (I) komórek eukariotycznych mogą reagować zarówno z dupleksem DNA zwiniętym w zwoje o kierunku ujemnym, jak i dodatnim. Ich działanie relaksujące jest odmienne. Zamiast przesuwania nici nie rozciętej przez utworzoną przerwę, enzym ułatwia obrót nici przeciętej wokół nici komplementarnej, a następnie dokonuje ligacji powstałej przerwy.



Rys. 3.31. Schemat działania gyrazy w procesie zmiany kierunku skrętu superheliksu

Topoizomerazy grupy (II) mogą nie tylko powodować relaksację skręceń dodatnich i ujemnych w DNA, lecz mogą także powodować powstawanie nowych skręceń lub zmieniać np. skręcenia dodatnie w ujemne. Przykładem takiego działania może być zmiana kierunku skrętu superspirali przez topoizomerazę *E. coli* — gyrazę, w cząsteczce kolistego DNA (rys. 3.31). Reakcja wymaga dopływu energii w postaci ATP, a jej szybkość wynosi ok. 100 zwojów/min na jedną cząsteczkę enzymu. Gyraza jest tetramerem zbudowanym z dwóch dimerowych podjednostek α_2 , β_2 . Ich charakterystyka przedstawiona jest w tabeli 3.8. Enzym rozpoznaje w DNA konfigurację skrzyżowanych nici, nie wykazując specyficzności do zasad. Inhibicja aktywności gyrazy przez antybiotyki powoduje zahamowanie replikacji, co świadczy o jej niezbędności w zapewnieniu swobodnego ruchu widełek. Mechanizm działania gyrazy jest podobny do działania topoizomeraz grupy (I). Podjednostki α tetrameru przecinają nici DNA z zachowaniem energii wiązań w formie wysokoenergetycznych połączeń fosfotyrozynowych. Podjednostki β powodują zmiany topologiczne w DNA z udziałem ATP. Gyraza katalizuje następujące reakcje:

Tabela 3.8. Właściwości gyrazy DNA z komórek *E. coli*

Właściwości	Podjednostka	
	α	β
Wielkość Da	105 000	95 000
Gen struktury	<i>gyr A (nalA)</i>	<i>gyrB (cou)</i>
Inhibitory aktywności	kwasy nalidyksynowy (NAL) kwasy oksolinowy (OXO)	kumermycyna (COU) nowobiocyna (NOV)
Aktywność przecinania i łączenia DNA	+	-
Aktywność ATPazy	+	+

(a) zwijanie kołowych, zrelaksowanych cząsteczek DNA w superheliksy o ujemnym kierunku skrętów; udział biorą obie podjednostki;

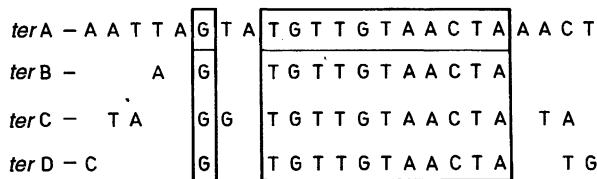
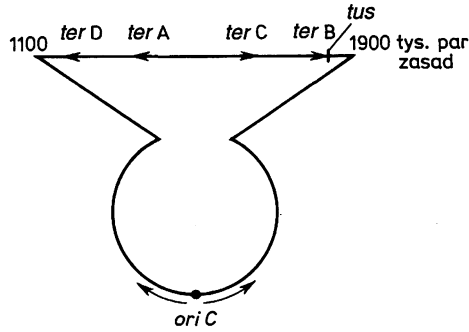
(b) relaksowanie superspirali DNA; udział bierze tylko podjednostka α_2 , a więc reakcja nie wymaga dopływu energii z hydrolizy ATP;

(c) hydroliza ATP w obecności DNA; reakcja wiąże się z procesem zwijania DNA w superheliksy i jest katalizowana przez pojednostki β_2 ;

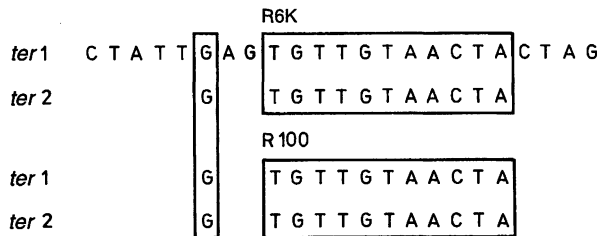
(d) zaplatanie dwuniciowych kolistych cząsteczek DNA jak ogniwa łańcucha (katenacja) i rozplatanie katenatów w obecności ATP; udział biorą obie podjednostki.

3.4. Terminacja replikacji

Końcowy etap replikacji wymaga połączenia powstałego DNA w kompletne chromosomy i rozdzielenia ich między komórki potomne. Mechanizm rozdziału chromosomów eukariotycznych nie został jeszcze w pełni wyjaśniony, i nie będziemy się nim tu zajmować. Terminacja replikacji w komórkach bakterii znajduje się pod kontrolą specyficznego mechanizmu. Miejsce terminacji w kolistym chromosomie bakteryjnym znajduje się dokładnie naprzeciwko miejsca inicjacji (*oriC*) i obejmuje obszar 800 par zasad. Występują tam 4 sekwencje nukleotydowe, nazwane *ter*, po dwie na każdym ramieniu chromosomu, ułożone w ten sposób, że sekwencje nukleotydowe jednego ramienia są dokładnie przeciwstawne sekwencjom ramienia drugiego i znajdują się w tej samej odległości od osi symetrii. Sekwencje te, o dopuszczalnych tylko bardzo niewielkich zmianach w składzie nukleotydów, są miejscami wiązania białka terminacyjnego, produktu genu *tus*, które jest supresorem replikacji. Hamujące działanie miejsc *ter* przedstawia rysunek 3.32. Widełki poruszające się zgodnie z ruchem wskazówek zegara prześlizgują się swobodnie przez miejsca *terD* i *terA*, a są zatrzymywane przez *terC* i *terB*. Natomiast widełki poruszające się w kierunku przeciwnym prześlizgują się przez *terB* i *terC*, a są zatrzymywane przez *terA* i *terD*. W ten sposób, jeśli ruch widełek jakiegokolwiek ramienia zostanie opóźniony, terminacja i tak zakończy się zawsze w obszarze terminalnym. Gen kodujący białko *tus* o masie 36 000 Da jest oddalony tylko o 10 par zasad od miejsca *terB*, co świadczy o jego autore-



plazmidy mają po dwie sekwencje *ter*

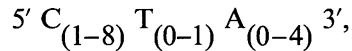


Rys. 3.32. Budowa obszaru terminacji replikacji DNA w replikonie *E. coli*

gulacji, gdyż przyłączenie się cząsteczki białka do tego miejsca hamuje transkrypcję genu *tus*. Białko *tus* jest inhibitorem helikazy DnaB o kierunku działania 5' → 3', zgodnym z ruchem widełek. Helikazy o kierunku działania 3' → 5', przeciwnym do ruchu widełek są hamowane bardzo słabo. Podobne systemy terminacji wykryto u *Bacillus subtilis* oraz w niektórych plazmidach bakteryjnych, w których występują zwykle tylko dwie sekwencje terminalne.

W komórkach eukariontów replikony, których jest wiele w każdym chromosomie, nie mają sekwencji terminalnych ani żadnych systemów służących do regulowania terminacji. Replikacja każdego replikonu kończy się w momencie fizycznego zetknięcia się widełek podążających ku sobie z przeciwnych kierunków. Inaczej jednak wygląda sytuacja z zakończeniem syntezy chromosomów. W odróżnieniu od kolistych chromosomów bakteryjnych, chromosomy eukariotyczne zbudowane są z liniowych cząsteczek DNA, zakończonych bardzo charakterystycznymi sekwencjami nukleotydowymi, nazwanymi telomerami.

Są to krótkie, wielokrotnie powtarzające się odcinki DNA o sekwencji dającej się ująć wspólnym wzorem:



występujące we wszystkich organizmach (tab. 3.9). Charakterystyczną cechą indywidualnych telomerów jest ich zmienność. Chociaż liczba powtarzających

Tabela 3.9. Sekwencje nukleotydomowe powtarzających odcinków telomerowego DNA

Nazwa gatunku	Sekwencje powtarzalnych odcinków DNA (5' → 3')
<i>Tetrahymena, Paramecium</i>	C C C C A A—C C C C A A. . .
<i>Stylonychia, Oxytricha</i>	C C C C A A A A—C C C C A A A A. .
<i>Trypanosoma</i>	C C C T A—C C C T A. . .
<i>Physarum</i>	C C C T A—C C C T A. . .
<i>Saccharomyces</i>	C ₍₂₋₃₎ A (C A) ₍₁₋₃₎ . . .
<i>Arabidopsis</i>	C ₍₃₎ T A ₍₃₎ . . .
<i>Homo sapiens</i>	C ₍₃₎ T A ₍₃₎ . . .

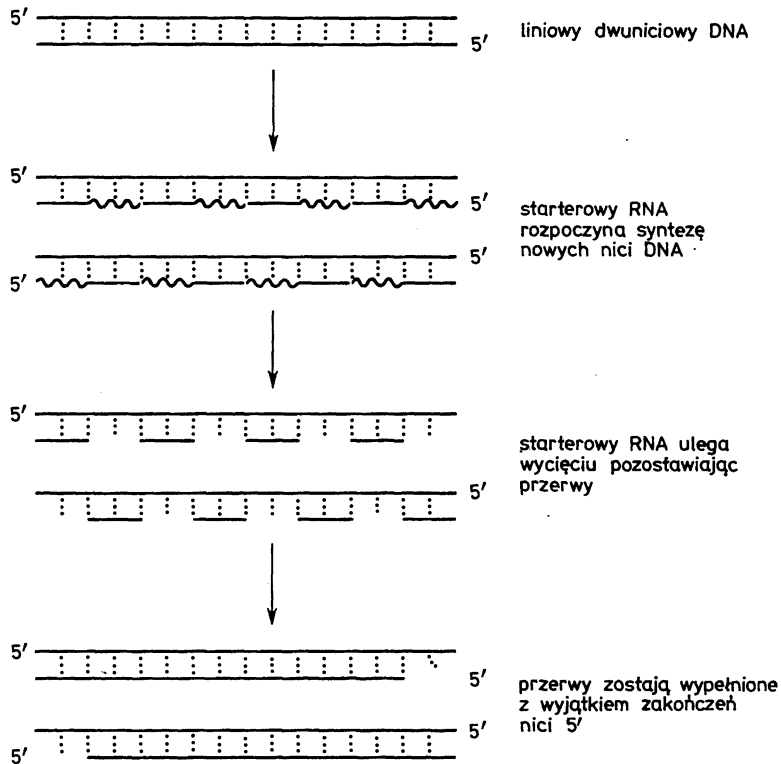
Przedstawione sekwencje dotyczą nici komplementarnych telomerów, mierzonych od końca chromosomu, w kierunku jego środka.

się odcinków w różnych chromosomach tego samego gatunku jest różna, a nawet w obrębie tych samych chromosomów może się różnić w zależności od warunków wzrostu komórek, to średnia długość telomerów w danym organizmie jest utrzymywana na stałym poziomie, co świadczy, że znajdują się one pod kontrolą genetyczną, która zabezpiecza organizm przed ich nadmiernym wydłużaniem lub skracaniem. Ponieważ obecność telomerów w chromosomach jest niezbędna, przypisuje się im następujące funkcje:

(a) udział w terminacji replikacji chromosomalnego DNA, co zapewnia utrzymanie niezmiennych długości właściwych genomów. Bez nich chromosomy ulegałyby skracaniu przy każdym nowym cyklu replikacyjnym o odcinki równe długości końcowych starterów RNA, niemożliwych do uzupełnienia przez polimerazy DNA (rys. 3.33).

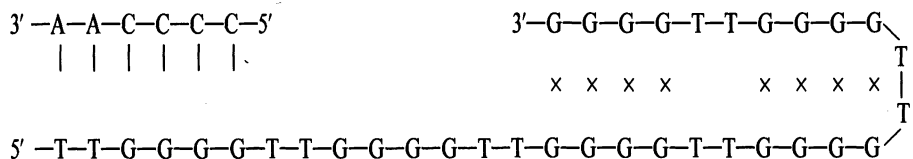
(b) stabilizacja i ochrona chromosomalnego DNA przed działaniem nukleaz i przed łączeniem się z innymi chromosomami, na co, mając lepkie końce, są szczególnie narażone. Są więc ich swoistą ochronną czapczką.

Synteza telomerów zachodzi w sposób zupełnie odmienny od syntezy pozostałej części chromosomalnego DNA. Łańcuchy DNA zakończone resztą 3'-OH są bogate w guaninę. Za ich syntezę odpowiada telomeraza, duży nukleoproteid o masie 200 000–500 000 Da, zawierający w centrum aktywnym cząsteczki białkowej swoistą matrycę — łańcuch RNA zbudowany z 159 zasad, w którym w części środkowej znajduje się sekwencja odpowiadająca sekwencji powtarzających się odcinków łańcucha telomerowego DNA, bogatego w reszty guaninowe. Starterem jest zawsze końcowa sekwencja telomeru pozostałego z poprzedniego cyklu replikacyjnego (rys. 3.34). Enzym dołącza się do końca chromosomu, wykorzystując jako miejsce zaczepienia końcową trójkę nukleo-

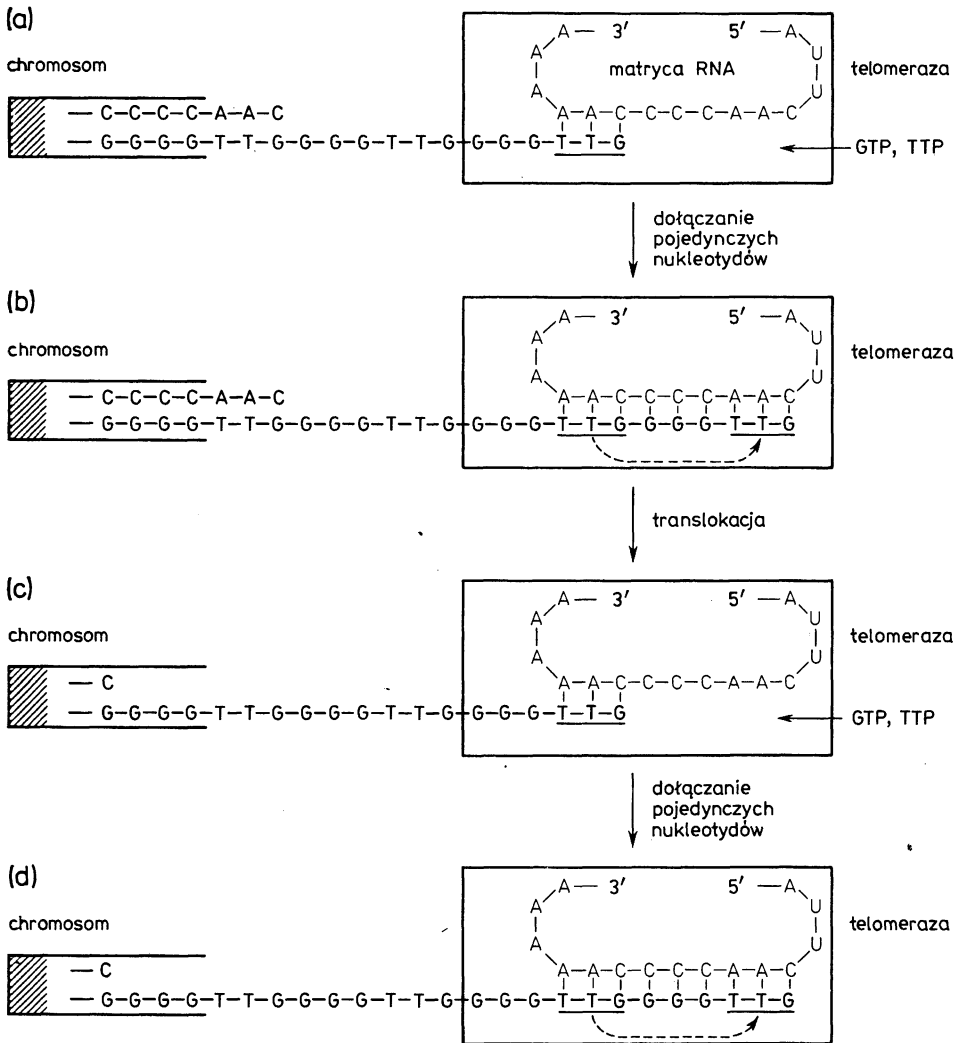


Rys. 3.33. Polimerazy DNA nie mogą wypełnić luk powstałych na końcach 5'-liniowych cząstek DNA

tydów, a następnie dołącza pojedynczo kolejne nukleotydy, aż do wypełnienia matrycy. Następnie ulega translacji i proces powtarza się. Po odłączeniu telomerazy brakująca nić bogata w zasady C i A jest doreplikowana w sposób semikonserwatywny. Nić ta jest zawsze krótsza od nici bogatej w zasady G i T o odcinek długości kilkunastu nukleotydów, ze względu na niemożność uzupełnienia sekwencji pozostałej po usunięciu ostatniego startera. W nici tej występują jedenonukleotydowe luki, które nie ulegają ligacji. Wolny koniec telomeru zawierający powtórzenia sekwencji guaninowych ulega zwinięciu w strukturę „szpilki do włosów”, przez wytworzenie nietypowych wiązań wodorowych między parami G—G:



Struktury te mogą tworzyć niezwykle, czteroniciowe formy, zwane „G-DNA” lub „G-kwartet”. Jako niedostępne dla nukleaz stanowią doskonale zabezpie-



Rys. 3.34. Proces wydłużania telomerowych zakończeń chromosomów, katalizowany przez telomerazę. (a) Telomeraza rozpoznaje końcową sekwencję chromosomu i przyłącza się do niej przez hybrydyzację matrycowego RNA z końcową sekwencją T T G chromosomu. (b) Telomeraza dołącza kolejno pojedyncze nukleotydy do DNA, zgodnie z sekwencją swojej matrycy. (c) Po wypełnieniu matrycy, telomeraza ulega translokacji na nową końcową sekwencję T T G. (d) Telomeraza wydłuża koniec chromosomu o kolejny fragment

pieczenie końców chromosomów przed degradacją. Chromosomy muszą więc zawierać specyficzne miejsca inicjacji (*ori*) niezbędne do replikacji materiału genetycznego, centromery umożliwiające ich segregację oraz telomery zapewniające im trwałość.

4. FIZYCZNA ORGANIZACJA GENOMU

Wielkość poszczególnych genomów różni się znacznie między sobą (tab. 4.1). Niezależnie od tego, w ogromnej większości przypadków struktury, w których znajdują się cząsteczki kwasów nukleinowych, są o wiele mniejsze

Tabela 4.1. Wielkości niektórych genomów

Gatunek	Wielkość haploidalnego genomu (pary nukleotydów)
Wiroid PSTV	359*
Bakteriofag $\phi X174$	5500**
Bakteriofag λ	$4,5 \times 10^4$
<i>Bacillus subtilis</i>	$2,0 \times 10^6$
<i>E. coli</i>	$4,2 \times 10^6$
Drożdże	$2,0 \times 10^7$
<i>D. melanogaster</i>	$1,4 \times 10^8$
Krab	$1,4 \times 10^9$
Człowiek	$3,3 \times 10^9$
Trzykrotka	$3,0 \times 10^{10}$

* Liczba nukleotydów RNA.

** Liczba nukleotydów DNA.

niż te cząsteczki. Cząsteczka DNA o wielkości 5×10^6 par zasad występuje w roztworze w postaci swobodnego kłębka o średnicy ok. $5 \mu\text{m}$. Genom *E. coli* jest również cząsteczką DNA o wielkości ok. 5×10^6 par zasad. Jednakże w tym przypadku mieści się ona bez przeszkód w komórce bakteryjnej o objętości 1000 razy mniejszej niż objętość swobodnego kłębka. Stopień skondensowania DNA w chromosomie eukariotycznym jest jeszcze większy.

Cząsteczka DNA nie tworzy spontanicznie struktur skondensowanych. Przeciwdziałają temu gęsto rozmieszczone, odpychające się ładunki ujemnych grup fosforanowych. Kondensacja genomowego DNA (również RNA) zachodzi przede wszystkim dzięki tworzeniu się kompleksów kwasów nuk-

liniowych z białkami. Pewien udział w „zmniejszaniu” rozmiarów cząsteczek DNA ma również powstawanie w nich superheliksu, tzn. wzajemnych owinięć dwuniciowych łańcuchów wokół siebie w obrębie tej samej cząsteczki DNA. Ten ostatni sposób dotyczy kolistych cząsteczek DNA oraz tych fragmentów cząsteczek liniowych, których końce są unieruchomione.

Ścisłe upakowanie DNA w kompleksach z białkami strukturalnymi, tak jak ma to miejsce w genomie eukariotycznym, ogranicza dostępność tego DNA dla innych białek. Sekwencje regulatorowe, które muszą mieć swobodę oddziaływania z czynnikami białkowymi, są więc zwykle umieszczone poza kompleksami DNA z białkami strukturalnymi.

4.1. Genom wiroidów

Najmniejsze ze znanych genomów to genomy wiroidów, patogenów roślin wyższych. Stanowią je koliste cząsteczki jednoniciowego RNA o długości kilkuset nukleotydów. Nie są one skompleksowane z białkami strukturalnymi. Cząsteczka PSTV (ang. potato spindle tuber viroid) RNA jest zbudowana z 359 nukleotydów. Jest to sekwencja zbyt krótka, aby mogła zawierać informację o budowie białka strukturalnego o przeciętnej wielkości.

Większość sekwencji genomu wiroidów ma swoje komplementarne odpowiedniki w tej samej cząsteczce RNA. W cząsteczce PSTV RNA jest tylko 7 niesparowanych pętli, liczących po kilka nukleotydów. W efekcie kolista cząsteczka jednoniciowego RNA ma na prawie całej swojej długości strukturę dwuniciową, która pozwala jej przybrać kształt zwartej pałeczki.

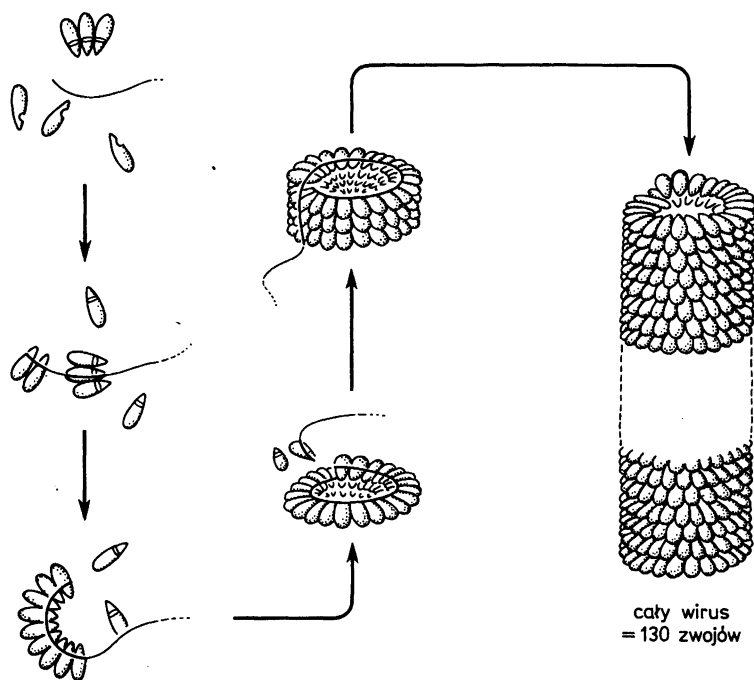
4.2. Genom wirusów

Genomy wirusów są cząsteczkami RNA lub DNA, które mogą być jednoniciowe lub dwuniciowe. Charakterystyczną cechą strukturalną wirusów jest to, że kwas nukleinowy stanowiący ich genom znajduje się wewnątrz kapsydu, czyli otoczki zbudowanej z białka.

Pod koniec lat 50. zwrócono uwagę, że ilość informacji zawarta w genomach większości prostych wirusów jest zbyt mała, aby mogły one kodować białko o masie odpowiadającej całemu kapsydowi wirusowemu. Było to podstawą hipotezy, według której kwas nukleinowy wirusa jest otoczony przez liczne kopie identycznych podjednostek białkowych, z których każda może być zbudowana z kilku rodzajów cząsteczek białka. Genom wirusa kodowałby w tym wypadku tylko jedno lub co najwyżej kilka białek strukturalnych. Współczesna wiedza, oparta na precyzyjnych badaniach strukturalnych, wykorzystujących metody o rozdzielczości bliskiej atomowej (techniki dyfrakcyjne, mikroskopia elektronowa), w pełni potwierdza opisaną koncepcję.

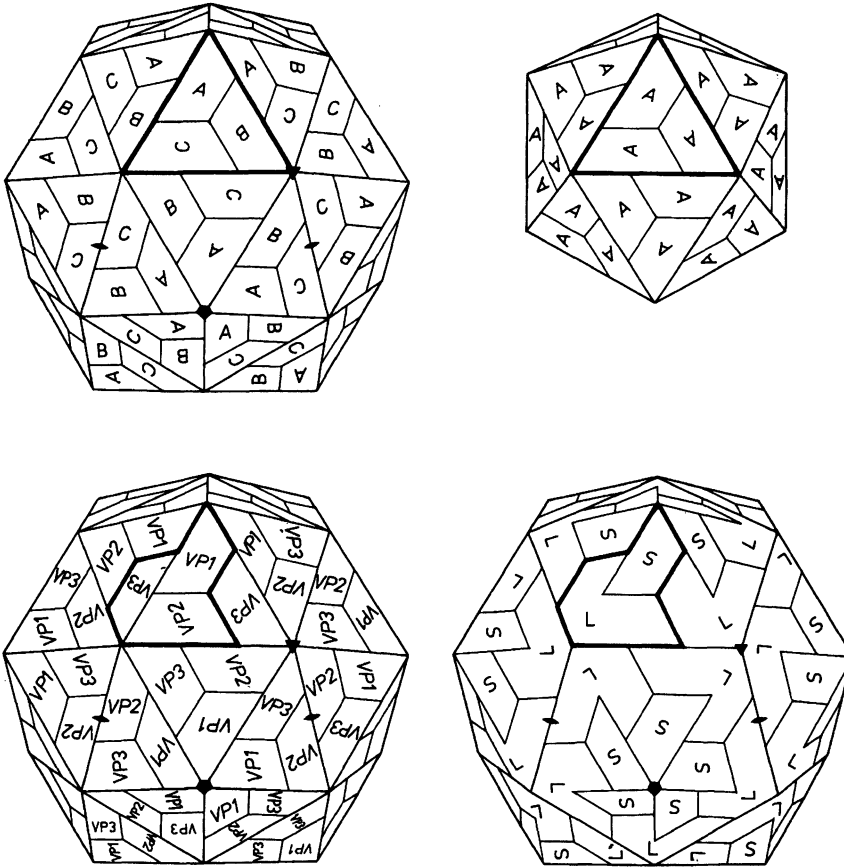
Strukturę prostych wirusów daje się sprowadzić do dwóch podstawowych typów: helikalnego (wirusy pałeczkowate) oraz ikosaedralnego (wirusy sferyczne).

Klasycznym przykładem wirusa o strukturze helikalnej jest wirus mozaiki tytoniu TMV (ang. tobacco mosaic virus). Podjednostki białkowe kapsydu wymuszają na cząsteczce RNA genomu TMV helikalne zwiniecie dzięki swym oddziaływaniom z RNA oraz oddziaływaniom, jakie zachodzą między samymi podjednostkami białkowymi (rys. 4.1). Oddziaływania te są prawie jednakowe na całej długości wirusa. Wyjątkiem są oddziaływania podjednostek zlokalizowanych na początku i na końcu cząsteczki RNA.



Rys. 4.1. Budowa i sposób formowania helikalnego (pałeczkowatego) wirusa mozaiki tytoniu (TMV) (wg H. Fraenkel-Conrat, *Design and Function of the Threshold of Life. The Viruses*, New York Academic Press. 1962)

Kapsydy wirusów ikosaedralnych (sferycznych) są zbudowane z jednakowych podjednostek białkowych, których liczba jest równa 60 lub niewielkiej wielokrotności 60. Sposób ułożenia podjednostek białkowych w kapsydie gwarantuje prawie całkowitą równocześnieść oddziaływań między poszczególnymi podjednostkami. Przykłady kilku takich rozwiązań przedstawione są na rysunku 4.2. W białkach kapsydów większości wirusów ikosaedralnych spotyka się ten sam motyw, zachowany zarówno w ich budowie przestrzennej, jak i w sekwencji nukleotydów genów kodujących te białka. Przykładami sferycznych kapsydów są główki fagów λ i $T4$.

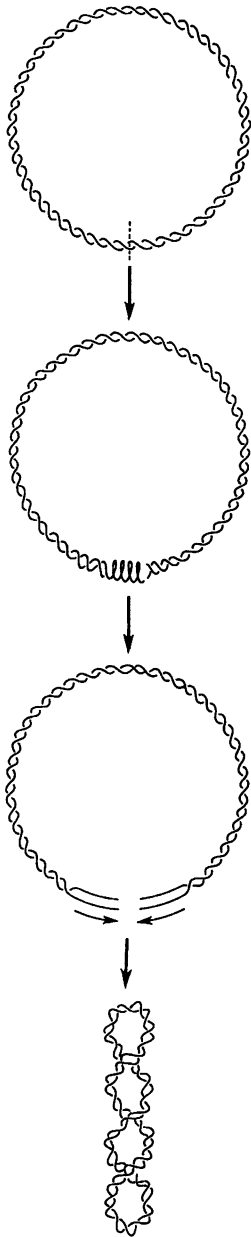


Rys. 4.2. Przykłady ułożenia podjednostek białkowych (zaznaczone pogrubioną linią) w kapsydach wirusów ikosaedralnych (sferycznych) (wg M.G. Rossmann and J.E. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 533–573, 1989)

Upakowanie kwasu nukleinowego wewnątrz kapsydu wymaga neutralizacji ujemnych ładunków fosforanów, przeciwdziałających kondensacji. Często czynią to zasadowe odcinki białek tworzących kapsyd; u niektórych wirusów (tymiwirusy, pikornawirusy) ujemne ładunki fosforanów są neutralizowane przez poliaminy znajdujące się wewnątrz kapsydu.

4.3. Napięcie torsyjne w genomie bakteryjnym

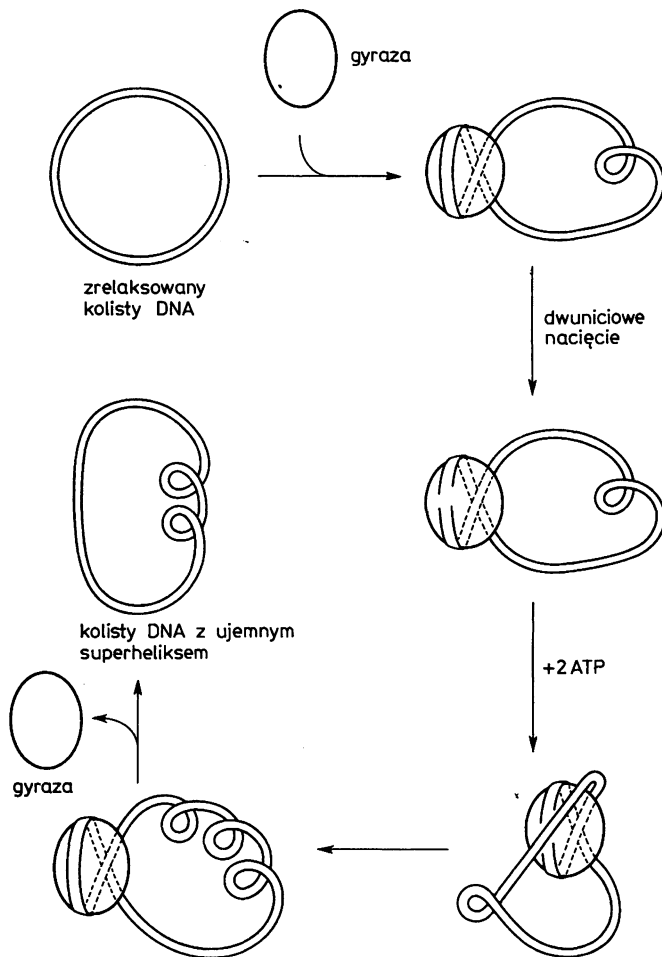
Najpowszechniej spotykaną formą DNA jest tzw. forma B, w której dwie nici polinukleotydowe oplatają się wzajemnie raz na 10 par zasad. Gdy cząsteczka DNA jest kolista lub też gdy jej końce są unieruchomione, liczba wzajemnych opleceń może być większa lub mniejsza od tej wartości. W cząsteczce takiej występuje wówczas napięcie torsyjne, prowadzące do powstania



Rys. 4.3. Przekucie nici polinukleotydowych, rozkręcenie podwójnego heliksu i ponowne połączenie przeciętych nici prowadzi do powstania superheliksu w kolistej cząsteczce DNA

superheliksu, czyli owinięcia wokół siebie dwuniciowych łańcuchów DNA tej samej cząsteczki (rys. 4.3). Superheliks ma swoją skrętność: może być dodatni lub ujemny. Skrętność superheliksu zależy od tego, czy liczba opleceń nici polinukleotydowych w kolistej cząsteczce DNA została zwiększona, czy też zmniejszona w stosunku do tej, jaka występuje w formie B DNA.

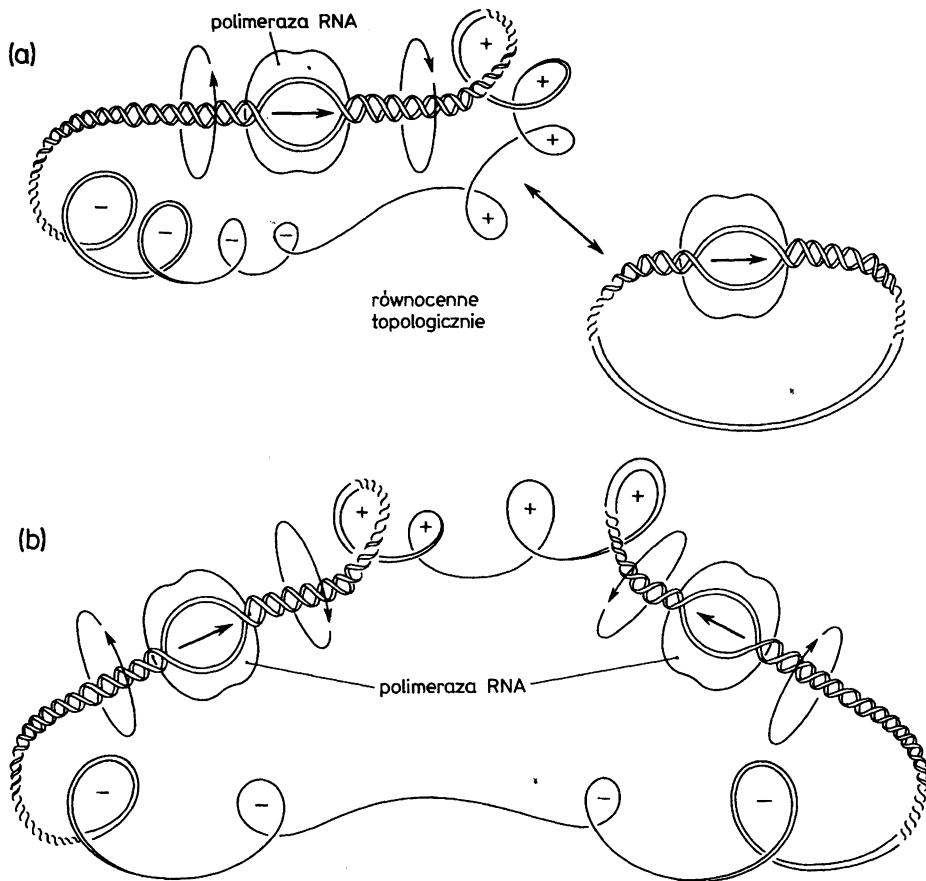
Kolišta cząsteczka DNA chromosomu bakteryjnego jest podzielona na kilkadziesiąt pętli (domen) o unieruchomionych końcach, dołączonych do białkowego szkieletu. Taka struktura zapewnia każdej pętli autonomię topologiczną. Oznacza to, że zmiany w gęstości superheliksu DNA w obrębie którejkolwiek pętli nie wpływają na gęstość superheliksu w pozostałych pętlach. Genom *E. coli*, o wielkości $4,2 \times 10^6$ par zasad, składa się z około 40 pętli. Taki domenowy sposób organizacji DNA, jak również wielkość pętli genomu bakteryjnego, są podobne do rozwiązań spotykanych w genomie eukariotycznym. Jednak w przeciwieństwie do DNA genomu eukariotycznego w DNA bakteryjnym występuje napięcie torsyjne. Wynika ono z częściowego rozkręcenia podwójnego heliksu bakteryjnego DNA, średnio o jeden obrót na



Rys. 4.4. Gyraza wprowadza do kolistej cząsteczki DNA ujemne skręty superheliksu, przecinając przejściowo obie nici DNA (wg R.J. Reece and A. Maxwell, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 335–345. 1991)

200 par zasad. W rezultacie w bakteryjnym DNA występuje superheliks o ujemnej skrętności.

Odpowiednią gęstość superheliksu w bakteryjnym DNA utrzymują dwa rodzaje topoizomeraz. Są to enzymy, które przejściowo przecinają jedną lub obie nici DNA, umożliwiając w ten sposób zmianę liczby opleceń nici polinukleotydowych wokół siebie. Dwie bakteryjne topoizomerazy: topoizomeraza I i gyraza działają antagonistycznie. Gyraza wprowadza do cząsteczki DNA ujemne skręty superhelikalne (rys. 4.4), zużywając przy tym ATP; topoizomeraza I relaksuje ujemne skręty superheliksu bez wydatku energii. Ekspresja wielu genów bakteryjnych wymaga utrzymywania napięcia torsyjnego w cząsteczce DNA i drastycznie spada po jego zrelaksowaniu. Jednym z wyjątków są geny dwóch podjednostek gyrazy, aktywowane właśnie przez spadek gęstości



Rys. 4.5. Powstawanie dodatnich i ujemnych skrętów superheliksu podczas transkrypcji. W przypadku jednej cząsteczki polimerazy RNA poruszającej się w kolistej cząsteczce DNA: dodatnie i ujemne skręty znoszą się wzajemnie (a). Gdy dwie cząsteczki polimerazy RNA poruszają się w przeciwnych kierunkach, potrzebna jest interwencja topoizomerazy (b) (wg H.Y. Wu *et al.*, *Cell*, 53, 433 – 440. 1988)

supersheliksu. Jest to element mechanizmu regulacyjnego, który zapewnia odpowiednią gęstość superheliksu w cząsteczce bakteryjnego DNA.

Podczas transkrypcji, zachodzącej w cząsteczce kolistego DNA (lub w pętli o unieruchomionych końcach), poruszająca się cząsteczka polimerazy RNA tworzy przed sobą dodatnie, za sobą zaś — ujemne skręty superheliksu. Jest to wynik odpowiednio rozplatania i ponownego zaplatania prawoskrętnego podwójnego heliksu DNA przez polimerazę, która nie ma możliwości obrotu wokół własnej osi (rys. 4.5). Bakteryjna topoizomeraza I relaksuje nadmiar ujemnych skrętów superheliksu. Nie ma jednak zdolności relaksacji dodatnich skrętów superheliksu, powstających przed poruszającą się polimerazą. Tę rolę — kompensowania powstających dodatnich skrętów superheliksu — spełniają wprowadzane przez gyrazę ujemne skręty superheliksu, obecne przez cały czas w cząsteczce bakteryjnego DNA.

4.4. Białka genomu bakteryjnego

W genomie bakteryjnym brak jest białek, które spełniałyby takie funkcje, jakie pełnią histony w genomie eukariotycznym. Jednak niektóre białka bakteryjne wykazują pewne podobieństwo do histonów — nazywane są białkami „histonopodobnymi” (ang. „histone-like proteins”). Jedno z nich, białko H, jest na tyle podobne do eukariotycznego histonu H2A, że rozpoznają je przeciwciała anti-H2A. Zarówno białka histonopodobne, jak i histony, są białkami o niewielkiej masie cząsteczkowej. Żadne z białek histonopodobnych nie występuje jednak w stosunku do DNA w tak obfitej ilości, jak histony eukariotyczne. Masy cząsteczkowe białek histonopodobnych oraz ich zawartość w komórce podane są w tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Masy cząsteczkowe i zawartość niektórych białek histonopodobnych w komórce bakteryjnej

Nazwa białka	Masa cząsteczkowa	Liczba cząsteczek w komórce
H—NS	15 500	20 000
HU-1	9 500	60 000
HU-2		
FIS	11 200	zmienna
H	28 000	20 000—120 000
HLPI	17 000	4 000

Białka HU i H—NS nie wykazują swoistości sekwencyjnej, podczas gdy białka IHF i FIS są swoiste w stosunku do sekwencji. Wszystkie białka histonopodobne mają zdolność organizowania DNA w struktury wyższego rzędu, np. białko HU owija DNA wokół siebie. Jednak wszystkie te białka, oprócz deformowania DNA, pełnią również inne funkcje w genomie bakteryj-

nym. Białko H—NS jest represorem transkrypcji dla wielu genów, białko HU stymuluje dołączanie represora laktozowego i białka CAP, białko IHF bierze udział w integracji faga λ . Dlatego też wydaje się możliwe, że białka histonopodobne spełniają w genomie bakteryjnym rolę podobną raczej do eukariotycznych czynników transkrypcyjnych niż do histonów.

4.5. Histony

Podstawową strukturę chromosomu eukariotycznego tworzy kompleks DNA z niewielkimi zasadowymi białkami — histonami. Pięć rodzajów histonów nosi nazwy: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Poza histonem H1, który pełni szczególną funkcję strukturalną, pozostałe zbudowane są z nieco ponad 100 aminokwasów. Bliżej C-końcowej strony każdego z tych histonów znajduje się wyraźne skupisko aminokwasów hydrofobowych, podczas gdy pozostałe części mają charakter polarny i zasadowy. Zubożenie dodatnich ładunków w tych rejonach prowadzi do spontanicznego powstania kompleksów, w których cząsteczki histonów oddziałują ze sobą częściami hydrofobowymi. W warunkach fizjologicznych dodatnie ładunki histonów zubożone są przez ujemne ładunki fosforanów DNA, który znajduje się w pobliżu. Białkowy kompleks, jaki powstaje wówczas w kilku etapach, jest zbudowany z ośmiu cząsteczek histonów, po dwie z każdego rodzaju H2A, H2B, H3 i H4. Oddziaływania między poszczególnymi histonami są swoiste, powierzchnie zaś stykających się ze sobą rejonów hydrofobowych są precyzyjnie dopasowane do siebie, co prawie wyklucza zmienność ewolucyjną sekwencji aminokwasów w tych rejonach łańcucha polipeptydowego histonów. Dotyczy to w szczególności pary histonów H3—H4. Histony te należą do najbardziej stabilnych ewolucyjnie białek. O wiele bardziej zmienny jest histon H1, pod którą to nazwą kryje się co najmniej kilka wariantów sekwencyjnych tego białka (m.in. histon H5, H1°).

Histony ulegają kilku modyfikacjom posttranslacyjnym, z których najważniejsza to fosforylacja grupy —OH seryny lub treoniny (histony H1, H3, H2A) oraz acetylacja grupy ϵ -aminowej lizyny. Modyfikacje te zmieniają sumaryczny ładunek cząsteczek histonów i wpływają na ich oddziaływanie z DNA oraz innymi białkami. Inne modyfikacje to: metylacja (dołączenie grupy metylowej do ϵ -aminowej grupy lizyny), poli (ADP-rybozylacja) (przeniesienie z NAD^+ reszt ADP-rybozy tak, że tworzą długie, rozgałęzione łańcuchy) i ubikwitynacja (dołączenie ubikwityny, tj. polipeptydu zbudowanego z 76 aminokwasów, na ϵ -aminową grupę lizyny).

4.6. Białka niehistonowe

W skład chromosomu eukariotycznego wchodzi wiele różnych białek, które nie są histonami. Wszystkie te białka nazywa się białkami niehistonowymi. Jest to oczywiście bardzo zróżnicowana grupa, zarówno pod względem budowy, jak

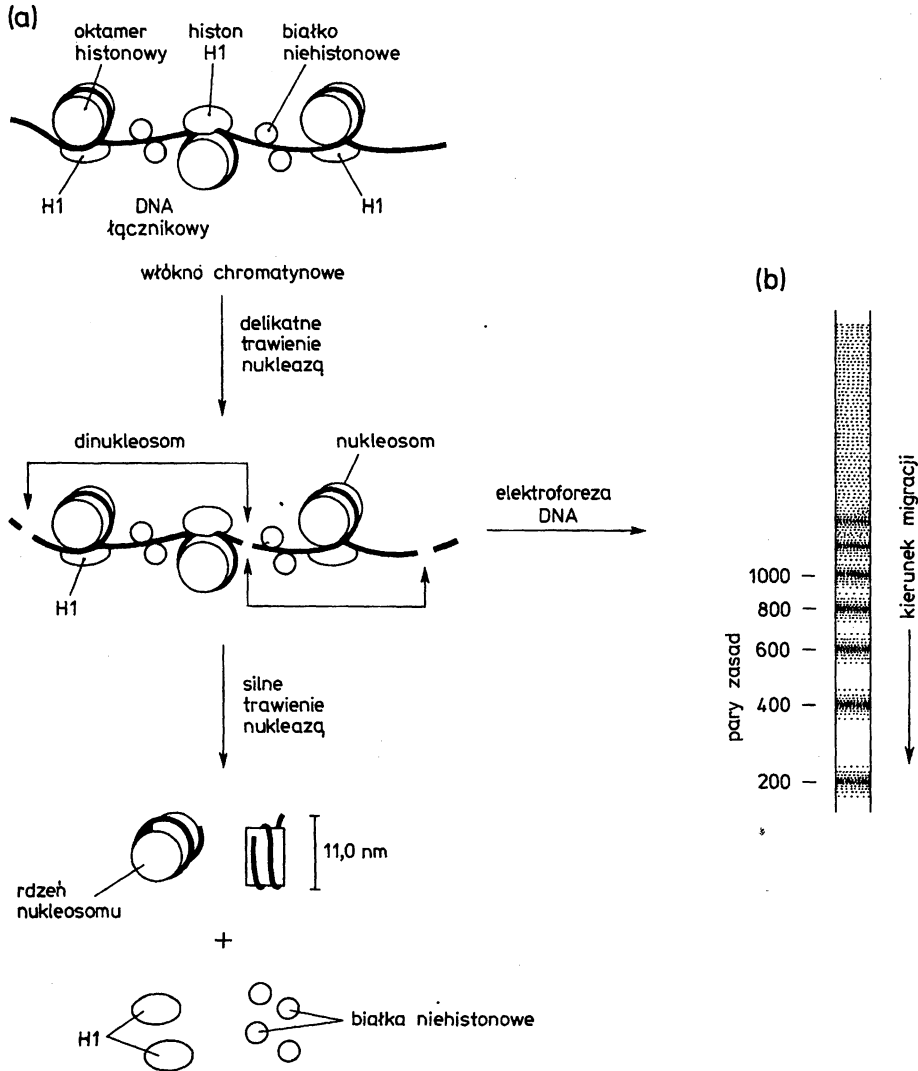
i funkcji. W jej skład wchodzi także białka strukturalne nie będące histonami, np. białka matriks jądrowej lub też tzw. białka HMG (ang. high mobility group) — nazwa nawiązuje do zachowania się tych białek podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.

4.7. Nukleosom

Kompleks eukariotycznego DNA z histonami i białkami niehistonowymi, zawierający również pewną ilość RNA (ok. 10%), nazywany jest tradycyjnie chromatyną. Badania prowadzone na początku lat 70. wykazały, że chromatyna zbudowana jest z powtarzających się podjednostek, nazywanych nukleosomami. Nukleosom złożony jest z 8 cząsteczek histonów, po dwie z każdego rodzaju H2A, H2B, H3 i H4, jednej cząsteczki histonu H1 oraz odcinka DNA o długości 165–245 par zasad. Cząstkę taką można wyizolować z chromatyny trawiąc chromatynę endonukleazami (np. nukleazą z *Micrococcus*), które preferencyjnie przecinają łatwiej dostępne miejsca między nukleosomami (rys. 4.6). Dalsze trawienie usuwa z nukleosomu końce DNA o zmiennej długości w różnych rodzajach komórek, pozostawiając bardziej oporną cząstkę zbudowaną z kompletu białek i odcinka DNA o długości 165 par zasad, nazywaną chromatosomal. Kolejne przedłużenie trawienia DNA chromatosomal prowadzi do powstania jeszcze mniejszej cząstki, nazywanej rdzeniem nukleosomu (rys. 4.6). Ta ostatnia cząstka ma prawie jednakową strukturę u wszystkich eukariontów. Zbudowana jest z oktameru histonów (bez histonu H1) oraz odcinka DNA o długości 146 par zasad. Badania krystalograficzne pozwoliły na dokładne odtworzenie struktury tej cząstki. Rdzeń nukleosomu przypomina dysk o średnicy 11 nm i grubości 5,7 nm. DNA jest owinięty na zewnątrz oktameru histonowego, tworząc 1,8 obrotu lewoskrętnego superheliksu. DNA nie jest jednakowo zakrzywiony na całej swojej długości, lecz załamany lub też zagięty w wielu miejscach. Kolejność histonów kontaktujących się z DNA na jego drodze wokół oktameru jest następująca: H2A, H2B, H4, H3, H3, H4, H2B, H2A (rys. 4.7). Centralne ułożenie tetrameru H3₂—H4₂ pozostaje w zgodzie z podstawową rolą tych dwóch histonów w tworzeniu rdzenia nukleosomu.

W nie naruszoną włóknie chromatynowym DNA wchodzący i wychodzący z rdzenia nukleosomu oraz DNA znajdujący się w centralnej części rdzenia tworzą kieszonkę, której wymiary pasują bardzo dobrze do średnicy centralnej, globularnej części histonu H1, zawierającej aminokwasy hydrofobowe (2,8 nm). Wydaje się, że właśnie w tej kieszonce usadowia się na rdzeniu nukleosomu globularna część histonu H1, tworząc w ten sposób wspomnianą wcześniej cząstkę, nazywaną chromatosomal (rys. 4.8).

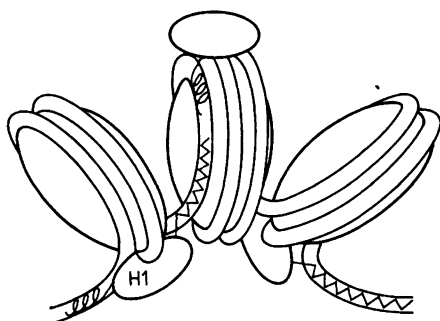
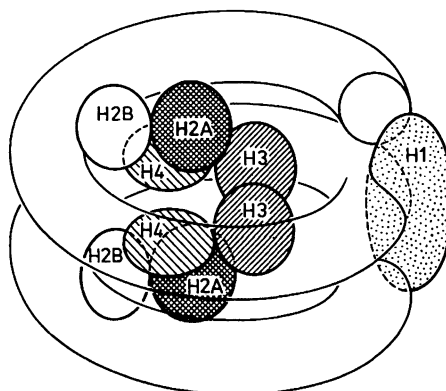
Nukleosom to chromatosomal wraz z odcinkiem DNA oddzielającym chromatosomal na włóknie chromatynowym, tzw. łącznikiem (linker DNA). Długość łącznika jest zmienna i może wynosić ok. 0–80 par zasad. Nie jest całkiem



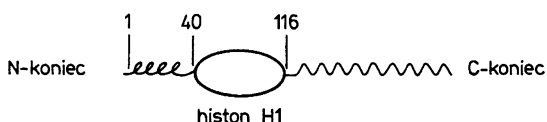
Rys. 4.6. (a) Trawienie włókna chromatynowego przez nukleazę mikrokokową prowadzi do powstania nukleosomu, chromatysomu i ostatecznie rdzenia nukleosomu. (b) Obraz elektroforetyczny fragmentów DNA wyizolowanego z chromatyny po trawieniu nukleazą mikrokokową. Od dołu prążki na elektroforogramie odpowiadają odcinkowi DNA nukleosomu i jego kolejnym wielokrotnościom

jasne, co dokładnie określa długość łącznika, chociaż co najmniej dwa elementy mogą wpływać na tę wartość. Pierwszy — to ogólnie nierównomierne ułożenie chromatysomów wzdłuż włókna chromatynowego, związane zarówno z drobnymi różnicami w ich składzie (warianty sekwencyjne histonów, modyfikacje posttranslacyjne), jak i z różnicami w sekwencjach DNA, owijających się wokół globuli białkowej. Wielkość odcinka DNA nukleosomu, wyliczona na pod-

Rys. 4.7. Ułożenie histonów i DNA w nukleosomie (wg B. Lewin, *Genes V*, Oxford University Press, New York. 1994)



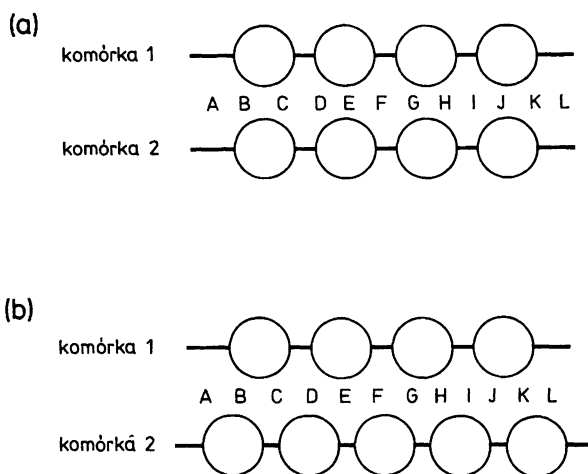
Rys. 4.8. Ułożenie histonu H1 na rdzeniu nukleosomu. Globularna część histonu H1 (od 40 do 116 aminokwasu) lokuje się na rdzeniu nukleosomu (wg R. Hancock and T. Boulikas, *Int. Rev. Cytol.*, 79, 165–214. 1982)



stawie elektroforogramów produktów trawienia nukleazą z *Micrococcus* (rys. 4.6), to tylko średnia dła odcinków mieszczących się w pewnym zakresie długości. Drugi element — to różne warianty histonu H1, którego oba zasadowe końce wychodzą poza chromatosomal i oddziałują z DNA łącznika (rys. 4.8).

4.8. Lokalizacja nukleosomów w stosunku do sekwencji nukleotydów

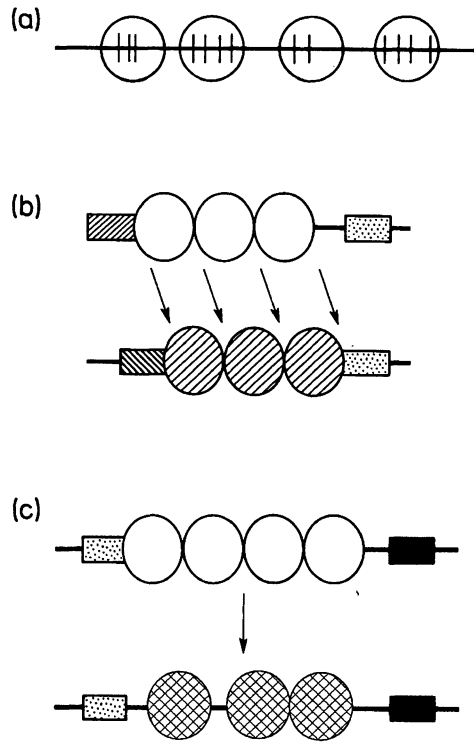
Nie wszystkie nukleosomy są precyzyjnie ulokowane w stosunku do sekwencji nukleotydów. Oznacza to, że dla dwóch komórek tego samego organizmu taki sam odcinek DNA może być raz nawinięty na rdzeń nukleosomu, w drugim zaś przypadku może znajdować się w części łącznikowej (rys. 4.9). Ponieważ długość odcinka łącznikowego nie jest jednakowa we



Rys. 4.9. Uporządkowane (a) i przypadkowe (b) ułożenie nukleosomów w stosunku do sekwencji nukleotydów w DNA (oznaczonej na rysunku jako ciąg liter). W pierwszym przypadku takie same sekwencje nukleotydowe znajdują się w rejonach łącznikowych we wszystkich komórkach; w drugim taka sama sekwencja występuje w jednej komórce w rejonie łącznikowym, w drugiej zaś w obrębie nukleosomu

wszystkich tkankach tego samego organizmu, pozycje nukleosomów muszą być różne dla poszczególnych tkanek. Z taką sytuacją mamy do czynienia w chromatynie szczura czy też muszki owocowej. Z drugiej strony, w makronukleusie *Tetrahymena thermophila* znaczna część genomu zawiera nukleosomy precyzyjnie ułożone w stosunku do sekwencji nukleotydów. Podobnie precyzyjną lokalizację nukleosomów stwierdzono dla prawie wszystkich genów *Saccharomyces cerevisiae*.

Co określa pozycję tak umieszczonych nukleosomów? Na podstawie dostępnych obecnie danych można brać pod uwagę kilka przyczyn (rys. 4.10). Po pierwsze — dołączenie białka niehistonowego do określonej sekwencji uniemożliwia umieszczenie w tym miejscu nukleosomu i określa dokładnie pozycję, którą może zająć pierwszy nukleosom powstający w sąsiedztwie. Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku lokalizacji nukleosomów wokół centromeru. Po drugie — dokładną pozycję nukleosomu mogą wyznaczać niektóre sekwencje. Położenie nukleosomów ogranicza przede wszystkim zdolność poszczególnych sekwencji do zaginania się i tendencję do odwracania się małą lub dużą bruzdą w kierunku powierzchni nukleosomu. Niektóre sekwencje nie pozostawiają oktamerom histonowym żadnego wyboru co do zajmowanego miejsca, jednoznacznie wyznaczając ich pozycję. Po trzecie wreszcie — fałdowanie włókna nukleosomowego w struktury wyższego rzędu nakłada wiele ograniczeń na pozycje, jakie mogą zajmować nukleosomy. Przykładowo — przesunięcie nukleosomu wzdłuż DNA o połowę obrotu podwójnego heliksu powoduje obrót nukleosomu o 180° w stosunku do sąsiednich. Takie położenie może wykluczyć udział nukleosomu w formowaniu regularnego włókna 30 nm.

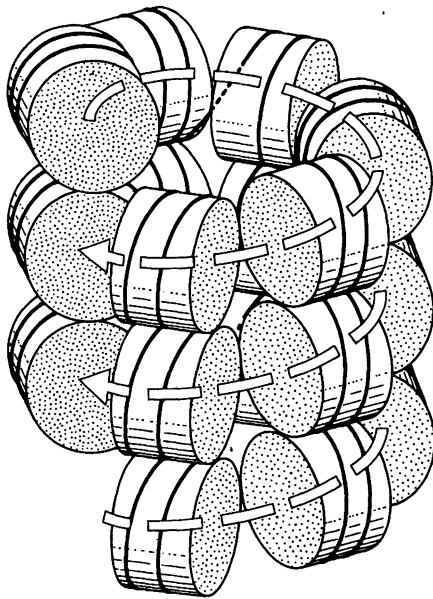


Rys. 4.10. Podstawowe mechanizmy odpowiedzialne za uporządkowane ułożenie nukleosomów w stosunku do sekwencji nukleotydów w DNA. (a) Oddziaływanie histony–DNA. (b) Białka flankujące miejsca formowania nukleosomów. (c) Fałdowanie włókna nukleosomowego w struktury wyższego rzędu (przyjęcie przez włókno chromatynowe struktury wyższego rzędu nie zmienia ułożenia białek flankujących, może jednak wykluczyć niektóre pozycje zajmowane dotąd przez nukleosomy) (wg F. Thoma, *Biochim. Biophys. Acta*, **1130**, 1–19, 1992)

Nukleosomy niekoniecznie muszą być albo precyzyjnie ulokowane na DNA z dokładnością do jednego nukleotydu, albo rozmieszczone zupełnie przypadkowo w stosunku do sekwencji nukleotydów. Dla pewnych rejonów DNA (np. satelitarny DNA, chromosom wirusa SV40) wykazano istnienie kilku nakładających się ramek pozycji dla pojedynczego nukleosomu. W każdej z tych ramek pojedynczy nukleosom może występować z różnym prawdopodobieństwem. Prawdopodobieństwo to może zmieniać się po dołączeniu (odłączeniu) białka w bliskim sąsiedztwie czy też wraz ze zmianą upakowania w strukturę wyższego rzędu.

4.9. Włókno chromatynowe

Przedstawiony wyżej obraz włókna chromatynowego, zbudowanego z ułożonych wzdłuż osi włókna nukleosomów, często porównywany był do sznura koralików, z tym że DNA nie „przechodzi” przez środek nukleosomów, lecz owija je. W istocie różnic jest więcej. Histon H1 spina ze sobą odcinek DNA wchodzący i wychodzący z nukleosomu, co powoduje, że nie znajdują się one dokładnie naprzeciw siebie po dwóch stronach globuli białkowej. W efekcie kolejne nukleosomy ułożone są we włóknie w sposób zygzakowaty. Opisane wyżej włókno chromatynowe nazywane jest często „włókmem 10 nm”, gdyż



Rys. 4.11. Solenoidalne zwinienie włókna nukleosomowego (wg J. Widom and A. Klug, *Cell*, **43**, 207–213. 1985)

jego średnica zbliżona jest do średnicy nukleosomu. W fizjologicznych warunkach jonowych (stężenie kationów jednowartościowych powyżej 50 mmoli/l, dwuwartościowych — ponad 0,2 mmol/l) włókno takie fałduje się spontanicznie w grubsze włókno o średnicy ok. 30 nm. Spośród kilku modeli opisujących strukturę tego włókna najlepszą zgodność z licznymi danymi doświadczalnymi wykazuje tzw. model solenoidu (rys. 4.11). W modelu tym włókno 10 nm ulega załamaniu w miejscach łącznikowego DNA, owijając się wokół jednej osi. Dyskowate nukleosomy ułożone są swoimi płaskimi powierzchniami równoległe do osi solenoidu. Krawędzie dysków tworzących sąsiadujące ze sobą skręty stykają się, dzięki czemu skok solenoidu równy jest średnicy nukleosomu, tzn. 11 nm. Na jeden skręt solenoidu przypada ok. 6–7 nukleosomów.

W stabilizacji włókna 30 nm bierze udział histon H1 oraz N-końcowe, zasadowe części histonów tworzących rdzeń nukleosomu. Chromatyna pozbawiona histonu H1 nie tworzy włókna 30 nm. To samo odnosi się do chromatyny, z której usunięto N-końcowe części histonów rdzeniowych za pomocą enzymów proteolitycznych.

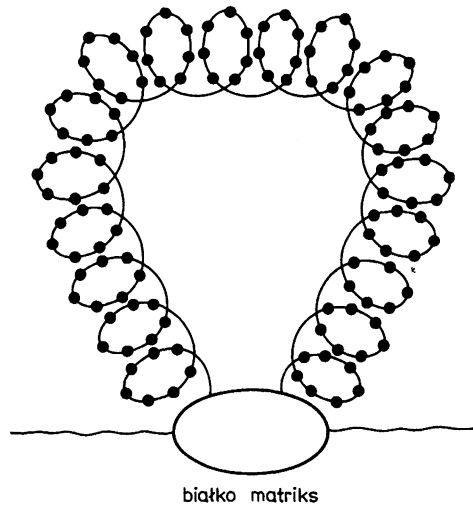
Włókno 30 nm jest natywną formą dla większej części chromatyny. Trzeba jednak podkreślić, że jego kształt nie jest na całej długości DNA tak idealny, jak przedstawia to model solenoidu. Różnice w długości łącznikowego DNA dla leżących blisko siebie nukleosomów, rejony pozbawione nukleosomów oraz modyfikacje histonów w obrębie samych nukleosomów mogą zakłócać regularność struktury włókna o średnicy 30 nm.

Nie ma jasności co do tego, czy istnieją regularne struktury wyższego poziomu niż włókno 30 nm. Niektóre modele chromosomu zakładają, że jest to ostatni poziom regularnej organizacji, natomiast włókno 30 nm ułożone jest

w jądrze tak, jak spaghetti na talerzu (ang. spaghetti-like model). Inne przyjmują istnienie dość regularnego włókna chromatyny interfazowej o średnicy ok. 240 nm oraz regularnego ułożenia tego włókna w skondensowanym chromosomie metafazowym. Przyjęcie tych parametrów pozwala wyliczyć, że cały diploidalny genom ludzki da się upakować w objętości 50–60 μm^3 . W jądrze o średnicy 5 μm (objętość 65,5 μm^3) pozostaje więc nieco miejsca na białka i znaczne ilości syntetyzowanego RNA.

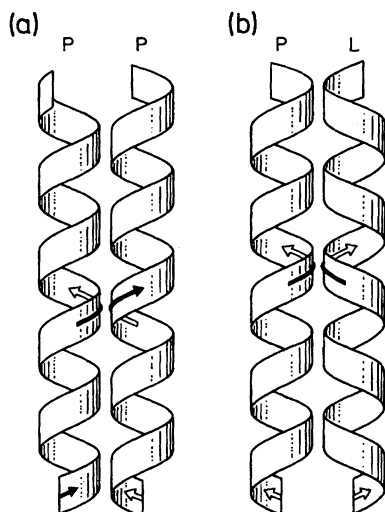
4.10. Domeny chromatynowe

Podobnie, jak DNA chromosomu bakteryjnego, DNA eukariotyczny jest zorganizowany w pętle (domeny). Pętle są tworzone przez odcinki włókna chromatynowego o długości 20–200 tysięcy par zasad, dołączone u podstawy do struktury zbudowanej prawie wyłącznie z białek, nazywanej matriks jądrową (rys. 4.12). Rejony połączenia DNA z matriks, tzw. MAR (ang. matrix



Rys. 4.12. Włókno chromatynowe łączy się z białkami matriks tworząc pętle (domeny) (wg M. Grunstein, *Trends Genet.*, 6, 395–400, 1990)

associated regions), nie są swoiste gatunkowo. Są to odcinki o długości ponad 250 par zasad, bogate w AT. Znaczną część białek tworzących matriks jądrową w dzielących się komórkach stanowi topoizomeraza II, ulokowana u podstawy pętli włókna chromatynowego. Umożliwia ona rozdzielenie powstałych po replikacji dwóch pętli potomnych oraz zmiany topologii pętli podczas kondensacji mitotycznej chromosomu. W jądrach nie dzielących się często brak jest topoizomerazy II. Struktura pętli jest tam jednak zachowana dzięki obecności pozostałych białek matriks jądrowej. Wśród nich występują trzy rodzaje białek, nazywanych laminami. Podczas kondensacji mitotycznej białka te są fosforylowane, natomiast tworzona przez nie struktura ulega dezintegracji. Matriks jądrowa przekształca się wówczas w białkowy szkielet chromosomu.



Rys. 4.13. Przy jednakowej skrętności szkieletu chromosomu w obu chromatydach siostrzanych (a) sekwencje homologiczne (zaznaczone strzałkami) mają przeciwną polarność. Gdy skrętność jest przeciwna (b) sekwencje homologiczne mają jednakową polarność (wg E. Boy de la Tour and U.K. Laemmli, *Cell*, 55, 937–944. 1988)

Szkielet ten jest helikalnie zwinięty, przy czym skrętność tego zwinięcia jest różna dla obu chromatyd siostrzanych. Pozwala to zachować jednakową polarność dla homologicznych sekwencji znajdujących się naprzeciw siebie w obu chromatydach (rys. 4.13).

4.11. Centromer

Szczególnym miejscem chromosomu eukariotycznego jest centromer. Do miejsca tego dołączona jest swoicie grupa kilku rodzajów białek. Niektóre z nich tworzą tzw. kinetochor, do którego przyczepione są podczas mitozy i mejozy mikrotubule wrzeciona. W centromerach chromosomów ssaków znajdują się powtarzające się sekwencje satelitarnego DNA.

4.12. Sekwencje telomerowe

Na końcach cząsteczek DNA chromosomów eukariotycznych umieszczone są powtórzenia krótkich sekwencji telomerowych. U człowieka jednostką taką stanowi sekwencja CCCTAA. Sekwencje te są dobudowywane do chromosomu za pomocą telomerazy i stanowią zabezpieczenie liniowego DNA chromosomu eukariotycznego przed sukcesywnym skracaniem podczas kolejnych rund replikacji (p. rozdz. 2).

4.13. Architektura jądra interfazowego

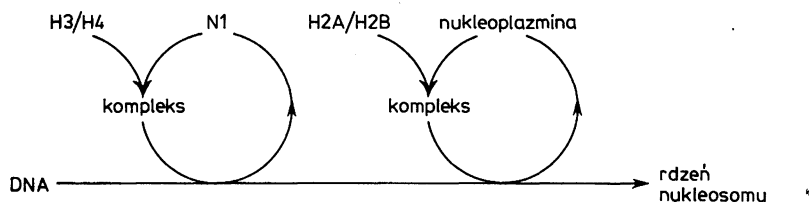
Prace nad budową jądra interfazowego nie są jeszcze bardzo zaawansowane, pozwalają jednak sądzić, że poszczególne chromosomy zajmują w jądrze

rze interfazowym nieprzypadkowe miejsca. Konsekwencją takiego ułożenia jest, jak się wydaje, lokalizacja aktywnych genów w sąsiedztwie porów jądrowych, które w tym przypadku stanowią furtki dla opuszczających jądro transkryptów.

4.14. Odtwarzanie struktury chromatyny

Histony tworzące macierzystą chromatynę nie ulegają degradacji podczas replikacji, lecz biorą udział w odtwarzaniu włókna chromatynowego z nici potomnych. Drugą połowę histonów tworzących to włókno stanowią nowo zsintetyzowane białka.

Odtwarzanie rdzenia nukleosomu w fizjologicznej sile jonowej wymaga obecności kwaśnych białek, zdolnych do związania zasadowych histonów i przeniesienia ich na DNA. Białka takie występują szczególnie obficie w oocytach *Xenopus*, skąd zostały wyizolowane. Proces odtwarzania rdzenia nukleosomu z ich udziałem przebiega w dwóch etapach. W pierwszym — białko nazywane N1 dołącza do DNA tetramer histonowy H3₂—H4₂. W drugim — kolejne białko, nukleoplazmina, dołącza dwie pary histonów H2A i H2B (rys. 4.14).



Rys. 4.14. Formowanie się nukleosomu w obecności białka N1 i nukleoplazminy (wg R.A. Laskey and G.H. Leno, *Trends Genet.*, 6, 406—410. 1990)

Odtworzenie pełnego nukleosomu o zachowanej długości łącznika jest procesem bardziej złożonym. Wydaje się, że wymaga ono zmodyfikowanych form histonów, które podczas tworzenia się nukleosomu stopniowo ulegają przekształceniu do form znajdujących w dojrzałej chromatynie. W procesie tym biorą udział również topoizomerazy, które usuwają napięcie torsyjne powstałe na skutek owijania się DNA wokół oktameru histonowego.

W warunkach jonowych jądra komórkowego włókno chromatynowe spontanicznie tworzy formę włókna 30 nm. Dołączenie do matriks jądrowej odbywa się poprzez sekwencje MAR.

4.15. Euchromatyna i heterochromatyna

Stopień skondensowania chromatyny można wyrazić ilościowo przez tzw. współczynnik upakowania (ang. packing ratio). Określa on stosunek długości wyprostowanej cząsteczki DNA do długości struktury, w której cząsteczka ta

jest upakowana. Współczynnik upakowania DNA w nukleosomie można wyliczyć i otrzyma się wartość ponad 6, przyjmując: długość pary zasad — 0,34 nm, przeciętną długość owiniętego na nukleosomie odcinka DNA — 200 par zasad, zaś średnicę nukleosomu — 11 nm:

$$\frac{0,34 \times 200}{11} = 6,2.$$

Jeżeli w podobny sposób liczymy współczynnik upakowania DNA we włóknie 30 nm, gdzie na skok solenoidu odpowiadający średnicy nukleosomu przypada 6–7 nukleosomów, to otrzymamy wartość ok. 40 (upakowanie DNA w nukleosomie pomnożone przez upakowanie nukleosomów w solenoidzie).

Maksymalne upakowanie osiąga DNA eukariotyczny w chromosomie metafazowym. Stosunek długości DNA zawartego w chromosomie metafazowym człowieka do długości tego chromosomu wynosi ok. 8000. I tak np. największy ludzki chromosom, o długości 10 μm , zawiera aż 7,3 cm DNA. Podobną wartość współczynnika upakowania można wyliczyć, uwzględniając parametry kolejnych hierarchicznych struktur tworzących chromosom metafazy.

Upakowanie DNA w chromatynie interfazowej nie jest jednolite. Pewne rejony chromatyny, tzw. heterochromatyna, mają współczynnik upakowania zbliżony do tego, jaki istnieje w chromosomie metafazowym. Inne rejony, tzw. euchromatyna, są bardziej rozluźnione. To samo włókno chromatynowe może przechodzić kolejno przez rejony eu- i heterochromatynowe. Sekwencje powtarzające się występują zwykle w formie heterochromatyny.

4.16. Chromatyna aktywna transkrypcyjnie

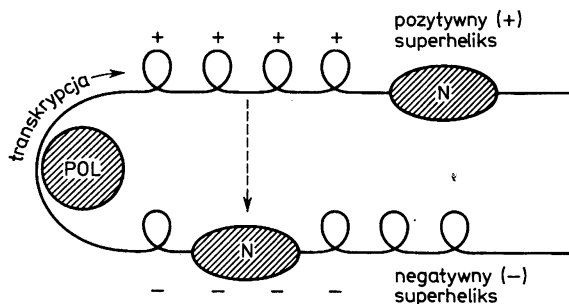
Na skutek upakowania eukariotycznego DNA w: nukleosomy, włókno chromatynowe i struktury wyższego rzędu, dostępność do DNA jest drastycznie ograniczona. Jednak w rejonach chromatyny zawierających geny aktywne transkrypcyjnie upakowanie DNA jest znacznie zredukowane. Rejony chromatyny zawierające geny aktywne transkrypcyjnie są bardziej wrażliwe na trawienie nukleazami niż pozostała część chromatyny. Klasyczne doświadczenie przeprowadzone dla chromatyny kurcząt pokazuje, że nadtrawienie nukleazami 10% DNA chromatyny z wątroby oznacza również nadtrawienie 10% genu owoalbuminy, natomiast w tej samej ilości nadtrawionego DNA chromatyny z jajowodów znajduje się aż 70% tego genu. Wynika to stąd, że gen owoalbuminy jest aktywny w jajowodach, lecz nie w wątrobie, struktura aktywnych rejonów chromatyny zaś jest mniej zwarta. Właściwość ta odnosi się nie tylko do aktualnie transkrybowanych genów, zarówno jeśli bierzemy pod uwagę czas transkrypcji, jak i położenie genu. Po pierwsze — rozluźnienie nie jest bezwzględnie skorelowane w czasie z transkrypcją, lecz ją poprzedza, a często pozostaje po zakończeniu transkrypcji (np. rejon genów globinowych w dojrzających erytrocytach kurzych). Po drugie — rejon rozluźnienia rozciąga się

zwykle poza obszar genu i najprawdopodobniej dotyczy całej pętli, w obrębie której znajduje się gen.

Rozluźnienie rejonów aktywnych transkrypcyjnie związane jest z utratą ponadnukleosomowych struktur chromatyny. W niektórych przypadkach intensywnie transkrybowanych genów (np. geny rybosomowe, geny białek szoku cieplnego) poważnym zakłóceniom ulega również struktura nukleosomowa. Do tej pory nie ma jasności, czy wiąże się to z nierównomiernym ułożeniem nukleosomów w aktywnym rejonie (zmienna długość łącznika), rozluźnieniem oddziaływań białko–białko i białko–DNA w obrębie nukleosomu, czy też całkowitym pozbawieniem aktywnego odcinka struktury nukleosomowej (od-dysocjowanie histonów).

Obecność nukleosomów w rejonie transkrypcji stwarza pytanie, w jaki sposób duża, złożona cząsteczka, jaką jest polimeraza RNA, może przesunąć się przez nukleosom, w którym DNA ściśle przylega do rdzenia białkowego. Żadna z kilku hipotez, jakie sformułowano na ten temat, nie doczekała się jeszcze potwierdzenia. Hipoteza prezentowana poniżej jest najpoważniej brana pod uwagę.

DNA w nukleosomie tworzy negatywny superheliks, owijając się wokół rdzenia histonowego. Toteż histony formujące rdzeń nukleosomowy mają największe powinowactwo do DNA o negatywnym superheliksie, natomiast niewielkie lub żadne — do DNA o pozytywnym superheliksie. Z drugiej strony, poruszająca się wzdłuż zamkniętej cząsteczki DNA polimeraza RNA rozplata podwójny heliks DNA przed sobą i zaplata za sobą, generując w ten sposób pozytywny superheliks przed, negatywny zaś — za rejonem transkrypcji (rys. 4.15). Hipoteza, o której mowa, zakłada, że nadmiar pozytywnego superheliksu przed cząsteczką polimerazy RNA prowadzi do wyszczepienia nukleosomu, który zostaje natychmiast wychwycony przez nadmiar negatywnego superheliksu za cząsteczką polimerazy. Efektem takiego procesu byłoby płynne przemieszczenie się nukleosomu obok poruszającej się polimerazy RNA (rys. 4.15).



Rys. 4.15. Prawdopodobny mechanizm przesuwania się polimerazy RNA wzdłuż włókna nukleosomowego. Tworzący się przed polimerazą RNA (POL) dodatni superheliks ułatwia wyszczepienie nukleosomu, natomiast powstający za polimerazą RNA ujemny superheliks ułatwia dołączenie wyszczepionej cząstki (wg D.J. Clark and G. Felsenfeld, *EMBO J.*, 10, 387–395. 1991)

4.17. Modyfikacje białek i DNA w chromatynie aktywnej transkrypcyjnie

W rejonach aktywnej transkrypcyjnie chromatyny występują zmiany w oddziaływaniu białek z DNA; spotyka się również swoiste lub swoiście zmodyfikowane białka. Dwie zmiany można bezpośrednio połączyć z rozluźnieniem włókna chromatynowego. Pierwsza, to słabsze oddziaływanie histonu H1 z pozostałymi składnikami chromatyny lub jego całkowity brak w rejonach aktywnych. Druga zmiana, to silna acetylacja histonów H3 i H4 w chromatynie aktywnej transkrypcyjnie, dotycząca ich zasadowych fragmentów N-końcowych. Zarówno histon H1, jak i N-końcowe fragmenty histonów rdzenia nukleosomu są niezbędne do sfałdowania się łańcucha nukleosomów we włókno 30 nm. Zmiany w obrębie histonu H1 i acetylacja N-końców histonów H3 i H4 uniemożliwiają wytworzenie grubego włókna chromatynowego.

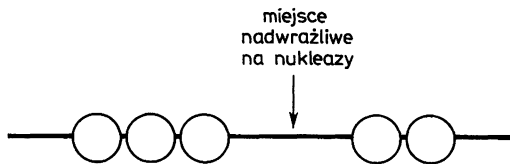
Poza wspomnianymi wyżej modyfikacjami w rejonach aktywnych spotyka się duże ilości dwóch rodzajów białek HMG (białka HMG 14 i 17), ubikwitynowane formy histonów H2A i H2B oraz niektóre inne białka.

Modyfikacje chromatyny w rejonach aktywnych transkrypcyjnie dotyczą nie tylko składników białkowych, lecz również DNA. Jednym z czynników regulujących ekspresję genów eukariotycznych jest metylacja cytozyny w pozycji 5'. Zachodzi ona prawie wyłącznie w sekwencjach zawierających dinukleotyd —CpG—. U wyższych eukariontów DNA w rejonach aktywnych transkrypcyjnie jest w mniejszym stopniu zmetylowany niż DNA chromatyny nieaktywnej. Dotyczy to czasem znacznych obszarów chromatyny: w żeńskich komórkach somatycznych ssaków DNA aktywnego chromosomu X jest w o wiele mniejszym stopniu zmetylowany niż DNA chromosomu nieaktywnego. Metylacja może zmieniać: powinowactwo DNA do czynników transkrypcyjnych, ułożenie nukleosomów w danym rejonie oraz oddziaływanie histonu H1 z DNA. Wzór metylacji DNA jest dziedziczny i wydaje się, że w liniach komórek somatycznych metylacja odgrywa rolę w przekazywaniu informacji o nieaktywnym stanie danego rejonu chromatyny do komórek potomnych. Wzór metylacji zmienia się podczas różnicowania się komórek.

Jak już wspomniano na początku, rozluźnienie struktury chromatyny nie jest warunkiem wystarczającym do rozpoczęcia transkrypcji. Umożliwia ono jedynie drugi etap aktywacji, polegający na rozpoznaniu przez czynniki transkrypcyjne swoich miejsc wiązania.

4.18. Miejsca nadwrażliwe na nukleazy

W chromatynie istnieje niewielka część genomu jeszcze bardziej wrażliwa na nukleazy (mniej więcej dziesięciokrotnie) niż chromatyna aktywna transkrypcyjnie. W odróżnieniu od tej ostatniej obszary te nazwano miejscami nadwrażliwymi na nukleazy. Są one rozmieszczone swoiście w stosunku do



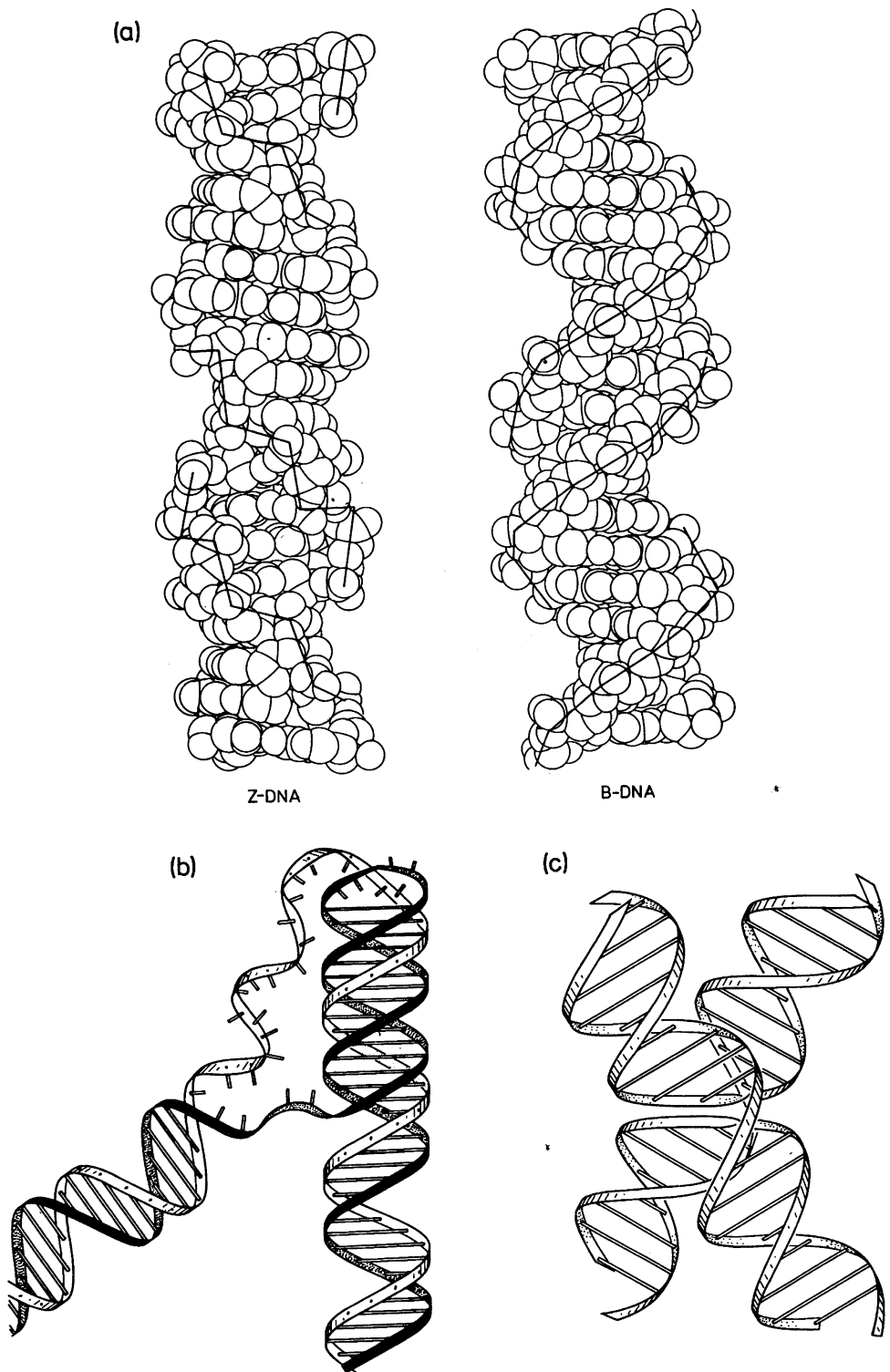
Rys. 4.16. Miejsca nadwrażliwe na nukleazy są pozbawione nukleosomów

sekwencji nukleotydów i nie występują w nich nukleosomy (rys. 4.16). Miejsca te są swobodnie dostępne dla czynników białkowych. Miejsca nadwrażliwe nazywane są często „otwartymi oknami” chromatyny. W miejscach nadwrażliwych zlokalizowane są sekwencje promotorowe, enhancery (wzmacniacze), silencery (sekwencje osłabiające transkrypcję), miejsca terminacji transkrypcji, miejsca inicjacji replikacji, miejsca swoistego wiązania topoizomeraz i centromery. Upakowanie w nukleosomy i zwinięcie w struktury wyższego rzędu zamyka większość eukariotycznego DNA w formie niedostępnej dla czynników białkowych. Tylko drobna część DNA znajduje się w miejscach nadwrażliwych. W ten sposób, dzięki istnieniu miejsc nadwrażliwych na nukleazy, ogromny genom eukariotyczny zostaje zredukowany w swojej części oddziałującej z białkami do rozmiarów porównywalnych z genomem bakteryjnym.

Miejsca nadwrażliwe mają wielkość od ok. 200 do ponad tysiąca par zasad. Niektóre z nich są trwałym elementem chromatyny (miejsca konstytutywne), inne mogą być indukowane, np. pod wpływem hormonu. Przykładem tego ostatniego mechanizmu jest powstanie miejsca nadwrażliwego w rejonie DNA wirusa MMTV (ang. mouse mammary tumor virus), który zawiera miejsce wiązania dla receptora glukokortykoidu. Przy braku hormonu miejsce wiązania receptora jest zajęte przez nukleosom. Po potraktowaniu komórek deksametazonem ten pojedynczy nukleosom ulega selektywnemu wyszczepieniu, odsłaniając miejsce nadwrażliwe. Mechanizm usuwania nukleosomu nie polega na prostym oddysocjowaniu go przez kompleks hormon – receptor.

4.19. Nietypowe konformacje DNA w chromatynie aktywnej transkrypcyjnie

Trzy nietypowe konformacje DNA, różne od podstawowej formy B-DNA, mogą istnieć w warunkach fizjologicznych dla jądra eukariotycznego: Z-DNA, trójniciowy DNA oraz forma krzyżowa DNA (rys. 4.17). Lewoskrętny Z-DNA powstaje w sekwencjach zawierających naprzemiennie purynę i pirymidynę; trójniciowy DNA — w sekwencjach homopurynowych lub homopirymidynowych, natomiast forma krzyżowa DNA — w sekwencjach palindromowych. Sekwencje zdolne do tworzenia nietypowych konformacji DNA występują w genomach eukariotycznych. Sekwencje $(TG)_n$ o długości większej niż 50 nukleotydów, które mogą formować Z-DNA, są obecne w genomie ludzkim



Rys. 4.17. Nietypowe formy DNA. (a) Porównanie Z-DNA i podstawowej formy B-DNA. (b) Forma trójniciowa. (c) Forma krzyżowa ((b) i (c) wg K. van Holde and J. Zlatanova, *BioEssays*, 18, 59–68. 1994)

w liczbie ok. 10^5 kopii, natomiast nie ma ich prawie w genomach prokariotycznych. Sekwencje zdolne do formowania trójniciowego DNA występują w genomie eukariotycznym przeciętnie co 150 tysięcy par zasad. Również sekwencje zdolne do przyjęcia formy krzyżowej zostały zidentyfikowane w wielu genomach eukariotycznych.

Obecność sekwencji zdolnych do przyjęcia nietypowej struktury DNA nie oznacza, że struktury takie istnieją *in vivo* w genomach eukariotycznych. Mogą one łatwo powstawać w trakcie wykonywania procedur prowadzących do ich identyfikacji. Okazało się, że wiele wcześniejszych doniesień, wskazujących na obecność nietypowych struktur DNA w genomie eukariotycznym, opierało się na artefaktach. Niektóre doniesienia zostały jednak pozytywnie zweryfikowane. Wskazują one na powiązanie obecności nietypowych struktur DNA z aktywnością transkrypcyjną chromatyny. Formy Z-DNA zostały np. wykryte w aktywnym transkrypcyjnie makronukleusie *Styloynchia mytilus*, lecz nie stwierdzono ich obecności w mikronukleusie, gdzie transkrypcja nie zachodzi.

Wszystkie opisane, nietypowe formy DNA albo utrudniają, albo wykluczają umieszczenie nukleosomu w tym miejscu, w którym zostały wytworzone. Z drugiej strony powstawanie nietypowych struktur DNA jest silnie stymulowane przez negatywne napięcie torsyjne. Napięcie takie, będące skutkiem uwolnienia superheliksu, pojawia się w momencie usunięcia nukleosomu. Można więc powiedzieć, że dana sekwencja może albo przyjąć nietypową strukturę drugorzędową, albo owinać się wokół rdzenia białkowego nukleosomu i że przejście strukturalne w obrębie DNA jest równoznaczne z decyzją co do obecności nukleosomu w danym miejscu. Taki mechanizm powstawania przynajmniej niektórych miejsc nadwrażliwych wydaje się zupełnie prawdopodobny.

5. KOD GENETYCZNY I BIOSYNTeza BIAŁEK

Proces translacji, czyli biosyntezy białka, jest ostatnim etapem ekspresji informacji genetycznej w komórce. Podczas transkrypcji informacja zawarta w sekwencji nukleotydów w DNA przepisana zostaje w komplementarną do niej sekwencję nukleotydów w informacyjnym RNA (mRNA). W procesie translacji informacja zaszyfrowana w łańcuchu mRNA jest tłumaczona na sekwencję aminokwasów w białku. Ogólny mechanizm biosyntezy białka opisany jest w kilku dostępnych na rynku polskim podręcznikach. Zespół tych wiadomości nie uległ istotnemu przekształceniu, nie będzie więc tu powtarzany. Krótki opis tego procesu, kluczowego dla realizacji zapisu genetycznego, posłuży wyłącznie do umiejscowienia nowych zjawisk związanych z mechanizmami translacji, zjawisk niejednokrotnie znacznie poszerzających nasze rozumienie mechanizmów tego procesu. Z konieczności będzie to przegląd selektywny, mechanizmy translacji stanowią wciąż przedmiot intensywnych badań relacjonowanych w wielu obszernych monografiach, będących źródłem pełnej informacji na temat owego wysoce złożonego procesu.

Rozważania nad ogólnymi regułami kierującymi syntezą białek zapoczątkował znany astrofizyk Gamow, który zwrócił już w roku 1954 uwagę na to, że jeśli informacja genetyczna dotycząca syntezy białek zapisana jest w postaci kolejności ułożenia zasad w DNA, to „alfabet”, którym ta informacja jest zapisana, czyli kod genetyczny, powinien podlegać prostym regułom matematycznym. Po to, by zapisać informację genetyczną dotyczącą ułożenia 20 elementów (aminokwasów) w białku za pośrednictwem czterech elementów (nukleotydów) trzeba, by poszczególne „litery” (tzw. kodony) tego alfabetu składały się z trzech nukleotydów, ułożonych w dowolnej kolejności. Grupując cztery elementy (zasady) w dowolnej kolejności w trójki, uzyskujemy 64 możliwe kombinacje trójek. Jeżeli ułożymy je w dwójki, to otrzymamy tylko 16 kombinacji — a więc mniej niż aminokwasów, układając w czwórki — aż 256 kombinacji, a więc o wiele za dużo. Jak się okazało, ta prosta hipoteza jest

trafna — przyroda wybrała jako swój „alfabet” genetyczny możliwie najprostszą wersję zapisu chemicznego, proste permutacje czterech zasad zgrupowanych w trójki.

Do tej pory nie wiadomo, jak przebiega odczyt informacji zapisanej owymi „trójkami” w DNA.

Doświadczenia Niremberga i Ochoa’y (nagroda Nobla z 1964 r.) doprowadziły do przypisania każdej z tych trójek odpowiedniego aminokwasu w białku. Okazało się, że np. syntetyczny mRNA — poli U (RNA złożony wyłącznie z nukleotydów urydynowych) — w układzie bezkomórkowym koduje syntezę polifenyloalaniny (polipeptydu zbudowanego wyłącznie z feniloalanin). Tak więc trójka U—U—U w kodzie genetycznym sygnalizuje, że w polipeptydzie powinna znaleźć się feniloalanina. Dzięki zanalizowaniu syntezy peptydów kodowanych przez różne oligonukleotydy rozszyfrowano wszystkie kodony i ułożono tzw. tabelę kodu genetycznego (tab. 5.1).

Tabela 5.1. (a). Kod genetyczny

I zasada	II zasada				III zasada
	U	C	A	G	
U	UUU F Phe	UCU S Ser	UAU Y Tyr	UGU C Cys	U
	UUC F Phe	UCC S Ser	UAC Y Tyr	UGC C Cys	C
	UAA L Leu	UCA S Ser	UAA <i>Ochre</i> ^a	UGA <i>Opal</i> ^a	A
	UUG L Leu	UCG S Ser	UAG <i>Amber</i> ^a	UGG W Trp	G
C	CUU L Leu	CCU P Pro	CAU H His	CGU R Arg	U
	CUC L Leu	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg	C
	CUA L Leu	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg	A
	CUG L Leu	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg	G
A	AUU I Ile	ACU T Thr	AAU N Asn	AGU S Ser	U
	AUC I Ile	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser	C
	AUA I Ile	ACA T Thr	AAA K Lys	AGA S Arg	A
	AUG M Met ^b	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG S Arg	G
G	GUU V Val	GCU A Ala	GAU D Asp	GGU G Gly	U
	GUC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly	C
	GUA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly	A
	GUG V Val	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly	G

^a Kodon terminacyjny.

^b Kodon inicjacyjny.

Tabela 5.1. (b). Oznaczenia jednoliterowe nazw aminokwasów

Ala — A	Cys — C	His — H	Met — M	Thr — T
Ans — N	Gln — Q	Ile — I	Phe — F	Trp — W
Arg — R	Glu — E	Leu — L	Pro — P	Tyr — Y
Asp — D	Gly — G	Lys — K	Ser — S	Val — V
A — Ala	F — Phe	K — Lys	P — Pro	T — Thr
C — Cys	G — Gly	L — Leu	Q — Gln	V — Val
D — Asp	H — His	M — Met	R — Arg	W — Trp
E — Glu	I — Ile	N — Asn	S — Ser	Y — Tyr

Należy zwrócić uwagę na konieczność występowania w kodzie genetycznym nie tylko sygnałów (liter) oznaczających poszczególne aminokwasy, ale też i sygnałów przestankowych, oznaczających początek i koniec danego białka. Kodony *amber*, *ochre* i *opal* — trójki UUA, UAG, UGA — są sygnałami terminacyjnymi. Jeżeli w mRNA wystąpi taki tryplet nukleotydowy, to wtedy aparat biosyntezy białka kończy syntezę danego polipeptydu. Sygnałem rozpoczęcia syntezy białka jest trójka AUG, (a w niektórych przypadkach GUG), oznaczająca metioninę. I rzeczywiście synteza wszystkich białek zaczyna się od metioniny. Nie wszystkie jednak białka na początku zawierają metioninę, bowiem aminokwas ten w wielu białkach po ukończeniu ich syntezy jest odcinany od powstałego polipeptydu przez specjalne enzymy.

5.1. Częsteczka adaptorowa, pojęcie antykodonu

Jak wspomniano, mRNA dodany do ekstraktów bezkomórkowych pozbawionych kwasów nukleinowych wywołuje w tych ekstraktach biosyntezę białek. Ten proces nosi nazwę translacji, w przebiegu której dokonuje się przekład informacji genetycznej z języka zasad azotowych na język aminokwasowy — język białek. Badając mechanizm biosyntezy białka stwierdzono, że w procesie translacji biorą udział organelle (średnica ok. 20 nm), tzw. rybosomy, obecne we wszystkich komórkach i będące centrami syntetyzującymi białka. Ponieważ aminokwasy chemicznie nie są komplementarne w stosunku do zasad azotowych zawartych w mRNA, przez co nie można „dopasować” cząsteczki aminokwasu do kodującej ten aminokwas trójki zasad, domyślano się że w komórkach istnieją tzw. cząsteczki adaptorowe, które jednym swoim końcem rozpoznają dany aminokwas, a drugim — swoisty kodon. I rzeczywiście, w komórkach wykryto swoisty rodzaj cząsteczek RNA wiążących chemicznie aminokwasy.

Taki RNA, zwany transferowym RNA (tRNA), jednym swoim fragmentem, tym gdzie występują niesparowane trzy zasady, tzw. antykodonowe, rozpoznaje trójki kodujące, drugim zaś — wolnym 3'- końcem ($-CCA_{OH}$) — może dołączyć aminokwas, w wyniku czego powstaje aminoacylo-tRNA.

Cząsteczki tRNA są stosunkowo niewielkie. Ich masa wynosi ok. $2,5-3 \times 10^4$ Da. Składają się one z 74–94 nukleotydów. W cytoplazmie każdej komórki znajduje się ok. 50–60 różnych typów tRNA. Wynika z tego, że dla wielu aminokwasów istnieje w komórce kilka odmian tRNA. Różne tRNA, specyficzne dla tego samego aminokwasu, zwane są izoakceptorowymi tRNA. Istnienie izoakceptorowych tRNA wynika stąd, że większość aminokwasów ma więcej niż jeden kodon. Jedna cząsteczka tRNA, a ściślej mówiąc jeden antykodon w tRNA, nie wystarczyłby do rozpoznania często dość znacznie różniących się od siebie kodonów dla tego samego aminokwasu. Rozpoznanie następuje w wyniku parowania trzech zasad kodonu z trzema antykodonami, przy czym parowanie to jest zasadniczo zgodne z regułami Watsona–Cricka, czyli z tworzeniem par A—U i G—C.

Pewna tolerancja w oddziaływaniu kodon – antykodon jest jednak dopuszczalna. Jeśli pierwszą (od 5'-końca) zasadą w antykodonie jest na przykład inozyna (I), to może ona oddziaływać z trzema różnymi zasadami (U, C lub A) w końcowej pozycji kodonów. Tego typu „nieprecyzyjne” oddziaływanie dozwolone jest tylko w przypadku trzeciej zasady kodonu; zasady: pierwsza i druga mogą tworzyć z antykodonom wyłącznie klasyczne pary zasad G—C i A—U. Reguły tworzenia wiązań wodorowych między trzecią zasadą kodonu i pierwszą zasadą antykodonu podaje tak zwana hipoteza tolerancji (ang. wobble hypothesis), zaproponowana przez Cricka (tab. 5.2).

Tabela 5.2. Dozwolone oddziaływania między trzecią zasadą kodonu a pierwszą zasadą antykodonu (hipoteza tolerancji Cricka)

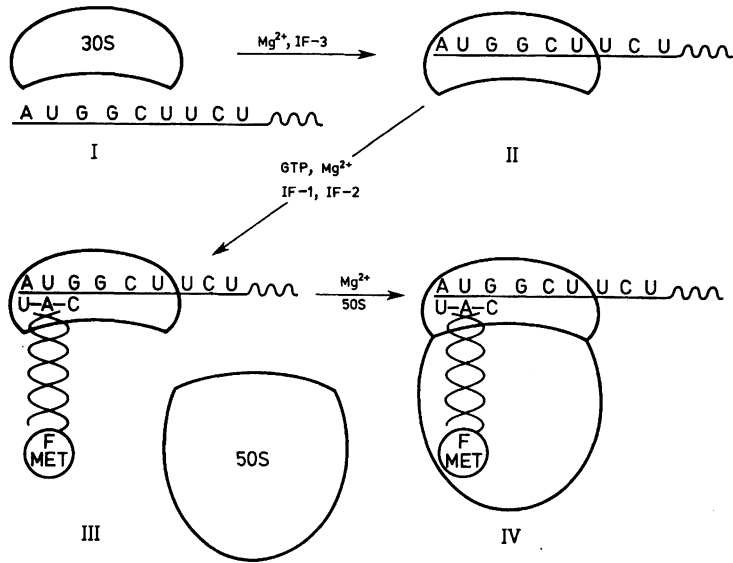
Pierwsza zasada antykodonu	Trzecia zasada kodonu
C	G
A	U
U	A lub G
G	U lub C
I	U, C lub A

Reguły te dobrze opisują sposoby parowania w przypadku kodu uniwersalnego, istnieją jednakże od nich odstępstwa w przypadku pewnych wariantów kodu swoistych, np. dla systemów mitochondrialnych.

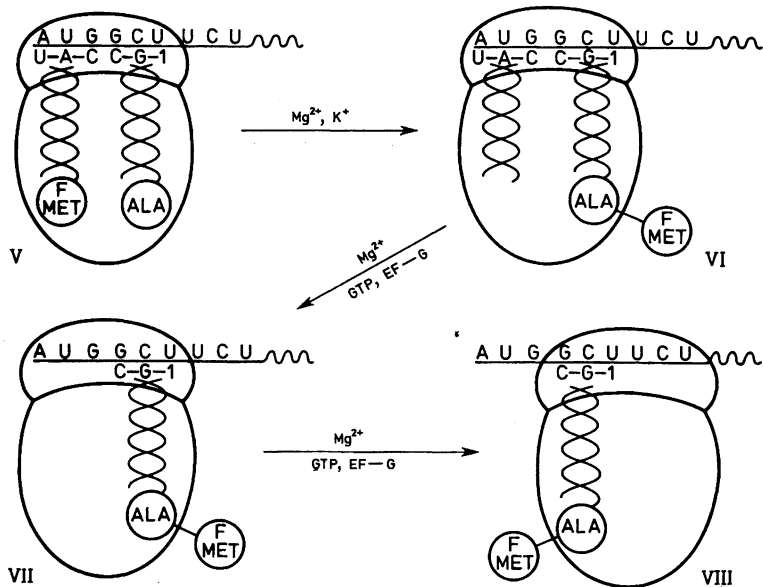
5.2. Schemat translacji

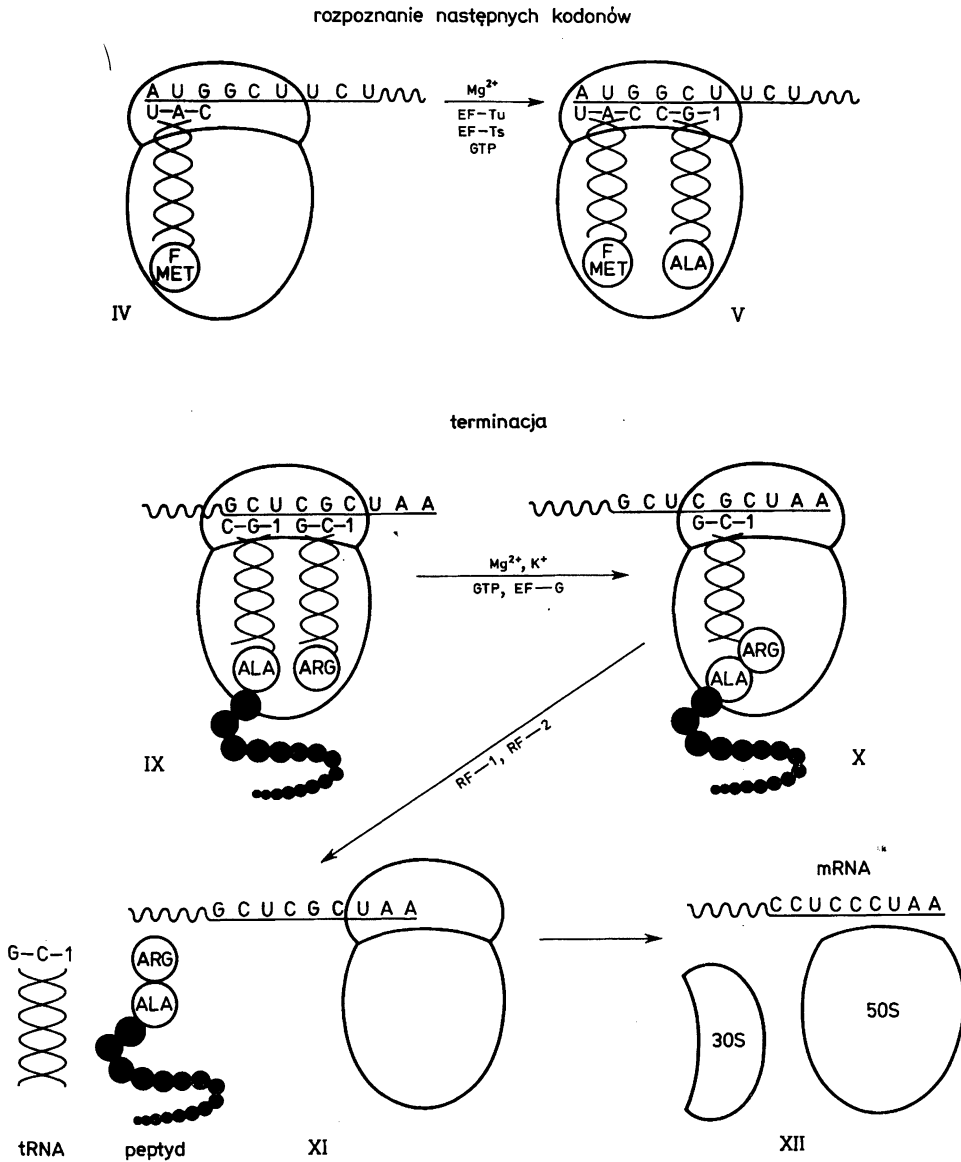
W procesie syntezy białka poszczególne składniki reagujące ze sobą muszą znaleźć się w ściśle określonym położeniu w stosunku do siebie, by reakcja mogła zajść. Na przykład reszty aminokwasowe i aminoacylo-tRNA muszą zbliżyć się do siebie na taką odległość, by między grupą NH₂ jednej z nich a grupą acylową drugiej mogło powstać wiązanie peptydowe. Podobnie antykodony tRNA muszą rozpoznawać kolejne trójki kodujące w mRNA bardzo precyzyjnie — nie omijając żadnej z zasad, ale i żadnej nie odczytując dwa razy. Tylko w ten sposób kod genetyczny odczytywany może być „w fazie” — informacja dotycząca sekwencji aminokwasowej podana jest w postaci kolejnych, nie zachodzących wzajemnie na siebie, trójek zasad azotowych. Tak wysokiej precyzji przebiegu reakcji nie mogłoby zapewnić jej zachodzenie w roztworze, gdzie cząsteczki reagujące zderzają się ze sobą przypadkowo i pod różnymi kątami. Cząsteczki biorące udział w biosyntezie białka muszą więc zostać uporządkowane przestrzennie i wzajemnie ustawione w jedynych właściwych pozycjach, zapewniających zajście reakcji. Funkcję porządkującą spełniają rybosomy. Zbudowane są one z dwu podjednostek, zwanych cięższą (stała sedymentacji 30S) i lżejszą (stała sedymentacji 50S),

łatwo dysocjujących i asocjujących. Chemicznie podjednostki rybosomowe są tworami nukleoproteinowymi, zbudowanymi z wielu białek i RNA rybosomowego. Na powierzchni tych organelli znajdują się odpowiednie miejsca wiążące, dopasowane kształtem do nici mRNA oraz aminoacylo-tRNA. Rybosomy wiążą te składniki na powierzchni, po czym rybosomowa syntetaza peptydylo-tRNA katalizuje syntezę wiązania peptydowego między dwoma



tworzenie wiązania peptydowego i transllokacja





kolejnymi resztami właściwie wybranych i ustawionych aminoacylo-tRNA. Samo tworzenie wiązania peptydowego jest reakcją enzymatyczną — fragment powierzchni rybosomu (a właściwie — RNA dużej podjednostki) ma bowiem właściwości enzymu, wielokrotnie przyspieszającego zajście reakcji syntezy wiązania peptydowego między resztami aminoacylo-tRNA. Po utworzeniu wiązania peptydowego, rybosom przesuwa się wzdłuż nici mRNA o następne trzy zasady. Towarzyszy temu odrzucenie zdeacylowanej cząsteczki pierwszego

tRNA, przemieszczenie drugiej cząsteczki tRNA niosącej na sobie dwupeptyd i dołączenie trzeciego w kolejności właściwego aminoacylo-tRNA. Przesunięcie się rybosomu wzdłuż nici mRNA jest procesem, w którym następuje ruch znacznej masy nici mRNA (masa — ok. 100 000 — 1 000 000 Da) w stosunku do rybosomu (masa — ok. 2 500 000 Da — w przypadku rybosomów bakteryjnych, a ok. 4 500 000 Da — w przypadku cytoplazmatycznych rybosomów eukariotycznych). Ruch ten wymaga oczywiście nakładu energii. Wydaje się, że energia czerpana jest z rozkładu GTP.

Kolejne fazy procesu translacji w układzie bakteryjnym przedstawione są na rysunku 5.1.

Faza inicjacji łańcucha białkowego polega na dołączeniu informacyjnego RNA do podjednostki 30S (rys. 5.1). Proces ten wymaga obecności Mg^{2+} i czynnika inicjacyjnego IF3. Czynniki — to białka biorące udział w biosyntezie łańcucha polipeptydowego, dołączające się do rybosomu w określonym stadium, lecz nie pozostające na rybosomie przez cały czas jego działania. W przeciwieństwie do czynników, białka strukturalne rybosomu obecne są w cząsteczce rybosomowej w ciągu całego cyklu biosyntezy białka. mRNA dołącza się do rybosomu w ten sposób, że zawarty w nim kodon inicjacyjny (tryplet AUG) umiejscowiony zostaje mniej więcej pośrodku podjednostki. Po związaniu trypletu AUG przez podjednostkę zachodzi dołączenie pierwszego aminoacylo-tRNA. Dołączenie inicjatorowego tRNA ułatwione jest przez czynniki IF1 i IF2, oparte jest jednak na rozpoznaniu kodonu AUG przez antykodon eksponowany w tRNA inicjatorowym i parującym się zgodnie z regułami Watsona – Cricka.

Do kompleksu inicjacyjnego dołącza się następnie druga podjednostka rybosomowa — 50S. Powstaje w ten sposób czynny rybosom 70S (monosom) i rozpoczyna się faza elongacji rozbita na dwa etapy: rozpoznania kodonów w mRNA i tworzenia wiązania peptydowego oraz translacji (rys. 5.1). Pierwszy etap polega na dołączeniu następnego aminoacylo-tRNA (tu alanylo-tRNA), określonego przez tryplet sąsiadujący z AUG (tu GCU). Reakcja ta jest wspomagana przez faktory elongacyjne T_u i T_s . Faktory te ułatwiają wiązanie się aminoacylo-tRNA z rybosomem. W drugim etapie następuje synteza wiązania peptydowego między dwoma resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi na rybosomie. Powstały peptydylo-tRNA ulega przemieszczeniu (translokacji) na rybosomie wraz z nicią mRNA. Nowy kodon wchodzi w obręb aktywnego miejsca rybosomu i następny aminoacylo-tRNA może zostać przyłączony, podobnie jak to było z poprzednim. Taki proces powtarza się aż do chwili, gdy do miejsca aktywnego w rybosomie przesunie się kodon terminacyjny (tu tryplet UAA). W rezultacie zachodzą reakcje, takie jak dołączenie czynników terminacyjnych (czynników białkowych powodujących uwolnienie polipeptydu), uwolnienie ukończonego peptydu i dysocjacja kompleksu rybosomowego. Powstały polipeptyd ulega następnie modyfikacjom chemicznym, z których najważniejszą jest proteolityczne obcięcie N-formylo-metioniny i ujawnienie w ten sposób odpowiedniego dla danego białka

N-końcowego aminokwasu. Łańcuch polipeptydowy ulega równocześnie zwinieniu w swoistą formę przestrzenną aktywnego białka.

Kodony AUG występują nie tylko na początku mRNA, ale i w środku nici mRNA, przy czym są one wówczas sygnałami wskazującymi nie na rozpoczęcie nowego białka, a na wstawienie w tworzący się łańcuch białkowy metioniny. Tak więc, inicjatorowe kodony AUG powinny w jakiś sposób różnić się od pozostałych wewnętrznych kodonów AUG. Wydaje się, że w przypadku bakterii różnica ta dotyczy sekwencji nukleotydowej, poprzedzającej w mRNA inicjatorowy kodon AUG. Zwykle w mRNA bakteryjnym przed kodonem AUG występuje kilka do kilkudziesięciu zasad nie niosących informacji dotyczącej biosyntezy białka, lecz swoiście wiążących się z bakteryjnym rybosomem inicjującym w ten sposób, że znajdujący się za nim kodon AUG zostaje wprowadzony we właściwe miejsce na rybosomie. W przypadku mRNA eukariotycznego sytuacja jest mniej jasna, ale też wydaje się, że nie odczytywany region mRNA, poprzedzający inicjatorowy kodon AUG, jest zbudowany w swoisty sposób, bowiem zwykle mRNA eukariotyczny rozpoczyna się 7-metyloguanozyną (struktura *cap*) rozpoznawaną swoiście przez rybosom, powodującą jego związanie się z rejonem zawierającym inicjatorowy kodon AUG.

Eukariotyczny system translacji (w cytoplazmie) działa zgodnie z regułami dotyczącymi systemów bakteryjnych. Eukariotyczne rybosomy jednakże są tworami bardziej złożonymi, o większej stałej sedymentacji (80S — monosom, 40S — mała podjednostka, 60S — duża podjednostka). Inicjacja kontrolowana jest przez 8–10 czynników białkowych i wymaga obecności zarówno GTP, jak i ATP. Najważniejszy w inicjacji eukariotycznej jest koniec 5' mRNA, na który „naniżują” się kolejno rybosomy, dlatego w systemach eukariotycznych rzadko zachodzi inicjacja wewnątrz policistronowych mRNA.

5.3. Struktura rybosomu

W złożonym procesie biosyntezy białka uczestniczy kilkadziesiąt składników mało- i wielkocząsteczkowych. Muszą one ze sobą współdziałać — w jednym miejscu i czasie. Miejscem grupującym składniki biorące udział w syntezie polipeptydu są rybosomy — organelle o średnicy ok. 2000 nm, występujące w każdej komórce. Rybosom, to cząstka rybonukleoproteinowa, złożona z dwu podjednostek. Każda z podjednostek zawiera swoisty RNA oraz swoisty zestaw białek inkrustujących ów RNA. RNA przybiera określoną strukturę przestrzenną z wielu „szpilkami do włosów”, powstającymi wskutek wewnętrznego parowania zasad wchodzących w skład rRNA, i wielu jednoniciowymi pętłami. Na ogół uważa się, że około 70% cząsteczki rRNA występuje w postaci odcinków sparowanych, a 30% — w postaci rozrzuconych. W przybliżeniu cząsteczka rRNA rybosomowego wygląda jak jeź ze szpilkami skierowanymi na zewnątrz. Struktura ta jest inkrustowana białkami (w większości — zasadowymi), zajmującymi określone w stosunku do siebie pozycje.

Powstały twór jest dość sztywną bryłą, która może w pewnym zakresie zmieniać swoje kształty. W czasie translacji elementy rybosomu mogą się w stosunku do siebie, w pewnym zakresie, przemieszczać, tym niemniej — na powierzchni rybosomu istnieją miejsca o swoistym kształcie, przyjmujące różne cząsteczki współreagujące ze sobą w czasie translacji.

Kształt rybosomu ulega nieznacznym zmianom w różnych etapach cyklu syntezy białka. Niemniej o zasadniczej jedności kształtu świadczy zdolność preparatów rybosomowych do krystalizacji. Analizy rentgenograficzne, wspomagane badaniami immunologicznymi, pozwalają określić pozycje poszczególnych białek i rRNA w rybosomie.

Struktura rybosomów i ich kompleksów z: mRNA, czynnikami inicjacyjnymi i elongacyjnymi oraz tRNA jest przedmiotem intensywnych badań. Wpływa ona bowiem w sposób oczywisty na przebieg odczytu kodu genetycznego.

5.4. Rybosomowe kwasy rybonukleinowe (rRNA)

W skład dużej i małej podjednostki rybosomowej wchodzi swoiste łańcuchy rRNA, których charakterystyczne cechy przedstawia tabela 5.3.

Tabela 5.3. Własności rRNA

Źródło rybosomów	RNA małej podjednostki		RNA dużej podjednostki		
	S*	długość (liczba nukleotydów)	większy składnik		mniejszy składnik
			S*	długość (liczba nukleotydów)	S*
<i>Eukaryota</i> , cytosol	18	1800	26–28	3400–4700	5; 5,8
<i>Prokaryota</i> (<i>E. coli</i>)	16	1550	23	2300	5
<i>Eukaryota</i> , chloroplasty	16	1500	23	2900	5; 4,5
Mitochondria:					
<i>S. cerevisiae</i>	15	1686	21	2865	brak
kukurydza	18	1962	26	3550	5
człowiek	12	954	16	1559	brak
<i>Trypanosoma</i>	9	597	12	1152	brak

*S — stała sedimentacji, wyrażona w svedbergach.

Zgodnie z danymi Brimacombe cząsteczki rybosomowego RNA z różnych organizmów tworzą podobne struktury przestrzenne. W cząsteczkach tych stwierdzono istnienie rejonów o dużej i małej zmienności. Rejony o małej zmienności sekwencji tworzą „rdzeń” cząsteczki, przyjmujący identyczny kształt w rybosomach pochodzących z różnych organizmów. Rejony o wysokiej zmienności, rozrzucone wzdłuż całej cząsteczki, przyjmują — w rybosomach pochodzących z różnych organizmów — struktury o różnych kształtach.

tach, układające się wokół „rdzenia”. Wykazano, że cząsteczki mitochondrialnego rRNA, pochodzące z różnych organizmów, również zawierają sekwencje o małej i dużej zmienności.

Rybosomy mitochondrialne (mitorybosomy) charakteryzuje nietypowa, w porównaniu z ich odpowiednikami cytosolowymi i bakteryjnymi, różnorodność wielkości rRNA. Wielkość RNA małej podjednostki mitorybosomu waha się od 600 do 1950 nukleotydów, tzn. od długości trzykrotnie mniejszej niż 16S rRNA podjednostki 30S rybosomów bakteryjnych, aż do wielkości przekraczającej rozmiary 18S rRNA podjednostki 40S rybosomów cytosolowych. Zróżnicowanie wielkości obserwuje się również w grupie rRNA dużej podjednostki mitorybosomu. Długość tych cząsteczek waha się od 1150 do 3550 nukleotydów, tzn. od połowy długości 23S rRNA podjednostki 50S rybosomów bakteryjnych, aż do wielkości odpowiadającej 26S rRNA podjednostki 60S rybosomów cytosolowych. Analiza potencjalnych struktur drugorzędowych rRNA mitorybosomów wykazała, że krótkie cząsteczki każdej z dwu grup rRNA (wchodzących w skład dużej i małej podjednostki mitorybosomu) przyjmują kształt odpowiadający strukturze „rdzenia” cząsteczki modelowej rRNA opisanej przez Brimacombe. Długie cząsteczki każdej z dwu klas, oprócz sekwencji wchodzących w skład „rdzenia”, zawierają sekwencje zmienne. Sekwencje te, różne u różnych organizmów, tworzą dodatkowe struktury i układają się wokół „rdzenia”.

Wśród sekwencji tworzących rdzeń struktury przestrzennej rRNA, zarówno małej, jak i dużej podjednostki rybosomu, można wyróżnić odcinki o najwyższym stopniu homologii i o zachowanej strukturze zarówno pierwszo-, jak i drugorzędowej. Te sekwencje uniwersalne wykazują podobieństwa nawet między odległymi ewolucyjnie organizmami, występują również w obrębie mitochondrialnych rRNA. Dla różnych cząsteczek rRNA stopień zgodności sekwencji jest najwyższy w rejonie sekwencji uniwersalnych, a znacznie niższy w pozostałych, np. mitochondrialny 18S rRNA pszenicy wykazuje aż 87,5% homologii z 16S rRNA *E. coli* w obszarze sekwencji uniwersalnych, a 60% w pozostałych rejonach. Średnia wartość homologii sekwencji mitochondrialnego 15S rRNA *A. nidulans* i 16S rRNA *E. coli* wynosi 59%, natomiast 68% — w rejonie sekwencji uniwersalnych.

5.5. Białka rybosomowe

Skrótowy przegląd białek wchodzących w skład rybosomów podają tabele 5.4(a) i 5.4(b). Białka wchodzące w skład małych podjednostek oznacza się numerem zgodnym z ich ruchliwością elektroforetyczną oraz prefiksem S (small). Białka dużej podjednostki oznacza się literą L (large) i odpowiednim numerem.

Tabela 5.4 (a). Białka wchodzące w skład małych podjednostek rybosomowych

Źródło podjednostek	(S) Stała sedimentacji podjednostek	Liczba białek	Masa cząsteczkowa białek (kDa)		Zawartość białka (% masy rybosomu)
			średnia	min max	
<i>Prokaryota (E. coli)</i>	30	21	16,0	9,0 – 35,0	40
<i>Eukaryota</i> , cytosol:					
<i>S. cerevisiae</i>	40	32	21,3	11,8 – 31,0	50
wątroba szczura	40	31	23,0	10,0 – 38,0	52
<i>Eukaryota</i> , mitochondria					
<i>S. cerevisiae</i>	37	33	27,3	9,5 – 60,0	56
wątroba bydłęca	30	33	22,7	10,0 – 48,0	68

Tabela 5.4 (b). Białka wchodzące w skład dużych podjednostek rybosomowych

Źródło podjednostek	(S) Stała sedimentacji podjednostek	Liczba białek	Masa cząsteczkowa białek (kDa)		Zawartość białka (% masy rybosomu)
			średnia	min max	
<i>Prokaryota (E. coli)</i>	50	34	19,0	9,6 – 32,0	33
<i>Eukaryota</i> , cytosol:					
<i>S. cerevisiae</i>	60	44	21,8	10,0 – 48,4	44
wątroba szczura	60	41	23,9	10,0 – 54,0	45
<i>Eukaryota</i> , mitochondria					
<i>S. cerevisiae</i>	50	38	23,0	10,0 – 41,0	40
wątroba bydłęca	40	52	21,9	8,8 – 49,0	67

5.6. Odstępstwa od kodu uniwersalnego

Uniwersalność kodu nie potwierdziła się w pełni. Okazało się, że w pewnych (rzadkich) przypadkach istnieją odstępstwa od uniwersalności. Dotyczy to szczególnie kodowania syntezy białek w mitochondriach. Tabela 5.5 podaje stwierdzone odstępstwa.

Tabela 5.5. Kodony mitochondrialne o zmienionym znaczeniu

Kodon	Kod uniwersalny	Mitochondria ssacze	Mitochondria drożdżowe	Mitochondria <i>Neurospora</i> i <i>Aspergillus</i>
UGA	stop	tryptofan	tryptofan	tryptofan
AGA AGG	arginina	stop	arginina	arginina
AUA	izoleucyna	metionina	metionina	izoleucyna
CUN	leucyna	leucyna	treonina	leucyna

Istotną cechą mitochondrialnego systemu translacji jest występowanie w mitochondriach znacznie mniejszej liczby izoakceptorowych tRNA niż to ma miejsce w cytoplazmie. Oznacza to, że do odczytu kodu mitochondria „dysponują” znacznie mniejszą liczbą antykodonów niż ma to miejsce w typowych układach cytoplazmatycznych. Zgodnie z założeniami Cricka, minimalna liczba antykodonów, niezbędnych do odczytu 64-literowego kodu — z uwzględnieniem hipotezy tolerancji (ang. wobble hypothesis) — wynosi 32. Tymczasem w mitochondriach drożdżowych stwierdzono istnienie tylko 27 różnych form tRNA. To oznacza, że w systemach mitochondrialnych pewne antykodony mogą odczytać więcej antykodonów niż przewidują to reguły Cricka, określające mechanizmy odczytu kodu uniwersalnego. Próbę zrationalizowania sytuacji przedstawił Lagerkvist, proponując uporządkowanie kodonów i antykodonów używanych w mitochondriach drożdżowych w zestawy tak zwanych rodzin (silnych, pośrednich, słabych) (tab. 5.6).

Tabela 5.6. Kodony i antykodony w kodzie genetycznym mitochondriów drożdżowych

UUU Phe UUC <u>AAG</u> *	UCU Ser UCC <u>AGU</u>	UAU Tyr UAC <u>AUG</u> *	UGU Cys UGC <u>ACG</u>
UUA Leu UUG <u>AAU</u> *	UCA UCG	UAA Stop UAG	UGA Trp UGG <u>ACU</u> *
CUU Thr CUC <u>GAU</u>	CCU Pro CCC <u>GGU</u>	CAU His CAC <u>GUG</u>	CGU Arg CGC <u>GCA</u>
CUA CUG	CCA CCG	CAA Gln CAG <u>GUU</u>	CGA CGG
AUU Ile AUC <u>UAG</u> *	ACU Thr ACC <u>UGU</u>	AAU Asn AAC <u>UUG</u>	AGU Ser AGC <u>UCG</u>
AUA Met AUG <u>UAC</u>	ACA ACG	AAA Lys AAG <u>UUU</u>	AGA Arg AGG <u>UCU</u>
GUU Val GUC <u>CAU</u>	GCU Ala GCC <u>CGU</u>	GAU Asp GAC <u>CUG</u>	GGU Gly GGC <u>CCU</u>
GUA GUG	GCA GCG	GAA Glu GAG <u>CUU</u>	GGA GGG

Kodony (5'–3') po lewej, antykodony (3'–5') po prawej stronie kwadratów.
Nukleotydy w pozycji „chwijnej” antykodonu są podkreślone. * – Nukleotydy zmodyfikowane.
Rodziny kodonów: ■ – silnych, ▨ – mieszanych, □ – słabych.

Zgodnie z propozycją Lagerkvista, do odczytu 64-kodonowego kodu mogą wystarczyć 23 antykodony, przy założeniu, że w obrębie tak zwanych „silnych” rodzin, tworzenie wiązań wodorowych między dwoma pierwszymi zasadami wystarcza do utworzenia dostatecznie stabilnych par między kodonem a antykodonem. W „silnych” rodzinach trzecia zasada kodonu nie jest więc

swoiście rozpoznawana przez pierwszą zasadę antykodonu. „Rozchwianie” trzeciej pozycji jest tu więc całkowite. To założenie dobrze tłumaczy obserwację, iż w mitochondriach drożdżowych kodony CUN kodują treoninę. Treonina kodowana jest również przez kodony ACN, czyli przez 8 kodonów, a nie przez 4, jak w kodzie uniwersalnym.

W obrębie pozostałych rodzin zasady parowania Cricka byłyby zachowane. W sumie, przy wzroście rozchwiania, odczyt kodu jest możliwy z użyciem mniejszej niż przewidziana przez Cricka liczby typów tRNA. Z rozważaniami Lagerkvista nie zgadza się jeden fakt. Mianowicie w mitochondriach drożdżowych kodon AUA koduje metioninę a nie izoleucynę. Być może antykonon tRNA^{Met} w mitochondriach jest swoiście modyfikowany i może odczytywać kodon AUG i AUA.

Propozycję Lagerkvista często streszcza się powiedzeniem „two out of three”, tzn. że dwie spośród 3 zasad kodonu (w silnych rodzinach) wystarczają do odczytu. Nie znaczy to oczywiście, że kod nie jest trójkowy, chociaż uważa się, iż to odczytywanie tylko dwu zasad może być śladem ewolucyjnym po kodzie pierwotniejszym, mającym — być może — właśnie charakter dwójkowy.

5.7. Zapis w mRNA może się różnić od zapisu w DNA

Jednym z paradygmatów biologii molekularnej było założenie, że zapis w mRNA odzwierciedla dokładnie zapis w DNA. Oczywiście wiadomo było, iż pre-mRNA może ulegać różnego rodzaju obróbkom potranskrypcyjnym (cięcie i składanie genowe, modyfikacje końców 5' i 3', p. rozdz. 8), nie przypuszczano jednak, że sekwencje kodujące mogą również ulegać zmianom potranskrypcyjnym zmieniającym sens transkryptów. Istnienie tego procesu, zwanego „editing”, czyli redagowaniem mRNA, stwierdzono analizując sekwencje cDNA, otrzymane przez odwrotną transkrypcję różnych mRNA. Okazało się, że sekwencje te, w pewnych przypadkach, nie odpowiadają sekwencjom genów kodujących dane mRNA. W niektórych przypadkach w sekwencji pewnej części populacji transkryptów tego samego genu odkrywano ramki odczytu, nie stwierdzane w genach kodujących owe nietypowe mRNA. Takie ramki odczytu powstają w wyniku insercji lub modyfikacji zasad w pre-mRNA. Geny kodujące mRNA, podlegające tego typu procesowi, nazwano genami milczącymi (ang. silent genes). Są to oczywiście formy genetyczne odmienne od pseudogenów.

5.8. Redagowanie może wprowadzić dodatkowy kodon terminalny

Jednym z białek zaangażowanych w regulowanie metabolizmu tłuszczowców jest apolipoproteina B. Białko to występuje w dwóch formach — długiej (100 000 Da) i krótkiej (48 000 Da). W nabłonku jelita cienkiego przeważa

forma długa, a w komórkach wątroby — krótka. Gen *ApoB* w obu tkankach jest identyczny, natomiast mRNA są różne. W nabłonku jelita w pozycji 2153–2155 występuje kodon CAA (Gln), w komórkach wątroby zaś — kodon ten zostaje zmodyfikowany, stając się sygnałem stop (UAA — ochre). Modyfikacja polega tu na enzymatycznej deaminacji cytozyny, procesie zachodzącym w kompleksie złożonym z białek komórkowych (wśród nich — deaminazy), zwanym „edytosomem”.

5.9. Redagowanie może kreować kodon inicjacyjny

Otwarta ramka odczytu genu chloroplastowego *Apl2* kukurydzy rozpoczyna się kodonem ACG. W mRNA kodon ten zastąpiony jest właściwym kodonem inicjatorowym AUG. Redagowanie polega tu na zamianie C→U, związanej najprawdopodobniej z deaminacją cytozyny występującej w pozycji 2 pre-mRNA.

5.10. Redagowanie może przywrócić treść kodu uniwersalnego

Na początku lat 80. zaproponowano, że w mitochondriach roślinnych, kodon CGG koduje tryptofan, a nie — jak w kodzie uniwersalnym — argininę. Wynikało to z analizy sekwencji kilku genów mitochondrialnych, która sugerowała, iż w pewnych pozycjach kodon CGG oznacza tryptofan, a w pewnych — argininę. Tak przynajmniej wynikało z porównania sekwencji genów i ich produktów białkowych. Sam fakt kodowania przez ten sam kodon dwóch różnych aminokwasów był dziwny. Co więcej — nie stwierdzono w mitochondriach istnienia tRNA tryptofanowego, mogącego odczytywać swoiście kodon

Tabela 5.7. Zmiany kodonów w genach mitochondriów zarodków pszenicy

Kodon w		Nazwa genu; lokalizacja zmienionego kodonu (jego numer w mRNA)
genie	mRNA	
<u>CGG</u> (R)	<u>UGG</u> (W)	<i>nad 3</i> (117); <i>cox 2</i> (57, 87, 129); <i>cox 3</i> (252); <i>cob</i> (120, 239)
<u>CAC</u> (H)	<u>UAC</u> (Y)	<i>cob</i> (100)
<u>CAT</u> (H)	<u>UAU</u> (Y)	<i>cob</i> (109)
<u>TCA</u> (S)	<u>UUA</u> (L)	<i>cox 2</i> (56)
<u>T\bar{C}G</u> (S)	<u>U\bar{U}G</u> (L)	<i>rps 12</i> (24); <i>nad 3</i> (115)
<u>TCT</u> (S)	<u>UUU</u> (F)	<i>cob</i> (227, 242); <i>cox 2</i> (26)
<u>CTC</u> (L)	<u>U\bar{U}C</u> (F)	<i>cob</i> (96)
<u>CCG</u> (P)	<u>CUG</u> (L)	<i>nad 4</i> (316)
<u>CCA</u> (P)	<u>CUA</u> (L)	<i>cox 3</i> (255)

Zmienione zasady podkreślono, aminokwasy kodowane oznaczono zapisem jednoliterowym w nawiasach.

CGG. Szczegółowa analiza sekwencji mRNA owych kilku genów wykazała, że tam, gdzie w DNA występuje kodon CGG, mający kodować w białku mitochondrialnym argininę, również w mRNA występuje kodon CGG. Niektórym kodonom CGG DNA odpowiadają jednak w mRNA kodony UGG — czyli typowe, uniwersalne kodony tryptofanowe.

Mechanizm tej zamiany treści wybranych kodonów nie jest znany; mógłby on polegać na dezaminacji cytozyny prowadzącej do powstania z kodonu CGG — kodonu UGG. To zjawisko potranskrypcyjnej zmiany treści kodonów jest w systemie mitochondriów roślinnych rozpowszechnione. Tabela 5.7 podaje wykazane przypadki takiej zamiany.

5.11. Redagowanie może nadać sens informacji, kreując otwarte ramki odczytu w rezultacie licznych rozrzuconych insercji

Gen podjednostki α ATPazy mitochondrialnej *Physarium polycephalum* ma dziwną strukturę. Fragmenty tego genu odpowiadają sekwencjom genów homologicznych z innych organizmów, ale sam gen jest bezsensowny, nie niesie otwartej ramki odczytu i wiele jego odcinków nie jest kolinearnych z przewidywaną sekwencją białka ATPazy. Okazało się, że w mRNA występują 54 dodatkowe cytozyny, wstawiane co kilkanaście — kilkadziesiąt nukleotydów. Odległości między miejscami insercji wahają się od 11 do 52 nukleotydów, średnio wynoszą 26 nukleotydów. Mechanizm tego procesu jest nieznan. W rezultacie — 54 insercje kreują pełną, otwartą ramkę odczytu, której tylko „ślady” zawarte są w genie.

Zdumiewające jest tu ograniczenie redagowania do otwartej ramki odczytu. Czyżby proces ten miał charakter ko-translacyjny i uczestniczył w nim rybosom?

5.12. Redagowanie może nadać sens informacji na skutek blokowych insercji urydyn i delecji urydyn

Inny mechanizm kreacji otwartej ramki odczytu w produkcie transkrypcji genu, pozornie nie kodującego białka, stwierdzono w przypadku syntezy III podjednostki oksydazy cytochromowej *Trypanosoma brucei*. Mechanizm ten oparty jest na wstawianiu w określone miejsce 1–6 urydyn oraz na punktowych delecjach urydyn. Postulowanym źródłem urydyn jest transkrypt określonego genu, zwany RNA „przewodnim” (ang. guide RNA). Na końcu 3' RNA przewodniego występuje oligo—U — być może na skutek transestryfikacji dostarczającej wstawianych w mRNA urydyn. Odwrócenie procesu może być źródłem delecji U.

Zmiany zachodzące w wyniku redagowania oczywiście nie zakłócają zasadniczego mechanizmu procesu translacji ani zasad kodowania. Należy pamiętać, iż zapis w DNA nie zawsze musi odzwierciedlać dokładnie strukturę mRNA. Pewne „dziwności” kodu, postulowane na podstawie analizy sekwencji genów, mogą się okazać tylko hipotezami, bowiem mRNA ulega wielu obróbkom.

5.13. Transferowy RNA (tRNA)

Jak wspomniano w omówieniu schematu translacji (p. rys. 5.1) rozpoznanie kolejnych kodonów i usytuowanie kolejnych aminokwasów w tworzącym się łańcuchu peptydowym dokonuje się w wyniku oddziaływania z mRNA na rybosomie odpowiednich cząsteczek transferowego RNA.

Łączenie się odpowiednich aminokwasów ze swoistymi tRNA ma charakter enzymatyczny i katalizowane jest przez enzymy, zwane aminoacylo-tRNA syntetazami.

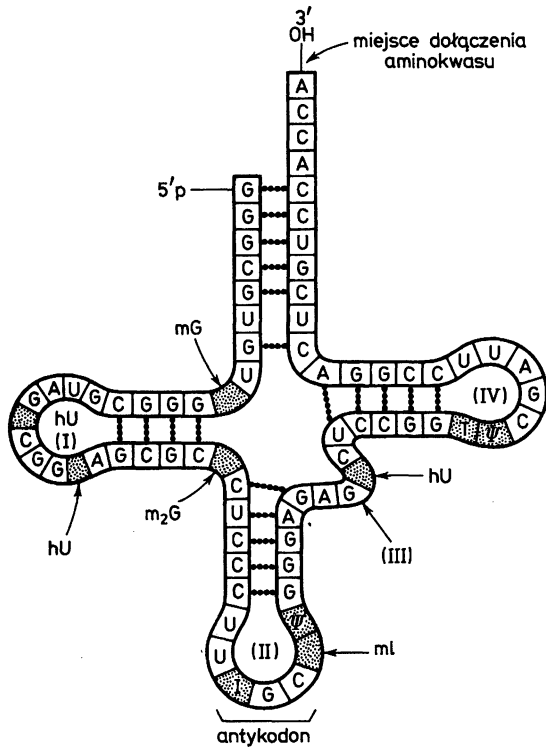
Na rybosomie kolejne aminoacylo-tRNA łączą się, przy czym zaktywowane grupy karboksylowe estryfikują wolne grupy —NH_2 . Powstaje w ten sposób łańcuch polipeptydowy, gdzie aminokwasy połączone są wiązaniem peptydowym. Wiązanie peptydowe powstaje z wkładem energii, stąd konieczność zajęcia aktywacji.

Sekwencje nukleotydowe kilkuset typów tRNA pochodzących z różnych organizmów są poznane, w wielu przypadkach określona też jest ich struktura przestrzenna.

Wiadomo, że jednoniciowy łańcuch tRNA jest swoiście zwinięty, tworząc dzięki wewnętrznym sparowaniom charakterystyczną strukturę drugorzędową, zbliżoną do liścia koniczyny (p. rys. 5.2).

W cząsteczkach tRNA występuje wiele modyfikowanych zasad — modyfikacje te wprowadzane są posttranskrypcyjnie w procesie tzw. dojrzewania cząsteczki tRNA. Funkcje tych modyfikacji nie są do końca wyjaśnione, chociaż wiadomo, że modyfikowane zasady występujące w pętli antykodonowej mogą wpływać na właściwości kodujące tRNA.

W cząsteczce widać 4 charakterystyczne pętle, zwane kolejno od końca 5' — dihydrourydylową (I), antykodonu (II), zmienną — bo w różnych typach tRNA ma różną długość (III), pseudourydylową lub T Ψ C — bo zawiera charakterystyczną zasadę Ψ , czyli pseudourudynę (IV). Dwuniciowe fragmenty, na których osadzone są pętle, to tak zwane ramiona. Ramię utworzone przez sparowanie odcinków 5' i 3'-końcowych, to tak zwane ramię aminokwasowe, bo na jego końcu (w pozycji 3') umiejscowiona jest grupa OH przyjmująca aminokwas. Struktury pierwszorzędowe i sekwencje antykodonów są oczywiście dla różnych tRNA różne, we wszystkich czynnych cząsteczkach tRNA na końcu 3' znajduje się sekwencja CCA_{OH}. Cząsteczka przyjmuje swoistą strukturę trzeciorzędową — pętle I i IV łączą się ze sobą dodatkowymi



Rys. 5.2. Alaninowy tRNA drożdżowy

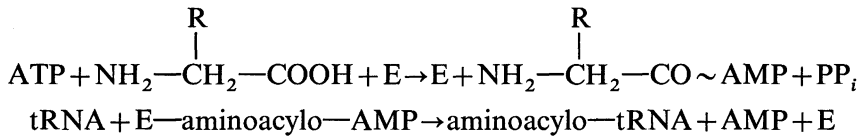
wiązaniem wodorowymi, cząsteczka zagina się w postać o kształcie litery L, gdzie ramię antykodonowe zajmuje pozycję dłuższej, a aminokwasowe — krótszej kreski.

Cząsteczki tRNA o swoistych kodonach (np. alaninowym) niosą na sobie odpowiedni aminokwas (alaninę) i w ten sposób następuje odczyt kodu zapisanego w mRNA.

5.14. Swoistość aminoacylacji tRNA

Działanie cząsteczek adaptorowych wyjaśnia więc w jaki sposób zostaje rozwiązany problem chemicznej niekomplementarności kodonów i aminokwasów, ale stwarza inny problem. Widać wyraźnie, że proponowany odczyt kodu jest możliwy tylko wtedy, jeśli tRNA o odpowiednim antykodonie (np. alaninowym) zostanie „naładowany” odpowiednim aminokwasem (alanina). Zapewnić to może tylko wysoka swoistość rozpoznania przez enzym aminoacylujący, zarówno tylko jednej odpowiedniej klasy tRNA, jak i tylko jednego — odpowiedniego aminokwasu. W istocie to właśnie na etapie aminoacylacji następuje przyporządkowanie odpowiednich aminokwasów odpowiednim antykodonom, a tym samym — kodonom, czyli właściwie to tu następuje „przełożenie” kodu na język aminokwasowy. Syntetazy katalizują więc reakcję aktywacji aminokwasu, w wyniku której powstaje reaktywna forma

AMP ~ aminokwas i katalizują przerzucenie z tej formy aminokwasu na 3'-końcową grupę OH łańcucha tRNA.



Wiadomo, że w komórkach każdemu aminokwasowi odpowiada swoista syntetaza, aminoacylująca wszystkie tRNA izoakceptorowe tego aminokwasu. Syntetazy są organellowo specyficzne; mogą więc wykazywać swoistość do organellowych wersji izoakceptorów. Proces aminoacylacji jest obciążony pewnym błędem, toteż swoiste aminoacylasy mogą z pewną częstotliwością błędnie acylować, np. odpowiadający im tRNA niewłaściwym aminokwasem. Enzymy te jednak katalizują również deacylację, przy czym hydrolizie ulegają przede wszystkim produkty błędnej acylacji. W rezultacie acylacja jest rzeczywiście swoista. W istocie struktury przestrzenne różnych tRNA są zbliżone, muszą więc istnieć subtelne mechanizmy, dzięki którym syntetazy rozpoznają z wysoką swoistością odpowiadające im tRNA. Ta wysoka swoistość wyboru właściwego tRNA i odpowiadającego mu aminokwasu to podstawowe zagadnienie w procesie translacji. Na ogół uważa się, że rozpoznanie tRNA przez syntetazy może odbywać się za pośrednictwem różnorodnych mechanizmów. Punkty kontaktu tRNA z syntetazą są liczne, rozpoznanie może więc odbywać się w wyniku oddziaływania z „całością” cząsteczki tRNA. W niektórych przypadkach jednym z punktów kontaktu jest antykodon — może się wydawać, że wówczas sygnałem decydującym o swoistości aminoacylacji tRNA jest właśnie trójnukleotydowy kodon.

Oczywiście nie może to być reguła generalna — przeczy jej generalności prosty fakt — istnienie tRNA supresorowych.

5.15. Supresorowe tRNA

Mutacje punktowe prowadzą zwykle do zmian aminokwasowych (neutralnych lub niekorzystnych). Czasem mogą doprowadzić do pojawienia się w rejonie kodującym genu — dodatkowego kodonu terminalnego (np. mutacja A → U w kodonie glutaminowym AAG kreuje kodon UAG — amber). Prowadzi to do przerwania syntezy polipeptydu. Mutant może ulec tzw. rewersji ekstragenowej, polegającej na mutacji kompensującej, ale zlokalizowanej w antykodonie pewnych tRNA. Na przykład tRNA_{Ser}^{AAG} może zmutować do tRNA_{Ser}^{AUC} i wtedy kodon terminalny może zostać odczytany jako seryna.

Jak widać, ten nowy tRNA niesie zamiast antykodonu serynowego AGG (parującego z kodonem serynowym UCC) nowy antykodon AUC. AUC nie odczytuje kodonów serynowych, lecz kodon UAG (*amber*). Mimo, że w strukturze owego nowego tRNA nastąpiła zmiana antykodonu na taki, który nie

może brać udziału w odczytywaniu kodonów serynowych, cząsteczka tRNA supresorowego w dalszym ciągu ulega aminoacylacji seryną. A więc przynajmniej w tym przypadku, to nie treść antykodonu decyduje o swoistości aminoacylacji. Widać sygnałem swoście rozpoznawanym przez syntetazę serynową są jakieś elementy struktury tRNA^{Ser} leżące poza antykodonem.

5.16. Swoistość aminoacylacji może być określona przez nietypową parę zasad umieszczoną w ramieniu aminokwasowym

Poszukiwanie elementów struktury tRNA odpowiedzialnych za swoistość aminoacylacji przeprowadzili Ya-Ming Hou i Schimmel. Analizowali oni efekty zmian struktury trzech tRNA supresorowych *E. coli* — tRNA^{Cys}_{CUA}, tRNA^{Phe}_{CUA}, tRNA^{Ala}_{CUA}. Wszystkie trzy tRNA wywołują supresję mutacji *amber*. Układ doświadczalny polegał na analizie supresji mutacji *amber* w *E. coli*, prowadzącej do auktotrofii tryptofanowej. Wprowadzenie do komórki plazmidu niosącego alaninowy tRNA supresorowy przywracało zdolność wzrostu na pożywce bez tryptofanu; plazmidy niosące pozostałe supresory nie dawały tego efektu. Mutageneza kierunkowa genu tRNA supresorowego wskazała, że efekt supresji znika, gdy w cząsteczce tRNA^{Ala}_{CUA} zostanie naruszona nietypowa para G3:U70, zlokalizowana w ramieniu aminokwasowym. Wiele innych zmian w różnych rejonach cząsteczki nie powodowało żadnego efektu. Autorzy uznali, że znaczy to, iż akurat para G3:U70 może być odpowiedzialna za swoistość rozpoznania przez syntetazę alaninową. Wprowadzili więc tę parę w odpowiednim miejscu pozostałych dwu supresorów, które były przedtem nieaktywne (wstawiają cysteinę lub fenyloalaninę, a nie alaninę). Okazało się, że po takiej modyfikacji oba supresory aktywnie znoszą auktotrofię, a w produkcie białkowym znaleziono wstawioną alaninę. *In vitro* oba zmodyfikowane w ramieniu akceptorowym tRNA ulegały aminoacylacji alaniną (a nie — cysteiną lub fenyloalaniną). W sumie okazuje się, że w przypadku syntetazy alanylo-tRNA to para G3:U70 określa wybór odpowiedniego tRNA, przy czym wybór ten zachodzi w bardzo różnych kontekstach sekwencji otaczających. Mamy tu do czynienia z czymś w rodzaju „drugiego kodu” — krótki zapis w sekwencji tRNA określa rodzaj wiążącej się z nim syntetazy, a tym samym — aminokwasu.

5.17. Supresja może zachodzić w wyniku „omyłek” rybosomów. Dwuznaczność translacji

Zagadnienie supresji kodonów terminalnych analizował w latach 60. L. Gorini. Zaobserwował, że supresja taka (tzw. fenotypowa) może być związana ze zmianami w strukturze rybosomów. Gorini śledził wpływ streptomycyny na

wzrost bakterii powodujących niekorzystne mutacje, polegające na wprowadzeniu dodatkowych przedwczesnych terminacji syntezy określonych polipeptydów. Streptomycyna to antybiotyk hamujący wzrost normalnych bakterii. A tymczasem okazało się, że owe mutanty nie rosnące bez streptomycyny zaczynają w jej obecności rosnać. Oczywiście był to słaby wzrost, ale wyraźnie widoczny. Po wycofaniu streptomycyny z pożywki, mutanty przestawały rosnać, czyli objawiały się znów efekty mutacji wyjściowej.

Przedłużone hodowle w obecności streptomycyny prowadziły nawet do pojawienia się szczepów streptomycynozależnych.

Streptomycyna to antybiotyk wiążący się z rybosomami. Na tej podstawie Gorini założył, że streptomycyna, wiążąc się z rybosomami, zmienia ich strukturę w ten sposób, iż zaczynają one nieco inaczej odczytywać kod. Następuje „rozluźnienie” zasad parowania kodon–antykodeon, translacja staje się „dwuznaczna” i kodon terminalny może zostać odczytany z udziałem jednego z naturalnych aminoacylo-tRNA jako znaczący. Szczepy streptomycynozależne zgodnie z hipotezą byłyby mutantami, w których została zmieniona struktura rybosomów. Zmiana ta miałaby spowodować zbyt „sztywne” stosowanie zasad parowania. Tak zmienione rybosomy mogłyby funkcjonować tylko po wysyceniu streptomycyną „rozluźniającą” parowanie. Swoją hipotezę Gorini potwierdził w doświadczeniach *in vitro* z użyciem bezkomórkowych systemów translacyjnych. Wykazały one, że streptomycyna (ale i wiele innych czynników, np. alkohol) rzeczywiście podnosi dwuznaczność translacji. Dwuznaczność wyraża się w zwiększeniu częstości błędnego włączenia aminokwasów, niezgodnego z sekwencją kodonów w mRNA. Oczywiście zjawisko to dotyczy nie tylko odczytu kodonów terminalnych.

I tak, jeśli użyć jako mRNA polinukleotydu urydylowego (poli U), to w normalnych warunkach syntetyzowana jest polifenyloalanina. W obecności streptomycyny powstaje polipeptyd mieszany zawierający 95% fenyloalaniny oraz 5% leucyny. Tak więc kodon UUU, normalnie odczytywany jako fenyloalanina, przy podniesionej dwuznaczności może kodować z pewną częstością leucynę.

Rybosomy, izolowane ze szczepów streptomycynozależnych, były nieaktywne w translacji poli U — jeżeli do systemu nie dodano streptomycyny. Analiza składu takich rybosomów wykazała, że jedno z białek małej podjednostki rybosomowej — S4 ma zmienioną strukturę w porównaniu z analogicznym białkiem ze szczepu dzikiego.

Wszystkie elementy hipotezy wyjściowej Goriniego zostały więc potwierdzone. W sumie ogranicza się ona do stwierdzenia, iż struktura rybosomu w pewnym zakresie decyduje o sposobie parowania kodon–antykodeon. Zmiany struktury rybosomu mogłyby więc obniżać lub podnosić dwuznaczność odczytu. Oczywiście mutacje białka S4, prowadzące do streptomycynozależności (mutacje *strA*), obniżają dwuznaczność odczytu. Istnieje jednakże drugi typ mutacji — podnoszących dwuznaczność. Mutanty takie (zwane *ram*) zostały zidentyfikowane przez Goriniego i wykazano, iż związane są one również ze

zmianami w budowie małej podjednostki rybosomowej. Mutacja *ramA* zlokalizowana jest w genie kodującym białko S4, *ramC* — w genie białka S5.

Efekt działania mutacji *ram* jest więc przeciwny do efektu działania mutacji *strA*, a analogiczny do działania streptomycyny. Za dokładność translacji odpowiadają dwie grupy białek małej podjednostki rybosomalnej, które mają przeciwny wpływ na dwuznaczność translacji. Do pierwszej grupy należą białka S4 i S5, a do drugiej — S12 i S17. Kontrola translacji przez rybosom odbywa się na poziomie selekcji wiązania cząsteczek tRNA, w ramach której kompleksy rybosomu z niewłaściwymi tRNA ulegają dysocjacji, natomiast kompleksy z prawidłowymi cząsteczkami tRNA doprowadzają do parowania kodon–antykodeon. Badania nad kinetyką translacji wykazały, że streptomycyna zwiększa tempo translacji kosztem obniżenia jej dokładności. W obecności antybiotyku rybosom zmienia strukturę, co powoduje przyśpieszenie procesu wiązania kodon–antykodeon. Odwrotny efekt obserwuje się w mutantach streptomycynoopornych typu *strA*, gdzie zwiększenie dokładności translacji odbywa się kosztem zmniejszenia jej szybkości. Zależność dokładności translacji od jej szybkości nie potwierdza się jednak w przypadku mutantów *ram*, które mimo podwyższonego poziomu dwuznaczności nie wykazują różnicy w szybkości translacji w stosunku do szczepu dzikiego. Zapewne selekcja tRNA, kontrolowana przez rybosom, jest procesem przynajmniej dwuetapowym. Etapem pierwszym, warunkującym szybkość, byłaby selekcja wstępna, drugi etap zaś, kontrolowany przez produkt genu *ram*, stanowiłoby właściwe parowanie kodon–antykodeon, zachodzące z udziałem energii.

Na podstawie swoich doświadczeń, zgodnie z którymi rybosomy wykazują pewien naturalny poziom dwuznaczności, Gorini uznał, że dwuznaczność jest procesem fizjologicznym. Uważał on (co się zresztą potwierdziło), iż prawidłowe funkcjonowanie komórki wymaga odczytania z niewielką częstością pewnych kodonów terminacyjnych. Produktami translacji genów zakończonych takimi „przeciekającymi” (ang. leaky) kodonami terminalnymi byłyby, oprócz właściwie zakończonych białek, ich przedłużone formy, kończące się na następnych — czasem dość odległych od pierwszego — kodonach terminalnych.

Pewien poziom dwuznaczności translacji obserwuje się również w układach eukariotycznych. Zmiany dwuznaczności związane są ze swoistymi zmianami albo w strukturach pewnych białek rybosomowych, albo w rybosomowym RNA. Zjawisko to wskazuje, że parowanie kodon–antykodeon jest kontrolowane przynajmniej w pewnym zakresie przez rybosom. Widać to wyraźnie w przypadku mitochondrialnych systemów translacyjnych, gdzie obowiązują bardziej „luźne” zasady parowania kodon–antykodeon. Odmienności kodu cytoplazmatycznego i mitochondrialnego towarzyszą poważne odmienności w budowie rybosomów i tRNA.

Podsumowując: biosynteza białka nie jest procesem precyzyjnym. U *E. coli* częstość błędów w translacji w przeliczeniu na kodon oszacowano na 10^{-3} – 10^{-4} . Warunkiem włączenia kolejnego aminokwasu jest dostateczna

trwałość wiązania kodon–antykodeon. Parowanie kodonu z antykodonem zachodzi w kompleksie o bardzo niskiej trwałości i niewłaściwie sparowane kompleksy są eliminowane. Pierwszorzędne znaczenie w procesie selekcji tRNA ma struktura rybosomu i jest to główny czynnik decydujący o częstości błędów w translacji. W znacznie mniejszym stopniu o poziomie dwuznaczności decydują błędy syntetaz aminoacylo-tRNA i polimerazy RNA.

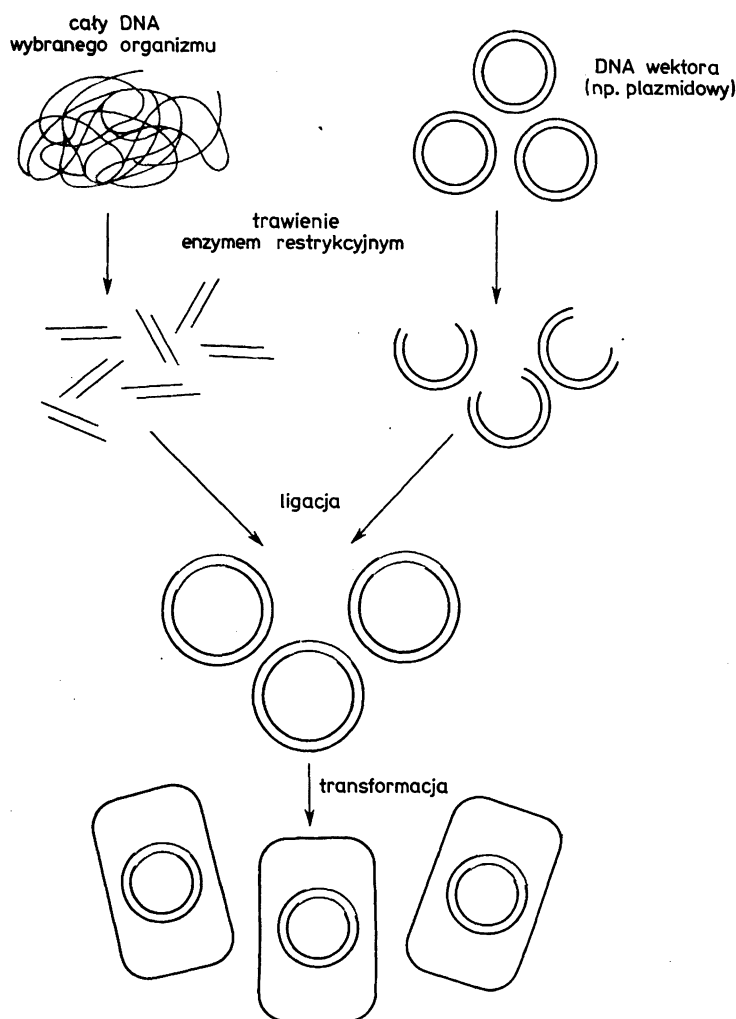
6. REKOMBINOWANIE I KLONOWANIE DNA

Ogromny postęp, jaki dokonał się w biologii w ostatnich kilkunastu latach, jest w dużej mierze wynikiem zastosowania w pracach badawczych nowych technik. Spośród nich niewątpliwie największe znaczenie mają techniki rekombinowania i klonowania DNA wprowadzone w połowie lat 70. i stanowiące najistotniejszy element wielkiego zbioru, potocznie zwanego „inżynierią genetyczną”. Umożliwiają one tworzenie nowych kombinacji genów, również i takich, które nigdy nie miałyby szansy powstania w naturze. Techniki inżynierii genetycznej wykorzystano do konstrukcji wielu użytecznych mikroorganizmów oraz do tworzenia nowych odmian roślin i zwierząt hodowlanych. Zagadnieniom tym poświęcony jest rozdział 14. Z punktu widzenia nauk podstawowych najważniejsze konsekwencje opracowania technik inżynierii genetycznej wynikają z wydzielenia i charakteryzowania pojedynczych genów. Dzięki temu poznano między innymi strukturę genów wyższych organizmów i uzyskano wiele informacji o ich działaniu.

W rozdziale tym przedstawione są podstawowe techniki służące do wyodrębniania i powielania genów oraz przenoszenia ich z jednego organizmu do drugiego. Naszym celem nie było podanie dokładnych przepisów laboratoryjnych. Czytelnik może je znaleźć w specjalnych pozycjach, z których najbardziej znanym jest podręcznik „Molecular Cloning”, opracowany przez Frisha, Sambrooka i Maniatisa. Chodziło nam przede wszystkim o przedstawienie zasad najważniejszych technik oraz schematów typowych doświadczeń wykonywanych obecnie w pracowniach genetycznych. Znajomość tych zasad pozwoli na zrozumienie, w jaki sposób uzyskano większość opisanych w pozostałych rozdziałach informacji o budowie i działaniu genów.

6.1. Wyodrębnianie i powielanie genów

Do czasu wynalezienia metod inżynierii genetycznej pewne manipulacje genetyczne, polegające na wyodrębnianiu genów i ich przenoszeniu z jednej komórki do drugiej, wykonywano jedynie na bakteriach, wykorzystując tzw. łagodne fagi (p. transdukcja). Operacje tego typu miały jednak bardzo ograniczony zasięg. W przypadku organizmów eukariotycznych nie znano żadnych metod, które pozwalałyby na wyodrębnianie i charakteryzowanie poszczególnych genów. Główna trudność wiąże się z wielkością genomów wyższych organizmów i polega na tym, że pojedynczy gen stanowi ich jedną kilku- lub nawet kilkusettyśięcną część i znalezienie go na tak dużym genomie jest



Rys. 6.1. Ogólny schemat typowego doświadczenia, którego celem jest sklonowanie genu z dowolnego organizmu. Objasnienia w tekście

poważnym problemem technicznym. Uniwersalne rozwiązanie tego problemu przyniosły metody rekombinowania i klonowania DNA. Podstawowy schemat tych zabiegów jest przedstawiony na rysunku 6.1. Główne etapy typowego doświadczenia, w którym DNA klonowany jest w mikroorganizmach, to: fragmentowanie oczyszczonego uprzednio DNA organizmu, z którego zamierzamy wyodrębnić gen, łączenie fragmentów DNA z cząsteczkami wektorowymi i wprowadzanie zrekombinowanych wektorów do komórek, w których mogą się one powielać.

Fragmentowanie DNA przeprowadza się wtedy, gdy poszukujemy pojedynczych genów w genomie danego organizmu. Narzędziem, stosowanym w tym przypadku, są na ogół enzymy restrykcyjne, chociaż fragmenty DNA można uzyskać i innymi drogami, np. działając na wielkocząsteczkowy DNA ultradźwiękami lub przepuszczając go przez wąską kapilarę.

Drugi etap to łączenie fragmentów DNA, czyli rekombinowanie DNA *in vitro*. Można połączyć ze sobą dowolne cząsteczki DNA, a enzymem, który wytwarza wiązania fosfodiesterowe, jest ligaza DNA. W typowym doświadczeniu łączymy (rekombinujemy) fragmenty genomowego DNA z cząsteczkami wektorowymi. Wektory są to niewielkie cząsteczki DNA, mające zdolność do samodzielnej replikacji w komórce. Podłączony do wektora fragment DNA będzie po wprowadzeniu zrekombinowanej cząsteczki do komórki ulegał powielaniu. Ten etap określa się jako klonowanie DNA.

Poszczególne etapy całej procedury, a także narzędzia (enzymy restrykcyjne i wektory) służące do jej przeprowadzenia, zostaną dokładniej omówione w kolejnych punktach tego rozdziału. W tym miejscu konieczne jest jedynie zwrócenie uwagi na to, że wynikiem doświadczenia przedstawionego na rysunku 6.1 i omówionego powyżej jest uzyskanie banku genów (biblioteki genów) danego organizmu. Cały genom organizmu występuje w postaci fragmentów DNA podłączonych do poszczególnych cząsteczek wektorów. Po wprowadzeniu zrekombinowanych wektorów do komórek, każdy fragment genomu ulega oddzielnie powieleniu. Nasz bank genów występuje obecnie w postaci klonów komórek (np. bakterii). Po to, aby zidentyfikować wektor zawierający fragment DNA z interesującym nas genem (lub zidentyfikować klon komórek, w których ten wektor się znajduje) należy przeprowadzić kolejne doświadczenia, których przykłady podane są w podrozdziale 6.5.

Warto również dodać, że przedmiotem manipulacji genetycznych są nie tylko geny wyodrębniane z genomów rozmaitych organizmów. Wiele doświadczeń wykonuje się na DNA syntetyzowanym chemicznie lub enzymatycznie. Metody chemicznej syntezy DNA są obecnie na tyle dobrze poznane, że można było w dużej mierze zautomatyzować proces syntezy. Istnieją urządzenia do otrzymywania oligonukleotydów o określonej sekwencji i długości (zwykle 20–40 nukleotydów), z których za pomocą ligazy DNA „montuje się” dłuższe fragmenty DNA i kompletne geny kodujące określone białka.

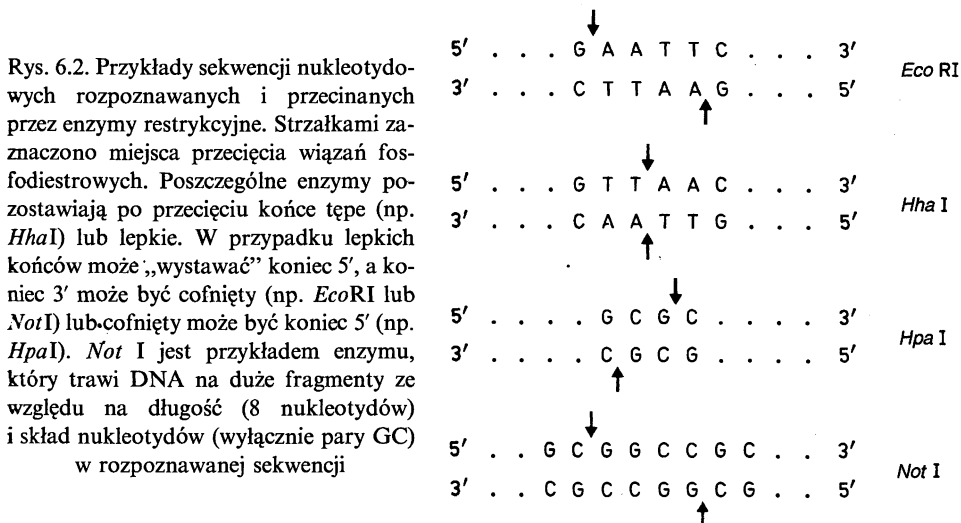
W przypadku enzymatycznej syntezy DNA (tzw. cDNA), jako matrycę stosuje się najczęściej mRNA, który polimeraza DNA zależna od RNA

(odwrotna transkryptaza) „przepisuje” na jedną, a następnie na drugą nić DNA. Podobnie, jak DNA pochodzący z dzielenia genomu na fragmenty, DNA syntetyzowany chemicznie lub enzymatycznie jest podłączany do wektorów i powielany w komórkach odpowiednich mikroorganizmów.

6.2. Enzymy restrykcyjne

Enzymy restrykcyjne (inaczej: restryktazy) są podstawowym narzędziem inżynierii genetycznej. Są to enzymy należące do grupy endonukleaz. Znanych jest kilka różnych klas tych enzymów, przy czym największe znaczenie praktyczne mają enzymy klasy II, które rozpoznają i przecinają określone sekwencje nukleotydowe w cząsteczce DNA. Rozpoznawane przez te enzymy sekwencje składają się z 4–8 nukleotydów, a miejsce przecięcia znajduje się w obrębie rozpoznawanej sekwencji lub w ściśle określonej odległości od niej. Enzymy restrykcyjne występują w bakteriach i sinicach. Stanowią element „systemu obronnego” tych organizmów, chroniącego je przed atakiem wirusów. Dany szczep bakterii ma jednocześnie zdolność wytwarzania enzymu modyfikującego (metylazy), rozpoznającego te same sekwencje DNA, co wytwarzana w tym szczepie endonukleaza i zmieniającego je w taki sposób, aby nie były przecinane. Dzięki temu „własny” DNA nie jest trawiony przez „własne” restryktazy, natomiast „obcy”, nie zmodyfikowany, podlega degradacji.

Znanych jest obecnie kilka tysięcy restryktaz, z których kilkaset jest sprzedawane przez firmy zajmujące się handlem odczynnikami chemicznymi. Enzymy te określa się za pomocą symboli, np. *EcoRI* oznacza enzym uzyskiwany ze szczepu R bakterii *Escherichia coli*, a *HindIII* oznacza enzym ze szczepu *Haemophilus influenzae* serotyp d. Liczba rzymska wynika z chronologii izolowania enzymów z tych samych mikroorganizmów.



Formą aktywną enzymów restrykcyjnych klasy II są w większości przypadków homodimery, kofaktorem restrykcji jest Mg^{+2} . Sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne mają najczęściej charakter sekwencji palindromowych, tzn. że, jeśli są odczytywane z każdej nici w kierunku np. $5' \rightarrow 3'$, to są identyczne. Przecięcie wiązań fosfodiesterowych dwu nici zachodzi albo dla tej samej pary zasad (wtedy strawiony DNA kończy się tzw. tępymi końcami), albo z przesunięciem o jedną lub dwie pary zasad (strawiony DNA jest zakończony tzw. lepkiymi końcami) (rys. 6.2). Lepkie końce ułatwiają łączenie ze sobą (ligację) fragmentów DNA.

W cząsteczce DNA o statystycznie losowej sekwencji zasad, zawierającej 50% par GC, dany tetranukleotyd zdarza się co 259 zasad, heksanukleotyd — co 4096 par zasad, a heksanukleotyd składający się tylko z par GC — co 65 536 par zasad. Z wyliczeń tych wynika wniosek praktyczny co do stosowania określonych enzymów restrykcyjnych. Jeżeli zależy nam na strawieniu DNA na niewiele fragmentów, użyjemy enzymu rozpoznającego sześci nukleotydowe sekwencje, a w szczególności takie, w których występują sekwencje CpG lub GpC, szczególnie rzadkie w genomach organizmów eukariotycznych.

6.3. Mapy restrykcyjne

Jedną z najważniejszych cech enzymów restrykcyjnych jest powtarzalność fragmentacji cząsteczek DNA. Na przykład enzym *EcoRI* strawi DNA faga λ zawsze na 6 fragmentów, a enzym *Hind III* — zawsze na 8 fragmentów, podczas gdy enzym *EcoRV* rozpoznający czteronukleotydowe sekwencje, strawi ten sam DNA na 22 fragmenty. Liczba fragmentów DNA, uzyskiwanych po trawieniu danym enzymem danej cząsteczki DNA, zależy jedynie od liczby sekwencji rozpoznawanych przez enzym, występujących w tej cząsteczce DNA. Wielkość fragmentów DNA, uzyskiwanych w wyniku trawienia danej cząsteczki DNA, jest zależna od odległości między sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym. Fragmenty cząsteczek DNA można łatwo rozdzielić, stosując metodę elektroforezy DNA w żelach agarozowych lub akrylamidowych. W żelach tych fragmenty przesuwały się z prędkością, zależną głównie od ich masy: droga, jaką fragment przebywa w żelu, jest w określonym zakresie odwrotnie proporcjonalna do logarytmu jego masy. Zwykle wielkość fragmentów DNA uzyskanych po strawieniu jakiejś cząsteczki odczytuje się z żeli, na których oprócz badanych próbek DNA naniesiono mieszaninę fragmentów DNA o znanej wielkości.

Obraz cząsteczki DNA, na którym zaznaczone są miejsca rozpoznawane przez różne enzymy restrykcyjne z uwzględnieniem odległości między nimi wyrażonej w nukleotydach, nazywa się mapą restrykcyjną. Przykładowy rozdział fragmentów DNA plazmidu i sporządzoną na tej podstawie mapę restrykcyjną kolistej cząsteczki DNA przedstawiono na rysunku 6.3. Mapy restrykcyjne możemy sporządzać dla stosunkowo niewielkich cząsteczek DNA,

liczących nie więcej niż sto kilkadziesiąt tysięcy nukleotydów. W przypadku cząsteczek większych, liczba fragmentów DNA uzyskiwanych po strawieniu nawet pojedynczym enzymem jest zwykle zbyt duża, aby można je było rozdzielić na żelu i określić ich wielkość.

Analiza restrykcyjna DNA jest zabiegiem, który najczęściej poprzedza wszelkie badania nad klonowaniem i sekwencjonowaniem fragmentów DNA.

6.4. Wektory

Jeżeli udałoby się nam wprowadzić do komórki dowolnego organizmu, np. bakterii, niczym nie chroniony fragment obcego DNA, to wkrótce zostałby on zdegradowany do pojedynczych nukleotydów. Większość manipulacji genetycznych wykonuje się z założeniem, że wprowadzony do komórek gospodarza fragment DNA (gen) będzie w nich funkcjonował, tj. replikował się i podlegał ekspresji. Aby to uzyskać, fragmenty DNA wprowadza się do komórek za pośrednictwem wektorów, cząsteczek DNA, które mają zdolność do autonomicznej replikacji w danym typie komórek i które zapewnią powielanie wprowadzonego fragmentu DNA, a w wielu przypadkach również i wydają ekspresję zawartych w nim genów.

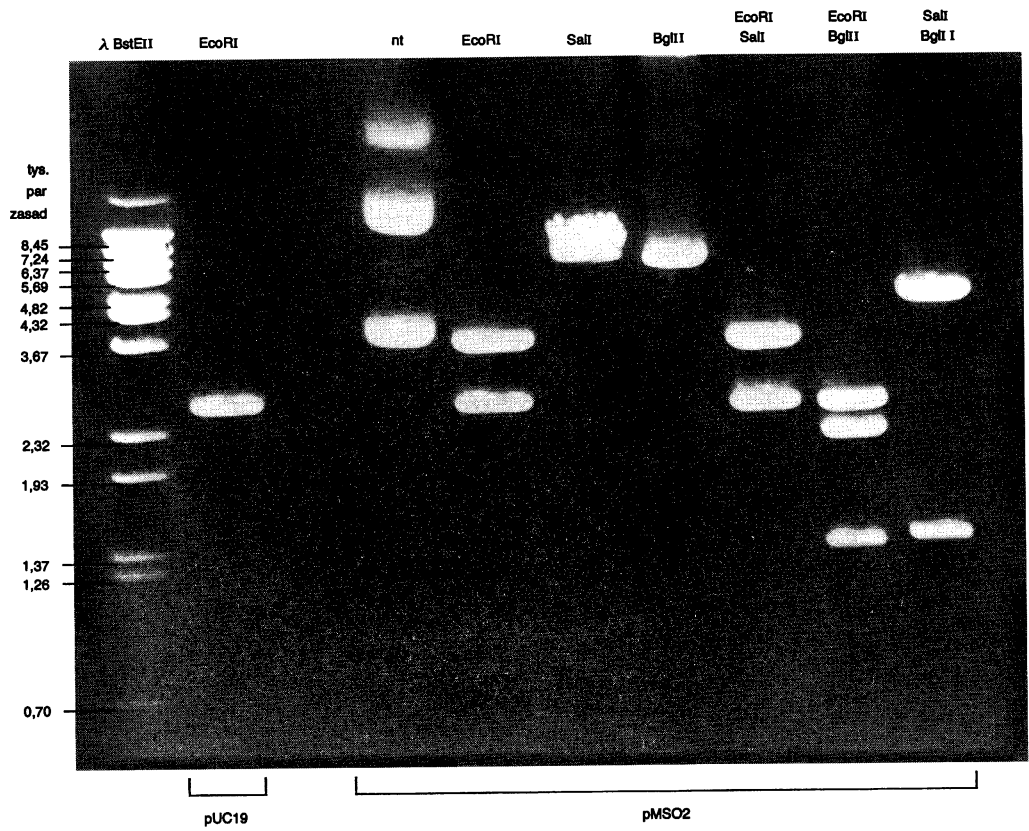
Nie ma uniwersalnych wektorów do wszystkich rodzajów komórek. Różnice w przebiegu procesów replikacji, transkrypcji i translacji między *Prokaryota* a *Eukaryota*, a także między gatunkami należącymi do każdej z tych dwóch klas organizmów, zmuszają nas do dobierania wektorów w zależności od tego, w jakich komórkach zamierzamy klonować dany gen. Najistotniejszym elementem wektora, od którego zależy jego specyficzność, są sekwencje odpowiedzialne za inicjację replikacji, tzw. sekwencje *ori* (ang. origin). Jeżeli wektor ma np. służyć do namnażania fragmentów DNA w komórkach *E. coli* i *Saccharomyces cerevisiae*, to musi zawierać odpowiednie sekwencje *ori* jednego i drugiego organizmu.

Wektory zwykle wyposażane są w tzw. markery, czyli geny odpowiedzialne za łatwo wyróżnialne cechy fenotypowe, jak np. oporność na antybiotyk czy też zdolność syntezy łatwo oznaczalnego enzymu (np. β -galaktozydaza lub acetylaza chloramfenikolu). Geny markerowe mogą pochodzić z dowolnego organizmu, muszą być jednak wyposażone w sekwencje warunkujące ich prawidłową transkrypcję i translację w komórkach, do których wprowadzamy dany wektor.

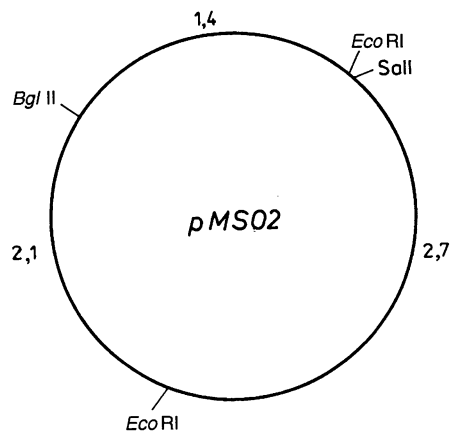
6.4.1. Bakteryjne wektory plazmidowe

Plazmidy są to występujące w komórkach bakterii i niektórych innych organizmów kolisty cząsteczki DNA, replikujące niezależnie od replikacji chromosomów. W latach 70., jako wektor, wykorzystywany był naturalnie

(a)



(b)



występujący plazmid *ColE1*, obecnie — wszystkie stosowane wektory plazmidowe złożono z fragmentów DNA pochodzących z różnych źródeł.

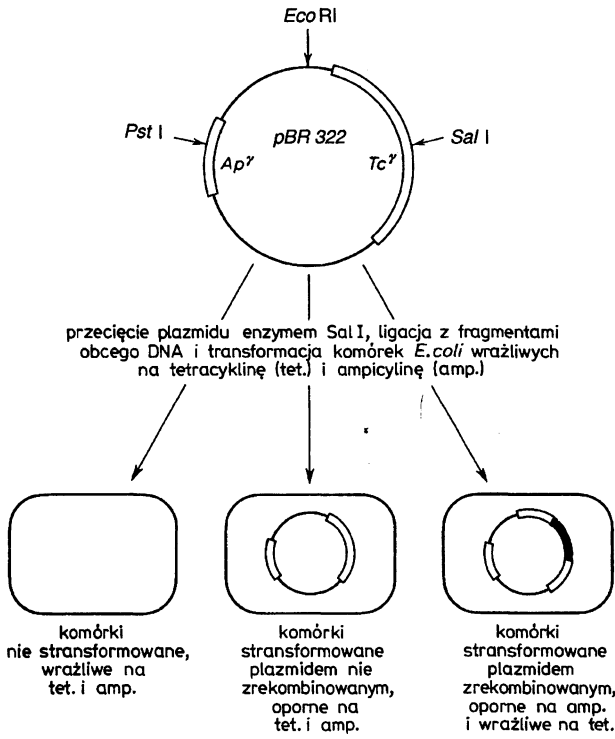
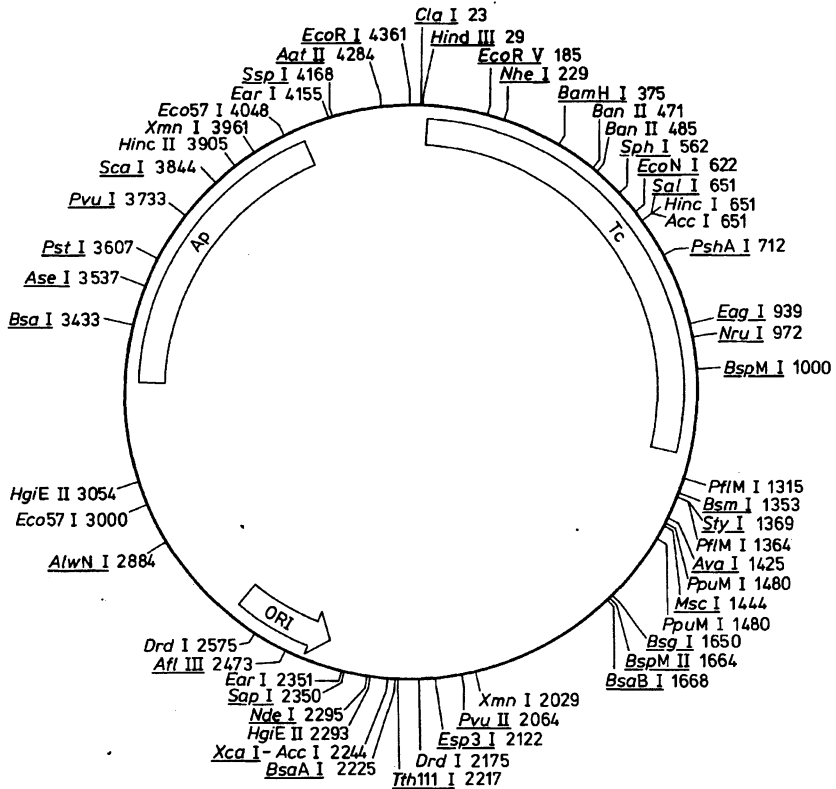
Wektory plazmidowe wprowadza się do komórek bakterii, wykorzystując zjawisko transformacji. Transformacja komórek *E. coli*, bakterii najczęściej stosowanej w eksperymentach genetycznych, wymaga zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych (komórki traktuje się roztworem chlorku wapnia). 1 µg DNA plazmidowego wystarcza na stransformowanie 10^7 – 10^8 komórek. W typowym doświadczeniu transformacji ulega 1 na 10^6 komórek.

Klasycznym wektorem plazmidowym *E. coli* jest *pBR322* (rys. 6.4), plazmid o znanej sekwencji 4362 par nukleotydów. Niesie on dwa geny markerowe *amp^r* i *tet^r*, warunkujące oporność na ampicylinę i tetracyklinę. Miejsce startu replikacji (*ori*) *pBR322* pochodzi z plazmidu *ColE1* i zapewnia obecność kilkudziesięciu kopii plazmidu w komórce. W obrębie DNA plazmidu *pBR322* znajdują się pojedyncze miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne, jak *Eco* RI, *Bam* HI, *Pst* I i kilka innych. Enzym *Pst*I przecina DNA plazmidu w obrębie genu *amp^r*. Wprowadzanie w to miejsce fragmentów obcego DNA pozwala na rozróżnienie plazmidów zrekombinowanych od nie zrekombinowanych. Pierwsze z nich będą miały uszkodzony gen *amp^r*, a zatem będą nadawać komórce jedynie cechę oporności na tetracyklinę, podczas gdy drugie będą nadawały oporność na oba antybiotyki (*amp^r* i *tet^r*).

Do szeroko stosowanych wektorów należą plazmidy serii *pUC* (rys. 6.5). Są one pochodnymi plazmidu *pBR322*, niosącymi tzw. polilinker oraz fragment genu *lacZ* z *E. coli*, zawierający promotor i sekwencję kodującą N-końcową część białka β -galaktozydazy. C-końcowa część białka jest „dostarczana” przez defektywny gen, znajdujący się w chromosomie w szczepie bakterii stosowanym do transformacji. W takim szczepie aktywna β -galaktozydaza powstaje w wyniku tzw. α -komplementacji. Polilinker, to krótki odcinek DNA, w którym występują sekwencje rozpoznawane przez rozmaite enzymy restrykcyjne, co pozwala na łączenie z wektorem fragmentów DNA strawionego różnymi enzymami restrykcyjnymi.

Kolonie komórek *E. coli* zawierających plazmid *pUC* mają niebieski kolor, gdy hoduje się je na podłożu zawierającym X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktozyd). Zabarwienie kolonii wynika z obecności β -galaktozydazy

Rys. 6.3. Przykład analizy restrykcyjnej zrekombinowanego wektora. Na plazmidzie *pUC19* w miejscu *Eco* RI sklonowano fragment DNA. Uzyskany plazmid (*pMS02*) trawiono trzema enzymami restrykcyjnymi i kombinacjami po dwa enzymy. Produkty trawienia rozdzielono w żelu agarozowym (a). Dla porównania, w tym samym żelu rozdzielano DNA faga λ trawiony *Bst*I (standard wielkości) i wektor *pUC19* przecięty *Eco* RI. Żel wybarwiono bromkiem etydyny i sfotografowano w świetle ultrafioletowym. Jest to standardowy sposób ukazania DNA. Na podstawie obrazu migracji fragmentów DNA w żelu ułożono mapę restrykcyjną plazmidu (b). Wartości liczbowe na mapie plazmidu oznaczają odległość w tysiącach par zasad. Zauważ, że w elektroforezie na żelu agarozowym można rozróżniać także formy konformacyjne cząsteczek DNA o tej samej wielkości: ścieżka „nt” to preparat nie trawionego zrekombinowanego plazmidu. Trzy widoczne prążki odpowiadają (od góry) formie kolistej superhelikalnej, formie kolistej zrelaksowanej i formie liniowej



w komórkach. Włączenie fragmentu DNA w obręb polilinkera powoduje zablokowanie syntezy N-końcowej części β -galaktozydazy i białe zabarwienie kolonii. Dzięki temu można rozróżnić komórki zawierające wektory zrekombinowane od takich, które przenoszą wektor nie zrekombinowany.

Istnieją rozmaite wektory plazmidowe, przygotowane do realizacji określonych celów klonowania. Często konstruuje się tzw. wektory ekspresyjne, pozwalające na bardzo wydajną syntezę białek kodowanych przez znajdujące się na wektorze geny. Wektory takie niosą sekwencje umożliwiające wydajną transkrypcję i translację, a także zapewniające stabilność wytwarzanego białka. Dzięki wektorom ekspresyjnym można uzyskiwać szczepy bakteryjne, w których białko kodowane przez gen umieszczony na wektorze stanowi ponad 30% białka bakterii. Tego rodzaju szczepy wykorzystywane są w nowoczesnej biotechnologii (p. rozdz. 14).

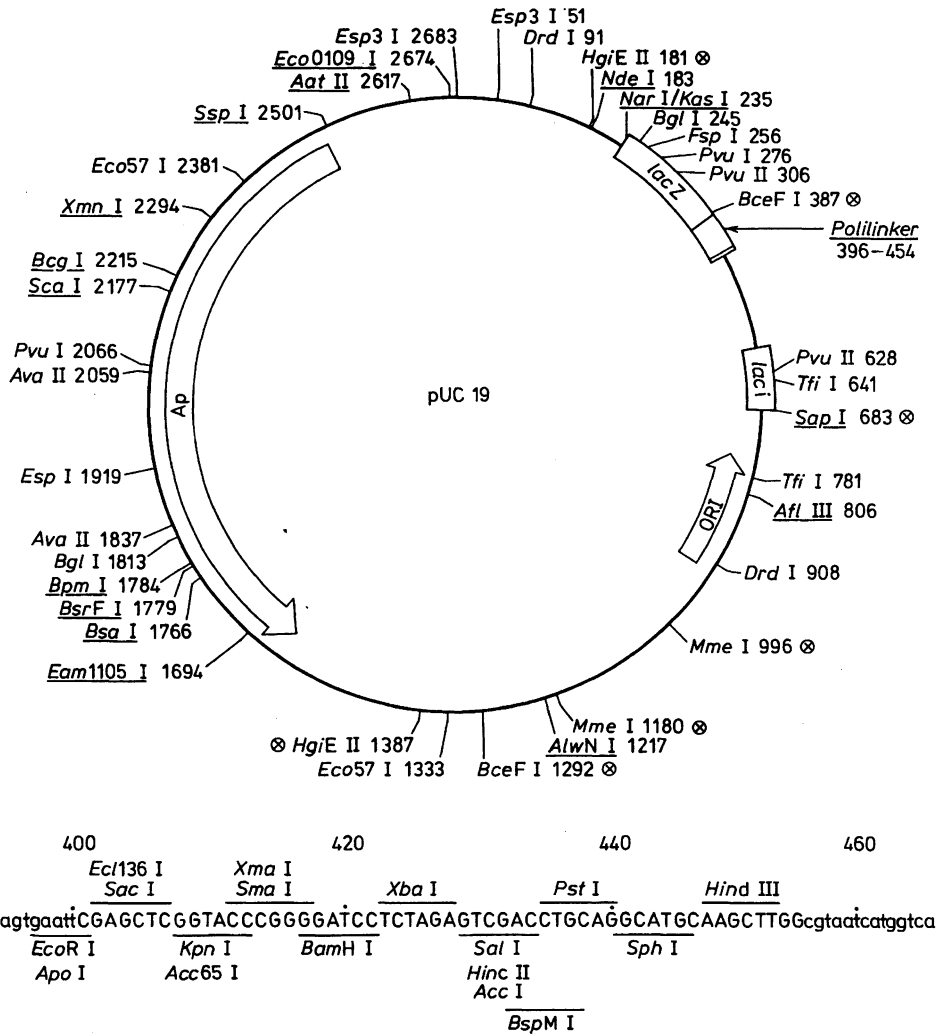
6.4.2. Wektory pochodne bakteriofagów

Najczęściej stosowanymi wektorami fagowymi w *E. coli* są pochodne faga λ . W stosunku do wektorów plazmidowych wektory fagowe mają pewne zalety. Można w nich łatwiej klonować większe fragmenty DNA, a wydajność infekcji cząstkami bakteriofagów jest też wyższa niż wydajność transformacji.

Genom bakteriofaga λ jest dwuniciową cząsteczką DNA o znanej sekwencji (48 502 par zasad) mieszczącą ok. 40 genów. W dojrzałych cząstkach wirusowych DNA ma formę liniowej cząsteczki zakończonej 12-nukleotydowymi jednoniciowymi i wzajemnie komplementarnymi „lepkimi końcami”, nazwanymi *cos*. Dzięki tym końcom DNA fagowy przybiera w komórce bakteryjnej formę kolistą, końce te są też konieczne do „zapakowania” DNA faga w białkową „główkę”. Czynność „pakowania” DNA do „główek” można wykonywać *in vitro*.

Cząsteczka DNA dzikiego typu faga λ nie nadaje się wprost do wykorzystania jako wektor, gdyż ma zbyt wiele miejsc restrykcyjnych dla poszczególnych restryktaz, często w obrębie genów niezbędnych w cyklu życiowym faga. Z DNA faga λ można jednak usunąć odcinek stanowiący ok. 30% genomu, pozostawiając jego „lewe” i „prawe” ramiona, zawierające wszystkie geny niezbędne w cyklu litycznym. Ponieważ do główki białkowej faga λ nie jest pakowany DNA o długości różniącej się o więcej niż 75–105% długości DNA faga dzikiego, można to zjawisko wykorzystać do selekcji zrekombinowanych cząsteczek DNA, gdyż tylko takie będą infekcyjne.

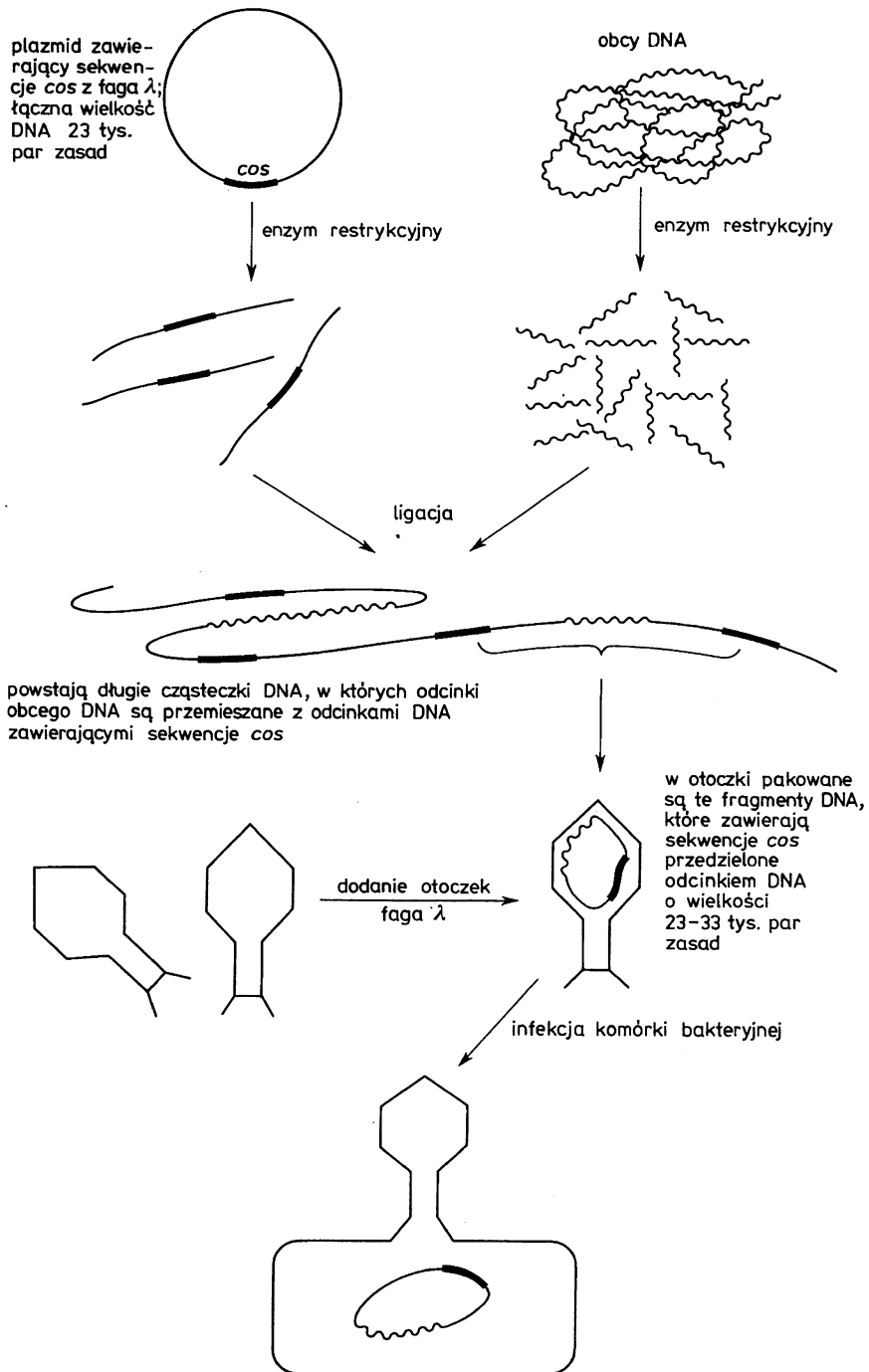
Rys. 6.4. Szczegółowa mapa restrykcyjna plazmidu *pBR322*. Na mapie nie naniesiono miejsc przecinanych przez enzymy rozpoznające czteronukleotydowe sekwencje. Podkreślono symbole enzymów przecinających cząsteczkę tylko w jednym miejscu. Liczby oznaczają numer kolejny nukleotydu liczony od pierwszej reszty T w unikatowej sekwencji *Eco* RI, obok którego dany enzym przecina DNA. U dołu: zastosowanie plazmidu *pBR322* do klonowania DNA i wyróżniania klonów zawierających zrekombinowane wektory



Rys. 6.5. Szczegółowa mapa restrykcyjna plazmidowego wektora *pUC19*. Podkreślono symbole enzymów przecinających plazmid tylko w jednym miejscu. U dołu przedstawiono sekwencję polilinkera z zaznaczonymi miejscami restrykcyjnymi. Pozostałe objaśnienia są w tekście

Podobnie jak w przypadku wektorów plazmidowych, do wektorów pochodnych faga λ wstawiono polilinkery, geny markerowe (np. fragment genu *lacZ*), silne promotory itp.

W laboratorium J. Messinga skonstruowano serię wektorów pochodnych faga *M13*. Jest to jeden z niewielkich, nitkowatych fagów *E. coli*, których genom stanowi jednoniciowa cząsteczka DNA. Po wnikięciu DNA do komórki bakteryjnej syntetyzowana jest druga nić, po czym następuje replikacja formy dwuniciowej aż do osiągnięcia ok. 200 kopii *M13*-DNA na komórkę. W tym momencie następuje zmiana mechanizmu replikacji i synteza tylko nici



Rys. 6.6. Klonowanie DNA za pomocą kosmidów

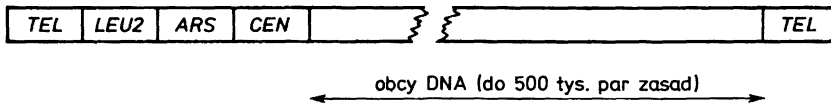
„+” DNA, pakowanej do otoczek białkowych. Ten szczególny cykl życiowy faga *M13* pozwala na wykorzystanie go jako wektora jednoniciowego DNA, a więc w sytuacjach, gdy celem pracy jest np. sekwencjonowanie DNA lub ukierunkowana mutageniza.

Szczególnym typem wektora są tzw. kosmidy, skonstruowane po raz pierwszy przez B. Hohn i J. Collinsa. Z sekwencjami plazmidu bakteryjnego (*ori*, gen markerowy) połączyli oni sekwencje *cos* z faga λ . Jeżeli łączy się fragmenty DNA z takim plazmidem, to uzyskuje się długie cząsteczki DNA, które dzięki obecności sekwencji *cos* mogą być *in vitro* zapakowane w otoczki białkowe faga λ . Kosmid infekuje komórki *E. coli* tak jak fag λ (rys. 6.6), natomiast jego DNA replikuje się tak jak DNA plazmidu. Jak powiedziano wyżej, do główek fagowych pakowane są cząsteczki DNA o określonej długości (ok. 50 tys. par zasad), stąd też kosmidy nadają się do klonowania dużych fragmentów DNA (10–40 tys. par zasad). Są stosowane w konstruowaniu banków genów, gdy zależy nam na tym, aby bank składał się ze stosunkowo niewielkiej liczby klonów.

6.4.3. Wektory drożdżowe

Drożdże, a zwłaszcza gatunek *S. cerevisiae*, są bardzo często wykorzystywane w pracach nad rekombinowaniem i klonowaniem DNA, spełniając wśród organizmów eukariotycznych podobną rolę jak *E. coli* wśród prokariotów. Ich właściwości genetyczne i fizjologiczne są świetnie poznane. Mają struktury komórkowe (jądro, mitochondria) typowe dla *Eukaryota*, geny mogą zawierać sekwencje intronowe. Proces obróbki mRNA jest zbliżony do obserwowanego u wyższych *Eukaryota*. Białka podlegają u drożdży modyfikacjom potranslacyjnym (mostki S—S, glikozylacja). Stąd też DNA klonuje się wtedy w drożdżach, kiedy celem doświadczenia jest uzyskanie ekspresji badanego genu w komórce eukariotycznej i odpowiednio zmodyfikowanych białkowych produktów. A. Hinnen opracował w roku 1978 metodę transformacji komórek drożdży. Obecnie istnieje wiele typów dogodnych wektorów drożdżowych. Można je klasyfikować jako wektory replikatywne (YR) lub episomalne (YE). Są to cząsteczki DNA z sekwencjami startu replikacji, pochodzącymi odpowiednio z chromosomów drożdży (tzw. sekwencje *ars*) lub z naturalnie występującego u drożdży plazmidu, zwanego 2μ . W obu przypadkach wektory wyposażono w geny markerowe służące do selekcji oraz w polilinkery. W drożdżowych wektorach ekspresyjnych, jako silnych indukowalnych promotorów, użyto promotory drożdżowych genów, np. *ADHI* (gen dehydrogenazy alkoholowej) lub *GALI* (gen kodujący galaktokinazę).

Wektory drożdżowe konstruuje się bardzo często jako wektory bifunkcjonalne (wahadłowe), tj. zdolne do replikacji zarówno w komórkach drożdży, jak i *E. coli*. Mają one odrębne sekwencje startu replikacji oraz geny markerowe dla każdego z tych organizmów. Pozwala to na przykład na klonowanie genów w *E. coli* i badanie ich ekspresji w drożdżach, co jest łatwiejsze niż wykonywanie wszystkich etapów doświadczenia w komórkach drożdży.



Rys. 6.7. Ogólny schemat struktury sztucznego chromosomu drożdżowego — YAC. Markerem w tym wektorze jest gen *LEU2*, kodujący jeden z enzymów szlaku biosyntezy leucyny. Wektor wyposażony jest w telomery (*TEL*), centromer (*CEN*) i sekwencję startu replikacji DNA (*ARS*)

W ostatnich latach konstruuje się wektory drożdży, zwane sztucznymi chromosomami — YAC (ang. yeast artificial chromosome). Służą one do klonowania bardzo dużych fragmentów DNA (do 5 milionów par zasad). Dzięki temu mogą być wykorzystane do ustalania map fizycznych dużych chromosomów wyższych *Eukaryota* (np. w projekcie sekwencjonowania i mapowania genomu człowieka). YAC składają się z tych samych elementów, które zapewniają replikację „naturalnych” chromosomów i ich segregację w czasie mitoz, a więc sekwencje *ars* oraz sekwencje centromerowe i telomerowe, niosą też geny markerowe i polilinkery (rys. 6.7).

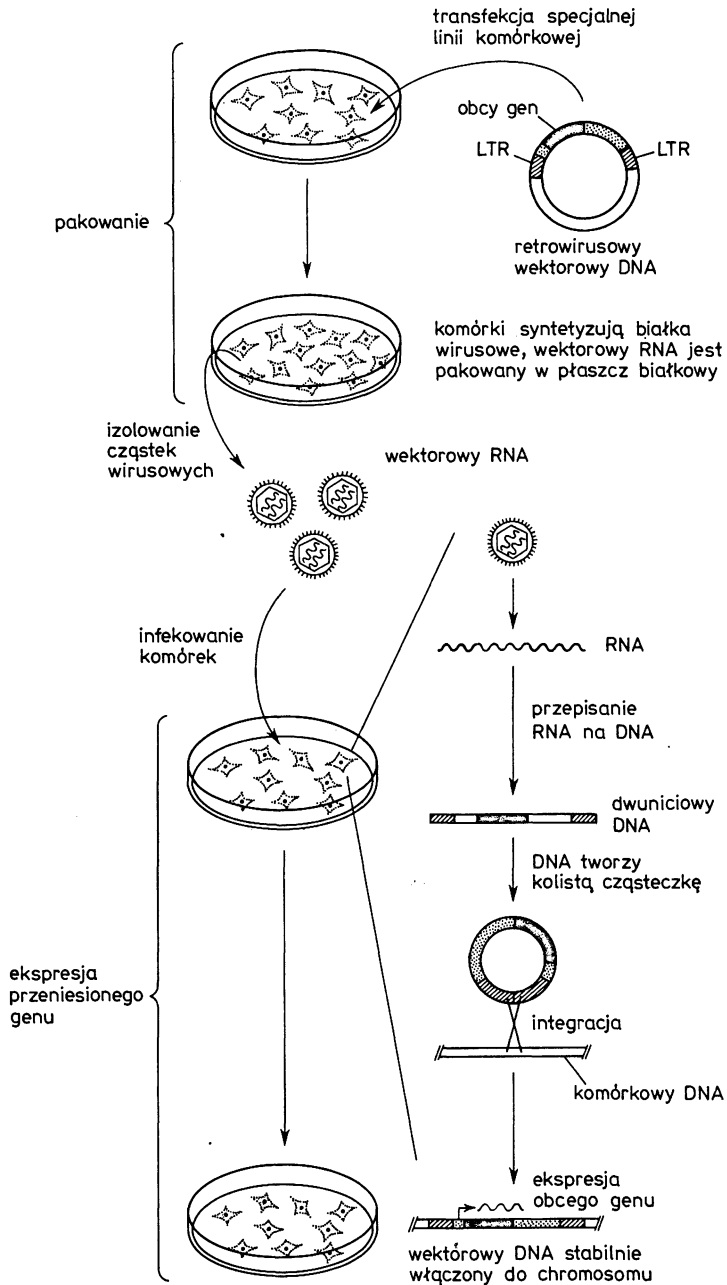
6.4.4. Wektory stosowane dla wyższych eukariontów

Opanowanie metod wprowadzania obcego DNA do komórek roślinnych lub zwierzęcych, a także transformowanie całych organizmów (transgenizacja), było niezwykle ważne ze względów zarówno poznawczych, jak i praktycznych. Manipulacje genetyczne dokonywane na wyższych organizmach są obecnie wykonywane z powodzeniem, aczkolwiek są one technicznie bardziej skomplikowane niż analogiczne doświadczenia z użyciem drożdży lub bakterii. W przypadku wyższych eukariontów nie dysponujemy tak znakomitymi wektorami, jak dla drożdży, tym niemniej wiele skonstruowanych wektorów pozwala na przynajmniej przejściową ekspresję zrekombinowanych z nimi genów.

W przypadku roślin wykorzystano pochodne tych nielicznych wirusów roślinnych, których materiałem genetycznym jest DNA. Przykładem takiego wirusa jest wirus mozaiki kalafiora. Jednak najczęściej stosowanym wektorem jest pochodzący z *Agrobacterium tumefaciens* plazmid *Ti*. Szczegółowo układ ten został omówiony w rozdziale 14.

Do komórek zwierzęcych DNA wprowadza się za pomocą wektorów będących pochodnymi wirusów *SV40*, papilioma, wirusa krowianki, bakulowirusów, adenowirusów i renowirusów. Zrekombinowany z genomami tych wirusów DNA może integrować z genomem komórki gospodarza, co daje początek nowej, transfekowanej linii komórkowej lub replikować poza chromosomem, co zwykle prowadzi po pewnym czasie do lizy komórki.

Spośród wirusów wymienionych wyżej, DNA *SV40* był najdawniej wykorzystywany jako wektor. Jest to kolista, dwuniciowa cząsteczka DNA (5243 par nukleotydów). W cząsteczce tej zakodowane są dwa tzw. białka wczesne



Rys. 6.8. Klonowanie genu w komórkach eukariotycznych w wektorze pochodnym retrowirusa. DNA retrowirusa z włączonym do niego obcym genem wprowadza się do specjalnej linii komórkowej, w której produkt jego transkrypcji jest pakowany w otoczki białkowe. Zwykle linia komórkowa używana do pakowania ma zintegrowanego prowirusa kodującego białka niezbędne do zapakowania RNA, ale niezdolnego do zapakowania własnego RNA. Częstkami wirusowymi otrzymanymi z komórek pakujących infekuje się komórki docelowe. Wprowadzony RNA jest w nich przepisywany na DNA i włączany do chromosomu, dając początek transformowanej linii komórkowej

(duży i mały antygen T) i trzy białka późne (VP1, VP2 i VP3), tworzące kapsydy wirusa. W komórkach permissywnych (dla *SV40* są nimi komórki nerki małpiej) zachodzi pełny cykl życiowy wirusa, obejmujący transkrypcję i translację wszystkich genów, replikację DNA i lizę komórki gospodarza. W komórkach niepermissywnych, takich jak komórki gryzoni lub człowieka, cykl ten zatrzymuje się po transkrypcji wczesnych genów i z pewną, dość niską częstością może dojść do integracji DNA wirusa z genomem gospodarza. W ten sposób powstaje stabilna transformowana linia komórek, mających wiele cech komórek nowotworowych.

W wektorach, będących pochodnymi DNA wirusa *SV40*, wykorzystano 300-nukleotydowy fragment DNA wirusa zawierający *ori*, promotory genów kodujących antygeny T i sekwencje regulacyjne, odpowiedzialne za aktywację transkrypcji z tych promotorów przez komórkowe czynniki transkrypcyjne. Uzyskano w ten sposób cytoplazmatyczne plazmidy pozwalające na otrzymanie tzw. przejściowej ekspresji (ang. transient expression) „obcych” genów w wielu rodzajach komórek ssaków.

Wśród wektorów eukariotycznych coraz większego znaczenia nabierają wektory wywodzące się z retrowirusów, których wielką zaletą jest bardzo wysoka wydajność transfekcji. Z tego względu wektory z tej grupy nadają się do zastosowania w terapii somatycznej wielu wrodzonych i nabytych schorzeń (p. rozdz. 14).

Genom retrowirusów stanowi jednoniciowa cząsteczka RNA, zakończona tzw. sekwencjami LTR (ang. long terminal repeats), która koduje białka otoczki (*gag* i *env*) oraz odwrotną transkryptazę (*pol*), enzym odpowiedzialny za „przepisanie” cząsteczki RNA na jedno-, a później na dwuniciową cząsteczkę DNA, integrującą z genomem gospodarza. Sekwencje LTR pełnią funkcje promotorów genów wirusa, są one ponadto niezbędne w integracji DNA wirusa z chromosomem gospodarza.

Ze względu na obawy, związane ze stosowaniem do klonowania DNA retrowirusów i ich pochodnych (większość retrowirusów ma właściwości onkogeniczne, retrowirusami są także *HTLVI*, *HTLVII* i *HIV*), doświadczenia z wektorami pochodzenia retrowirusowego prowadzi się w tzw. bezpiecznych układach złożonych. Wektor w postaci dwuniciowego DNA składa się z sekwencji *LTR* oraz tzw. sekwencji *psi*, warunkującej pakowanie kwasu nukleinowego do kapsydów. Drugim składnikiem układu jest linia komórek z prowirusem pozbawionym sekwencji *psi*, kodującym białka otoczki wirusa i odwrotną transkryptazę. W takiej komórce transkrypty zrekombinowanych z wektorem genów zostaną wraz z odwrotną transkryptazą zapakowane w otoczki i będą mogły „zakazić” nowe komórki, w których po przepisaniu na DNA zostaną włączone do genomu. (rys. 6.8).

6.5. Wprowadzanie DNA do komórek i całych organizmów

Zgodnie ze schematem typowego doświadczenia nad rekombinowaniem i klonowaniem DNA (p. podrozdz. 6.1), fragment DNA połączony z wektorem wprowadza się do komórki, w której ulegnie on powieleniu. Jest to klonowanie

DNA. Wprowadzanie DNA do komórek bakterii odbywa się metodą transformacji. Ten sam zabieg w odniesieniu do komórek eukariotycznych określa się terminem „transfekcja”, gdyż termin transformacja jest tu zarezerwowany dla zjawiska transformacji nowotworowej (p. rozdz. 12). W przypadku bakterii termin transfekcja jest ciągle często stosowany wtedy, gdy do komórek wprowadzamy DNA bakteriofagów.

W warunkach naturalnych transformacji ulegają tylko nieliczne gatunki bakterii: jest to proces aktywnego pobierania DNA, o charakterze enzymatycznym. Transformowanie *E. coli* polega na pasywnym przenikaniu DNA przez destabilizowane (najczęściej przez inkubację komórek w niskiej temperaturze w obecności CaCl_2) błony komórkowe. Komórki, do których może wniknąć obcy DNA określa się jako kompetentne; wydajność ich transformacji wynosi 10^8 komórek z 1 μg transformującego DNA.

Transfekcji komórek zwierzęcych dokonuje się różnymi metodami: wprowadzając DNA w obecności fosforanu wapnia lub dekstranu, a także wykorzystując zjawisko elektroporacji, polegające na odwracalnej destabilizacji błony komórkowej pod wpływem wysokonapięciowych pól elektrycznych z utworzeniem w niej porów. Jeszcze inna jest metoda bombardowania komórek kulkami ze złota lub wolframu opłaszczonych przez DNA i rozpędzonych w polu elektrycznym. Metoda mikroiniekcji DNA służy w szczególności do wprowadzania DNA do zarodków zwierząt, w celu otrzymania zwierząt transgenicznych (p. rozdz. 14).

W przypadku komórek roślinnych dodatkową przeszkodą, którą należy pokonać przy wprowadzaniu do nich DNA, jest ściana komórkowa. Stąd też transfekcje komórek roślinnych, dokonywane za pomocą jednej z wyżej wymienionych metod, należy poprzedzić etapem protoplastyzacji, polegającym na częściowym usunięciu ścian komórkowych. Po dokonaniu transfekcji protoplasty regenerują ścianę komórkową. Warto przy tym nadmienić, że w odpowiednich warunkach z pojedynczych protoplastów możemy uzyskać całe rośliny (p. rozdz. 14).

Podłączenie DNA do wektora nie jest warunkiem koniecznym do transfekcji kompetentnych komórek zwierzęcych czy też roślinnych. Komórki pobierają każdy DNA, zarówno w formie kolistej, jak i liniowej, mało- i wielkocząsteczkowy. Warunkiem uzyskania stabilnej modyfikacji biorcy jest włączenie rekombinowanego DNA do chromosomów gospodarza. Losy DNA zależą między innymi od gatunku, z którego pochodzą komórki biorcy. Na przykład w komórkach mysich DNA może ulec klasycznej homologicznej rekombinacji. W komórkach innych gatunków zazwyczaj dochodzi do rekombinacji między niehomologicznymi cząsteczkami DNA, a jej mechanizm nie jest jeszcze dobrze poznany. Wiadomo, że po wniknięciu do komórki cząsteczki DNA mogą połączyć się ze sobą w wielokopiove tandemy, tworząc wielkocząsteczkowy „transgenom”, który następnie rekombinuje z jednym z chromosomów gospodarza.

6.6. Identyfikacja zrekombinowanych genów

Jeżeli celem naszych doświadczeń jest wyodrębnienie pojedynczego, konkretnego genu z jakiegoś organizmu, to po utworzeniu banku genów tego organizmu i transformowaniu nim komórek bakterii lub drożdży należy zidentyfikować klon komórek, w którym ten gen się znajduje, po czym należy z komórek klonu wyodrębnić DNA i poszukiwany gen.

Stosunkowo najłatwiej zidentyfikować klon zawierający dany gen, jeżeli dzięki swojej ekspresji powoduje zmiany morfologiczne lub fizjologiczne transformowanych (lub transfekowanych) komórek. Na przykład, gdybyśmy klonowali gen kodujący β -galaktozydazę, to po transformowaniu komórek *E. coli* bankiem genów, wysielibyśmy je na podłoże zawierające X-gal, związek powodujący niebieskie zabarwienie kolonii wytwarzających ten enzym. Jeżeli do transformacji użyjemy komórek nie wytwarzających β -galaktozydazy (lac^-), to jedynie klony komórek, do których trafił wektor z poszukiwanym genem, wybarwią się na niebiesko.

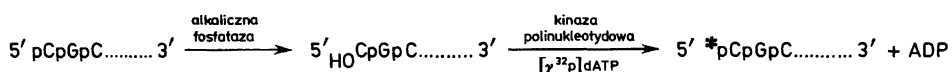
W niektórych przypadkach możemy tak selekcjonować komórki transformowane bankiem genów, aby przeżyły wyłącznie te, które zawierają poszukiwany przez nas gen. Na przykład, aby sklonować gen odpowiedzialny za syntezę jednego z enzymów szlaku biosyntezy argininy u drożdży, należy transformować szczep drożdży arg^- i wysiewać komórki po transformacji na pożywkę bez argininy. Na takim podłożu wyrosną jedynie kolonie komórek, w których pojawił się i uległ ekspresji gen kodujący odpowiedni enzym szlaku biosyntezy argininy.

Uzyskania ekspresji klonowanego genu możemy oczekiwać zawsze, gdy klonujemy geny w układzie homologicznym (tj. geny *S. cerevisiae* w komórkach *S. cerevisiae* czy też geny *E. coli* w komórkach *E. coli*). Czasami udaje się uzyskać ekspresję genów w układach heterologicznych, pierwsze geny drożdży sklonowano po ich ekspresji w komórkach *E. coli*. W komórkach prokariotycznych nie możemy jednak uzyskać ekspresji większości genów organizmów eukariotycznych ze względu na to, że mają introny. Oczywiście możliwa jest ekspresja cDNA, a więc genów syntetyzowanych na matrycy dojrzałego mRNA, bez intronów. W takim przypadku ekspresja genu będzie zależała jedynie od tego, czy w wektorze użytym do klonowania znajdują się odpowiednie prokariotyczne sekwencje regulujące prawidłową transkrypcję i translację klonowanego genu.

W przypadkach braku ekspresji genu w komórce biorcy możemy go wykryć stosując technikę hybrydyzacji kwasów nukleinowych. Wykorzystano w nich zjawisko powstawania stabilnych struktur dwuniciowych z cząsteczek o komplementarnych sekwencjach nukleotydów. Stabilne struktury dwuniciowe powstają już wtedy, gdy istnieją kilkunastonukleotydowe odcinki o komplemetarnym układzie par zasad. Kompleks taki charakteryzuje się specyficzną „temperaturą przejścia”, powyżej której ulega dysocjacji.

W doświadczeniach, w których przeprowadzamy hybrydyzację dwóch cząsteczek o komplementarnych sekwencjach nukleotydowych, jedna z nich

jest wyznakowana i spełnia rolę tzw. sondy molekularnej. Do znakowania kwasów nukleinowych najczęściej wykorzystuje się izotopy, wprowadzając ^{32}P lub ^{35}S w miejsce nieradioaktywnych atomów fosforu. Znakowania DNA można dokonać kinazą polinukleotydową, która przenosi grupę fosforanową z pozycji γ ATP na końcową grupę $5'\text{OH}$ nici DNA lub RNA (rys. 6.9).



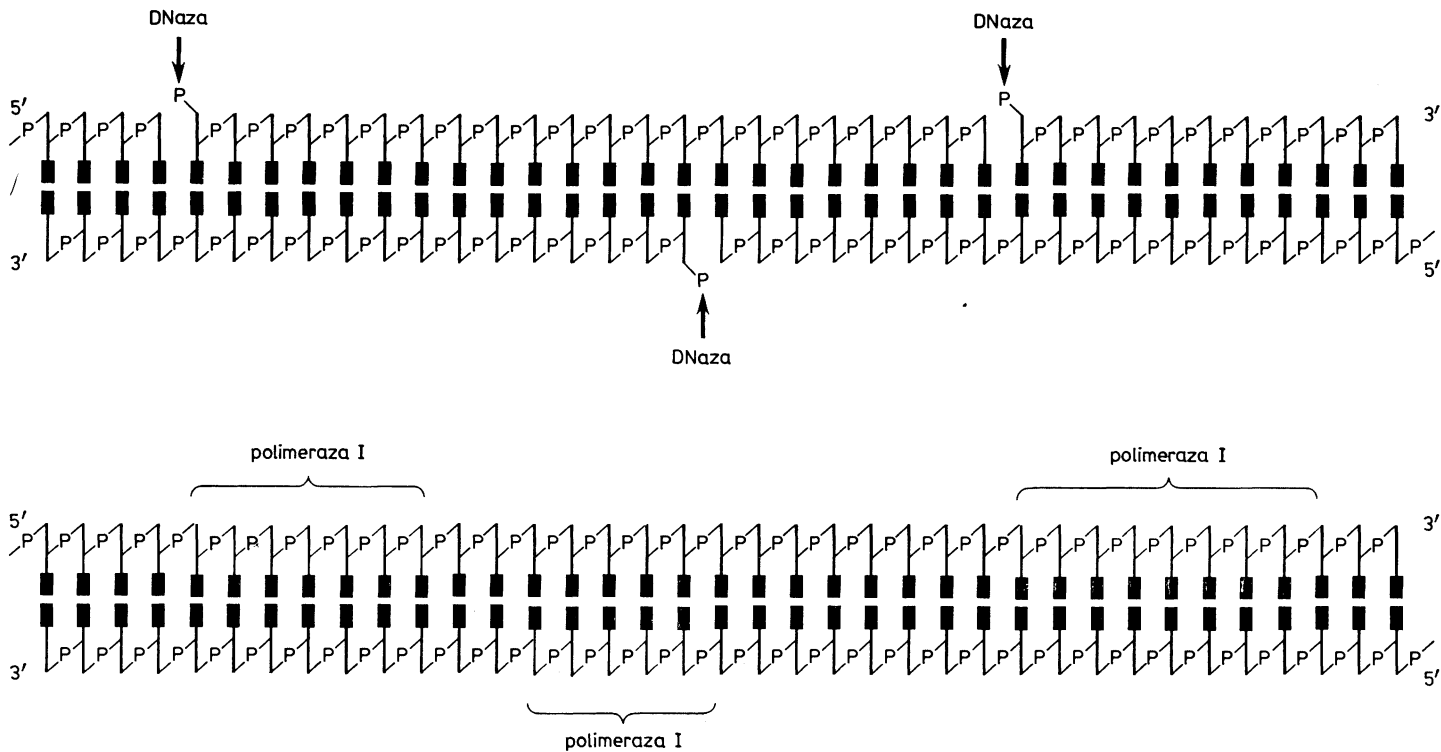
Rys. 6.9. Enzymatyczne znakowanie końca 5' DNA

Inna metoda polega na wytworzeniu za pomocą endonukleazy przerw w dwuniciowej cząsteczce DNA, a następnie wypełnieniu ich (ang. „nick translation”) trifosforanami nukleotydów podstawionymi w pozycji α ^{32}P lub ^{35}S (rys. 6.10). Reakcję tę prowadzi polimeraza I DNA lub tzw. fragment Klenowa polimerazy I. Jeżeli zastosuje się tę metodę, to można uzyskać cząsteczki DNA o aktywności specyficznej, wynoszącej 10^8 cpm/ μg . Sondy o jeszcze wyższej aktywności specyficznej (10^9 cpm/ μg) możemy otrzymywać w postaci jednoniciowych fragmentów cząsteczek DNA lub RNA syntetyzowanych *in vitro* z użyciem radioaktywnych nukleotydów.

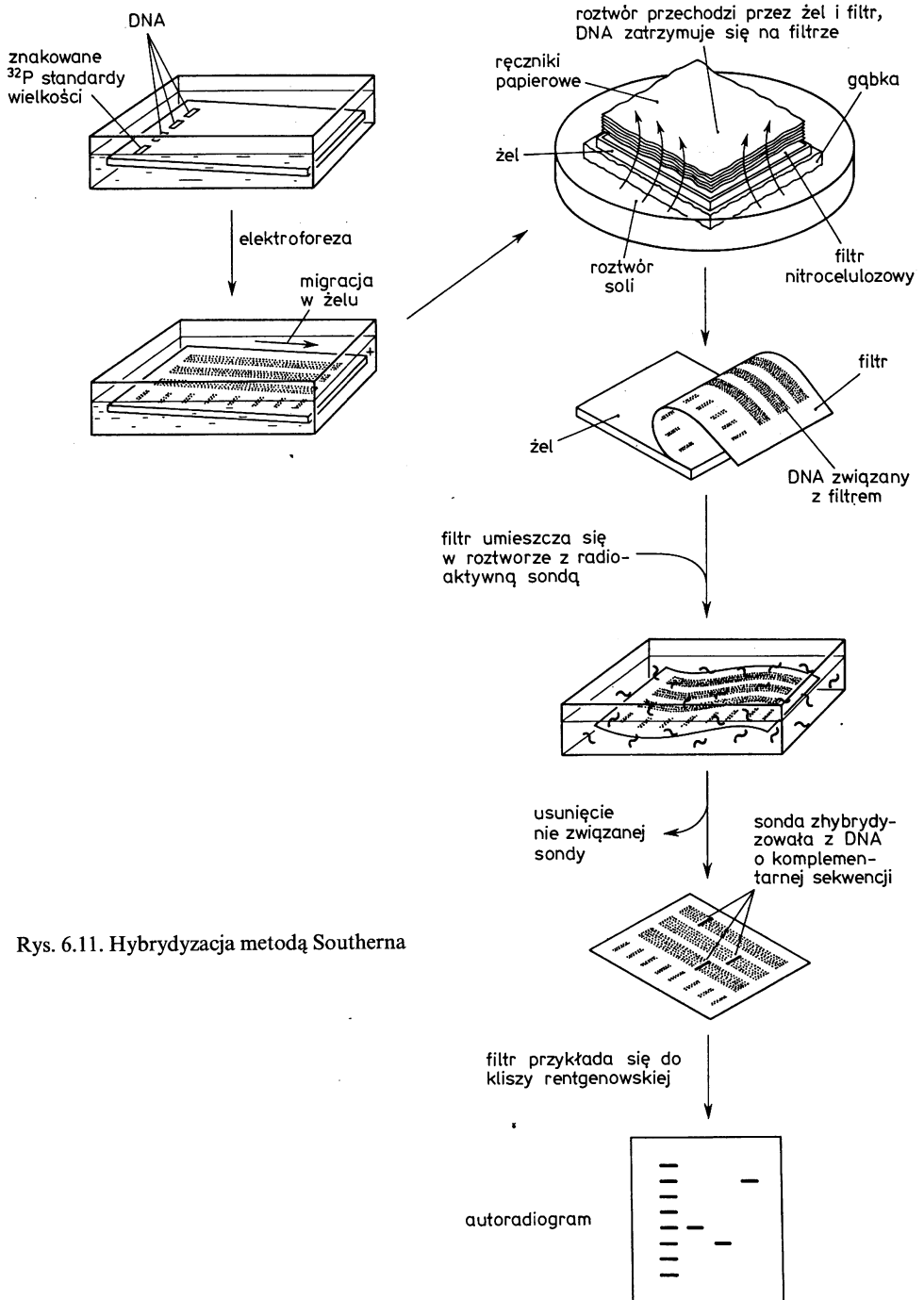
Sondy molekularne mogą być również znakowane nieradioaktywnie, na przykład przez dołączenie do cząsteczki DNA łatwo dającego się oznaczyć enzymu, biotyny lub związków fluoryzujących.

Technikę hybrydyzacji DNA w celu identyfikacji określonego fragmentu DNA zastosował po raz pierwszy E. Southern w roku 1975. Polegała ona na rozdzielaniu fragmentów restrykcyjnych DNA w żelu agarozowym i po ich denaturacji *in situ* — przeniesieniu na bibułę nitrocelulozową (rys. 6.11). Związany z bibułą DNA hybryduje z wyznakowanym, komplementarnym do niego fragmentem DNA. Po odpłukaniu nie związanego DNA i wysuszeniu bibuły wykonuje się jej autoradiografię, tzn. przykłada się do niej kliszę fotograficzną w celu zidentyfikowania pozycji zajmowanej przez radioaktywny fragment. Za pomocą takiej metody i stosując sondę molekularną o wysokiej aktywności specyficznej możemy wykrywać nawet bardzo małe ilości (poniżej 1 pg) DNA. Sonda nie musi być w pełni komplementarna do poszukiwanej sekwencji i mimo to hybryduje z nią, aczkolwiek z mniejszą wydajnością, a utworzony kompleks jest mniej trwały. Specyficzność hybrydyzacji zależy od kilku parametrów: sekwencji i składu nukleotydów, siły jonowej stosowanych buforów i temperatury. Jeżeli operujemy tymi parametrami, to możemy uzyskiwać hybrydyzację cząsteczek, których homologia nie przekracza 50% nukleotydów. Dzięki temu udaje się na przykład wykrywać homologiczne geny u odległych ewolucyjnie gatunków (p. rozdz. 13).

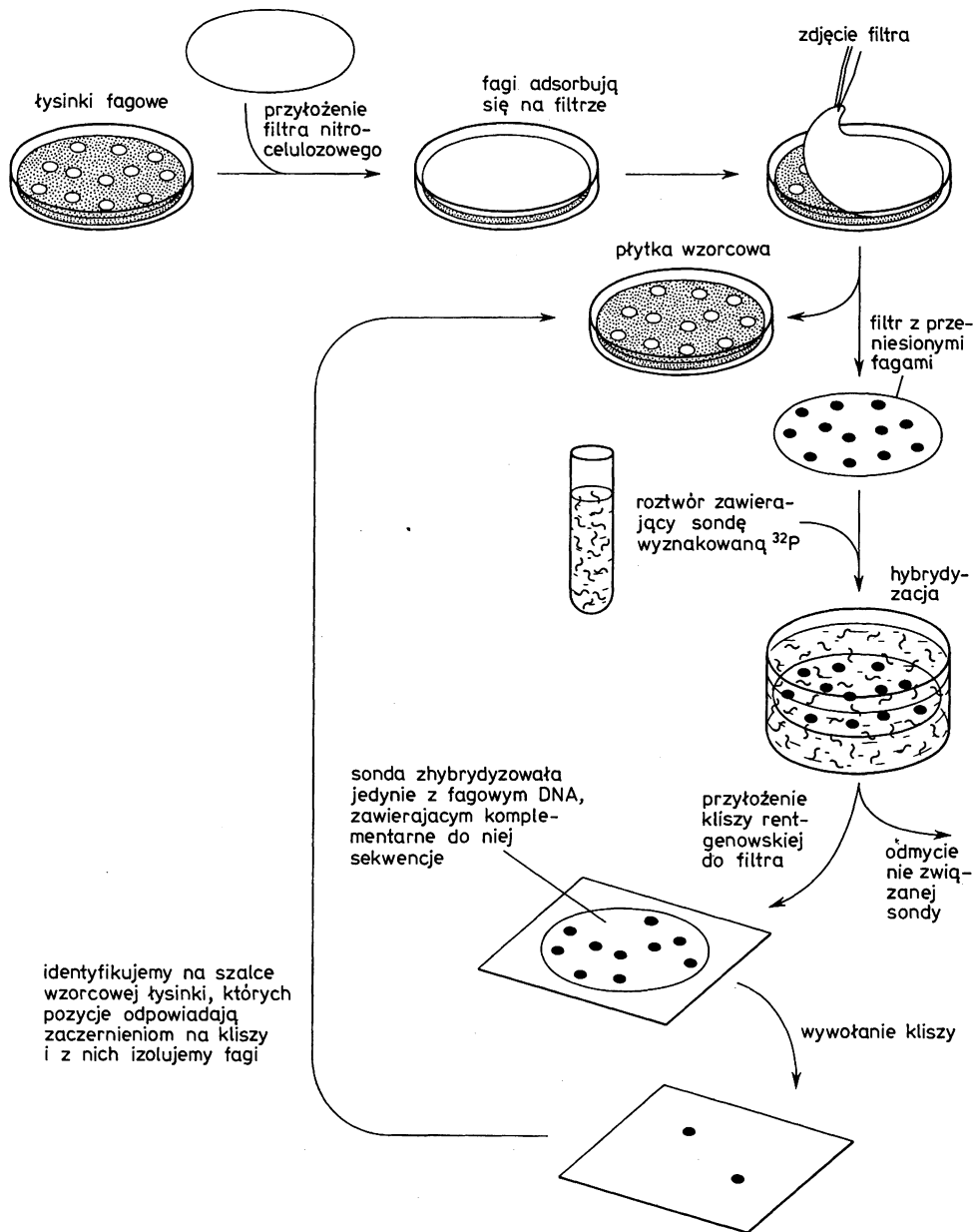
W zależności od potrzeb stosuje się różne warianty techniki hybrydyzacji kwasów nukleinowych. Terminem „northern” określono technikę, analogiczną do opisanego wyżej wariantu „southern”, polegającą na hybrydyzacji rozdzielonych w żelu cząsteczek RNA z sondą w postaci fragmentu DNA.



Rys. 6.10. Znakowanie DNA metodą „translacja w przerwie” (ang. nick translation). DNaza trzustkowa przecina cząsteczkę DNA pewną, ograniczoną liczbę razy. Polimeraza I DNA rozpoznaje uszkodzone miejsca, degraduje krótki odcinek nici w kierunku 5' → 3' i jednocześnie do końca 3' dodaje komplementarne do drugiej nici nukleotydy. Jeżeli w reakcji użyjemy radioaktywnych nukleotydów, to zostaną one użyte do wypełnienia luk i cała cząsteczka DNA stanie się radioaktywna



Rys. 6.11. Hybrydacja metodą Southerna



Rys. 6.12. Hybrydacja lysinkowa

Technika ta jest bardzo przydatna w analizowaniu mRNA i ocenianiu poziomu ekspresji poszczególnych genów.

W przypadku identyfikacji genów w bankach genowych stosuje się wariant, zwany hybrydacją kolonijną. Po transformacji komórek bakteryjnych bankiem plazmidowym wysiewa się je na płytce, a następnie replikuje uzyskane

kolonie na filtr bibułowy lub nylonowy. Po wykonaniu kilku prostych zabiegów przytwierdzających bakterie do bibuły, powodujących lizę bakterii i denaturację DNA *in situ*, filtr z koloniami poddaje się hybrydyzacji, a następnie autoradiografii. Analogiczną techniką w stosunku do opisanej wyżej jest hybrydyzacja łyśinkowa, w której na bibułę przenosi się bakterie transfekowane bankiem fagowym wraz z łyśinkami spowodowanymi przez bakteriofagi (rys. 6.12).

Sondy molekularne stosowane w hybrydyzacji uzyskuje się w rozmaity sposób. Jeżeli znana jest sekwencja aminokwasowa białka kodowanego przez poszukiwany przez nas gen, to można chemicznie zsyntetyzować oligonukleotydy o sekwencji komplementarnej do odcinka DNA kodującego fragment białka. Ponieważ kod genetyczny jest zdegenerowany, musimy w praktyce syntetyzować „rodzinę” oligonukleotydów, z których tylko pewna część będzie idealnie komplementarna do poszukiwanej sekwencji. O ile jest to możliwe, wybiera się fragment cząsteczki białka, składający się z aminokwasów kodowanych przez małą liczbę kodonów.

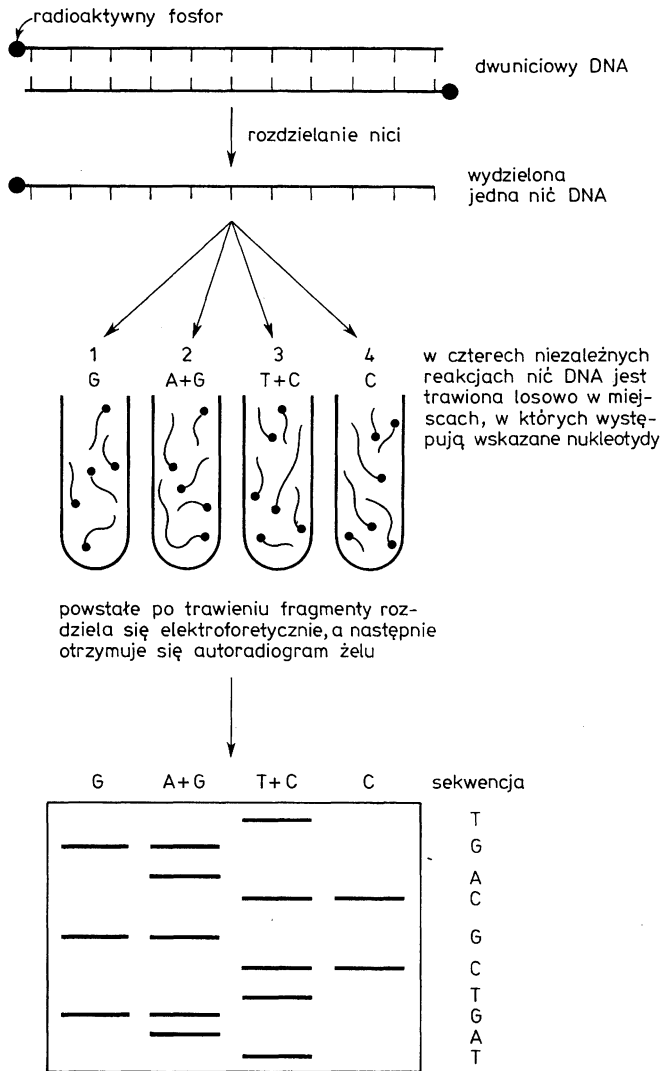
Sondami molekularnymi mogą być również cząsteczki RNA. Stosuje się je w sytuacjach, gdy dana klasa RNA stanowi na tyle dużą część RNA komórkowego, że można ją wyodrębnić i oczyścić. Przykładami takich RNA, które posłużyły do zidentyfikowania kodujących je genów mogą być preparaty rybosomalnego RNA, czy też np. mRNA β -globiny izolowany z retikulocytów.

Technikę hybrydyzacji stosuje się też wtedy, gdy zamierzamy wyodrębnić gen z jakiegoś organizmu i dysponujemy już homologicznym genem pochodzącym z innego, możliwie blisko spokrewnionego gatunku. Jeżeli mamy sklonowane geny myszy, to możemy na ogół z powodzeniem użyć ich jako sond molekularnych do zidentyfikowania analogicznych genów człowieka. W przypadku genów silnie konserwowanych w trakcie ewolucji, można jako sond użyć genów z gatunków nawet tak odległych, jak człowiek i drożdże.

6.7. Charakterystyka sklonowanych genów — sekwencjonowanie DNA

Sklonowanie danego genu nie jest celem samym w sobie; stanowi punkt wyjścia do badania jego budowy, zasad funkcjonowania, sposobu regulacji ekspresji itd. Bardzo dużo informacji o genie niesie jego sekwencja nukleotydowa.

Obecnie powszechnie stosowane są dwie metody sekwencjonowania DNA. Pierwsza, opracowana przez Maxama i Gilberta, polega na degradacji wyznakowanych na końcu 5' cząsteczek DNA odczynnikami atakującymi specyficznie wiązania fosfodiesterowe za nukleotydem odpowiadającym określonej zasadzie azotowej. Warunki reakcji są tak ustalone, że w poszczególnych cząsteczkach zostaje przecięte tylko jedno lub dwa wiązania, przez co otrzymuje się zbiór fragmentów DNA o różnej długości. Fragmenty uzyskane z czterech prowadzonych równolegle reakcji chemicznych rozdzielane są w żelach ak-



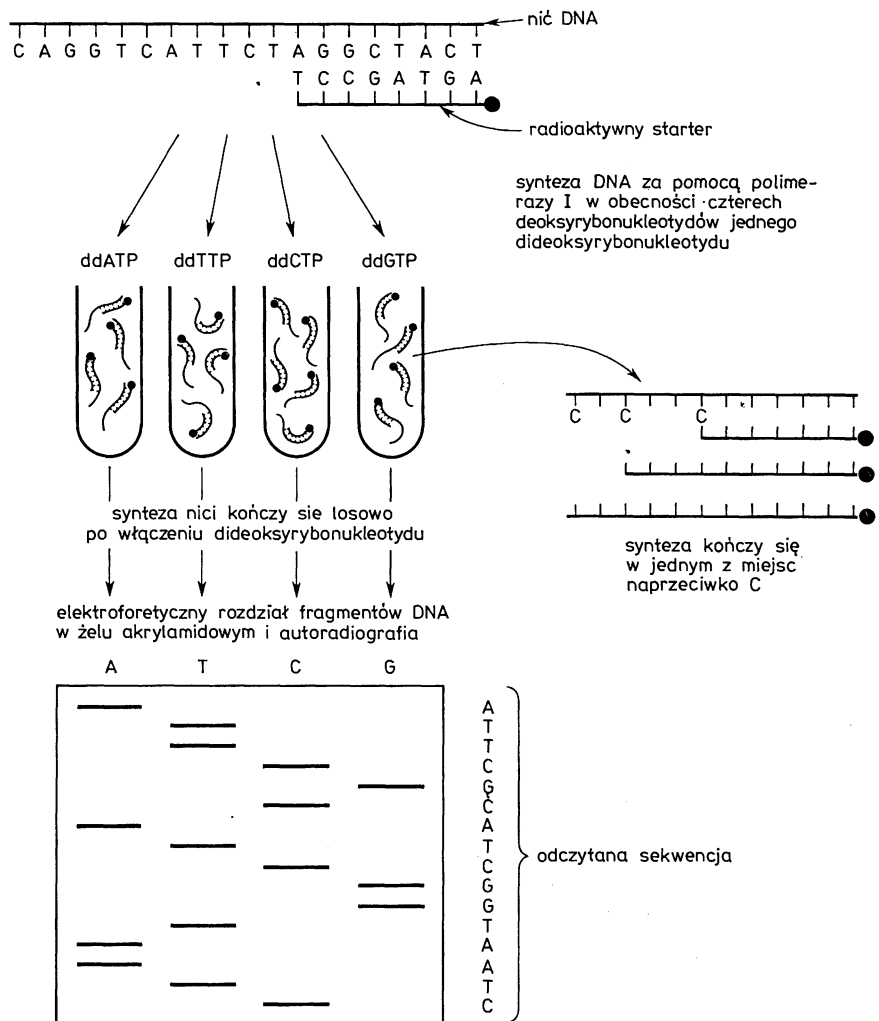
Rys. 6.13. Sekwencjonowanie DNA metodą Maxama i Gilberta

rylamidowych i poddawane autoradiografii. Na autoradiogramie widoczne są tylko prążki, odpowiadające fragmentom zaczynającym się od wyznakowanego końca 5' ułożone w postaci „drabinki”, której każdy kolejny „szczebel” odpowiada fragmentom różniącym się od otaczających go o jeden nukleotyd (rys. 6.13).

Drugą, częściej obecnie stosowaną metodę sekwencjonowania DNA, opracował zespół F. Sangera. Metoda ta nie polega na analizowaniu produktów chemicznej degradacji cząsteczek DNA, lecz produktów syntezy *in vitro* DNA

na jednoniciowej matrycy, począwszy od przygotowanego oligonukleotydowego startera, komplementarnego do końca 3' matrycy. W skład czterech mieszanin reakcyjnych wchodzi cztery różne dideoksytrifosforany nukleotydów, powodujące terminację syntezy w pozycji, w której zostaną włączone do rosnącej nici. Dodaje się je w takim stężeniu, aby były włączane do syntetyzowanej nici stosunkowo rzadko, tak aby w każdej mieszaninie reakcyjnej powstawał pełen zestaw fragmentów DNA o różnej długości, kończących się odpowiednim nukleotydem (rys. 6.14).

Zarówno metoda Maxama i Gilberta, jak i metoda Sangera pozwalają na odczytanie sekwencji 400–700 nukleotydów w jednym doświadczeniu. Nie trzeba dodawać, że sekwencjonowanie DNA jest możliwe jedynie wtedy, gdy



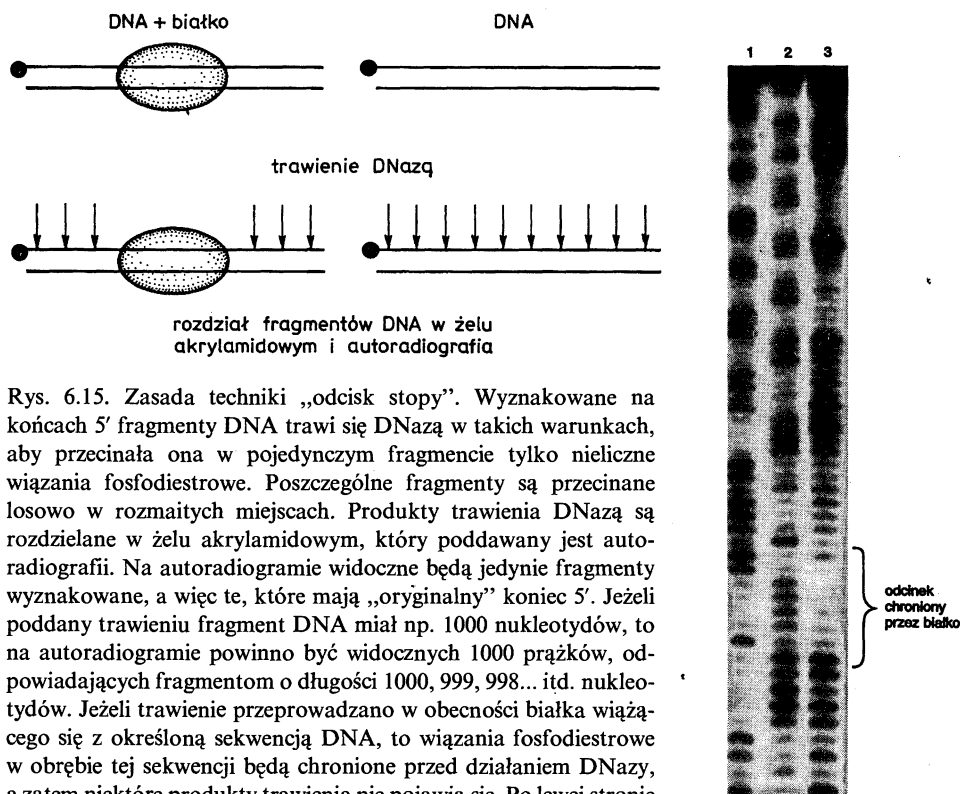
Rys. 6.14. Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera

disponujemy wyodrębnionymi fragmentami DNA, a więc po ich uprzednim sklonowaniu i ustaleniu mapy restrykcyjnej.

Techniki sekwencjonowania DNA zostały w ostatnich latach na tyle udoskonalone i w części zautomatyzowane, że stało się możliwe podjęcie projektów sekwencjonowania całych genomów. Do ustalenia pełnej sekwencji wybrano genomy takich organizmów modelowych, jak *E. coli* (ten projekt w połowie roku 1994 był już niemal zakończony), drożdże *S. cerevisiae*, nicien — *Cenorhabditis elegans*, roślina — *Arabidopsis thaliana*, mysz oraz człowiek. Ten ostatni projekt jest najbardziej ambitny (i kosztowny) ze względu na wielkość ludzkiego genomu, będzie on jednak ukończony zapewne jeszcze w tym wieku.

6.8. Wykrywanie sekwencji DNA wiążących białka

Poznanie sekwencji nukleotydowej odcinka DNA pozwala na stwierdzenie czy mieści się w nim tzw. otwarta ramka odczytu, czyli sekwencja potencjalnie kodująca jakiegoś białka. Możemy też ustalić, czy w badanym fragmencie DNA



Rys. 6.15. Zasada techniki „odcisk stopy”. Wyznakowane na końcach 5' fragmenty DNA trawi się DNazą w takich warunkach, aby przecinała ona w pojedynczym fragmencie tylko nieliczne wiązania fosfodiesterowe. Poszczególne fragmenty są przecinane losowo w rozmaitych miejscach. Produkty trawienia DNazą są rozdzielane w żelu akrylamidowym, który poddawany jest autoradiografii. Na autoradiogramie widoczne będą jedynie fragmenty wyznakowane, a więc te, które mają „oryginalny” koniec 5'. Jeżeli poddany trawieniu fragment DNA miał np. 1000 nukleotydów, to na autoradiogramie powinno być widocznych 1000 prążków, odpowiadających fragmentom o długości 1000, 999, 998... itd. nukleotydów. Jeżeli trawienie przeprowadzano w obecności białka wiążącego się z określoną sekwencją DNA, to wiązania fosfodiesterowe w obrębie tej sekwencji będą chronione przed działaniem DNazy, a zatem niektóre produkty trawienia nie pojawią się. Po lewej stronie — schemat doświadczenia. Po prawej stronie — autoradiogram żelu. Ścieżki 1 i 2 przedstawiają produkty reakcji sekwencjonowania DNA, odpowiednio dla nukleotydów A i G (ścieżka 1) oraz C i T (ścieżka 2). W obu ścieżkach łącznie znajdują się więc wszystkie możliwe produkty trawienia wyjściowego fragmentu. Ścieżka 3 przedstawia wynik trawienia tego samego fragmentu DNA, w obecności białka wiążącego się ze znajdującą się w tym fragmencie sekwencją nukleotydową

znajdują się pewne charakterystyczne sekwencje, np. sekwencje stykowe intron–egzon, sekwencje wiążące znane białka regulacyjne, sekwencje terminacyjne itp.

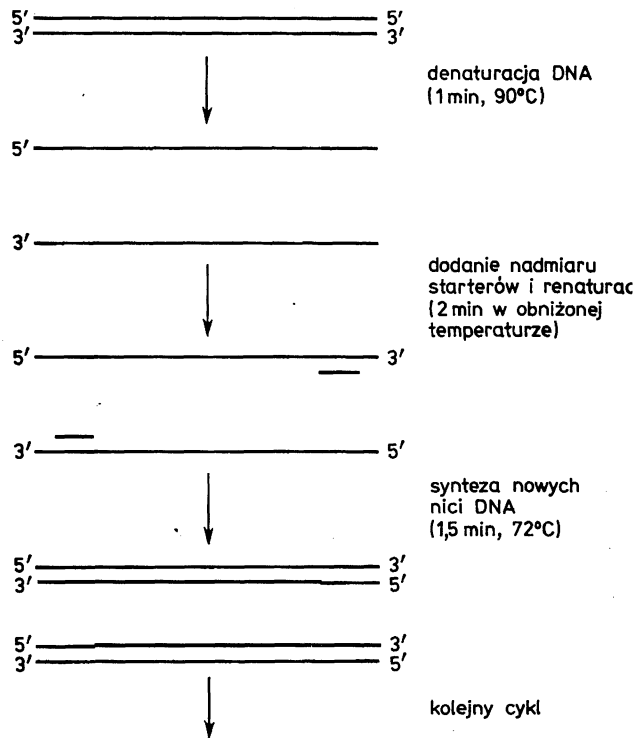
W ostatnich latach szczególnie istotne stało się identyfikowanie sekwencji odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów. Wiadomo (p. rozdz. 7 i 8), że aktywacja bądź hamowanie transkrypcji odbywa się za pośrednictwem białek wiążących się z DNA i oddziaływających z polimerazą RNA lub innymi białkami kompleksu transkrypcyjnego.

Opracowano wiele metod pozwalających na wykrywanie sekwencji wiążących białka. Po to, aby przekonać się czy w danym fragmencie DNA znajduje się taka sekwencja, wykonuje się tzw. test spowolnienia migracji w żelu (ang. gel shift lub gel retardation assay), polegający na poddawaniu elektroforezie fragmentów DNA w obecności i przy braku białka. Jeżeli dany fragment DNA wędruje wolniej w obecności białka, to można założyć, że jest to spowodowane związaniem się białka z tym właśnie fragmentem DNA.

Inna metoda, zwana techniką odcisku stopy (ang. footprint), pozwala na ustalenie nie tylko faktu wiązania białka z danym fragmentem DNA, lecz również określenie sekwencji, z którą to białko się łączy. Metoda polega na sekwencjonowaniu DNA w obecności białka wiążącego się z nim. Białko chroni przed degradacją DNA dokładnie w obszarze sekwencji wiążących, co łatwo zaobserwować na autoradiogramie żelu sekwencyjnego (rys. 6.15).

6.9. Powielanie genów bez ich klonowania: technika PCR

W połowie lat 80. opracowano technikę, która pozwala na powielenie dowolnej sekwencji DNA o długości od kilkuset do kilku tysięcy nukleotydów. Technika ta jest określana skrótem PCR (ang. polymerase chain reaction) — reakcja łańcuchowa polimerazy i polega na przeprowadzeniu wielu cykli syntezy DNA z wykorzystaniem starterów flankujących określony odcinek DNA (rys. 6.16). Warunkiem dokonania takiej syntezy jest znajomość sekwencji otaczającej powielany fragment, tak aby można było syntetyzować komplementarne startery o długości ok. 20 nukleotydów. Każdy cykl reakcji składa się z trzech etapów: termicznej denaturacji powielanego DNA (temperatura ok. 90° C), asocjacji starterów z matrycą w temperaturze obniżonej do 40–60°C i polimeryzacji DNA w temperaturze 72°C. Wszystkie cykle reakcji zachodzą w jednej probówce eppendorfa, do której oprócz matrycy i trifosforanów nukleotydów, dodajemy nadmiar starterów (po to, aby zapobiec renaturacji matrycowego DNA) oraz termostabilną polimerazę DNA wydzieloną z termofilnych bakterii. W pierwszym cyklu reakcji syntetyzowane są odcinki DNA, o różnej długości. Stopniowo w mieszaninie zaczynają przeważać fragmenty powielanego DNA, ograniczone starterami i w praktyce końcowy produkt reakcji jest niemal jednorodny. Liczba syntetyzowanych frag-



Rys. 6.16. Schemat reakcji PCR. W trakcie wielokrotnie powtarzanych cykli reakcji obecna jest stale termostabilna polimeraza DNA oraz startery w tak dużym nadmiarze molowym, że przy reasocjacji pojedynczych nici one, a nie syntetyzowane łańcuchy, będą łączyły się z komplementarnymi sekwencjami

mentów narasta wykładniczo jak 2^n , gdzie n oznacza liczbę cykli. Po 30–40 cyklach uzyskuje się powielenie fragmentu DNA kilka milionów razy.

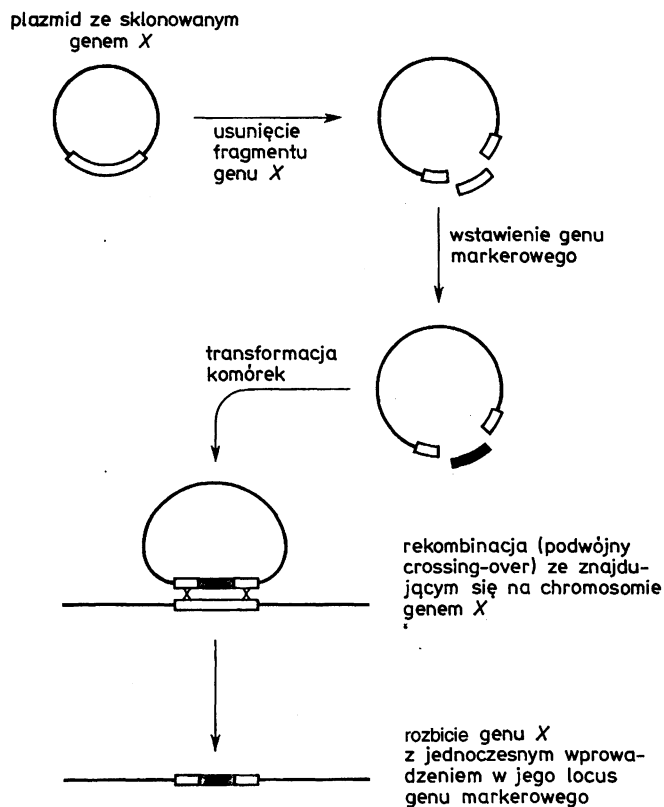
Metoda PCR znalazła ogromnie dużo zastosowań, w tym tak spektakularne, jak namnażanie fragmentów DNA z mumii egipskich czy też ze szczątków wymarłych organizmów zachowanych w lodowcach, czy też zatopionych w bursztynie. Jest też powszechnie stosowana w diagnostyce chorób dziedzicznych, w sądownictwie przy ustalaniu ojcostwa, w kryminalistyce do ustalania pochodzenia śladów krwi, włosów itp. We wszystkich tych przypadkach posługujemy się techniką PCR do powielenia określonego fragmentu DNA w sytuacjach, gdy dysponujemy znikomymi ilościami DNA matrycowego. Po powieleniu DNA jest poddawany analizie restrykcyjnej, hybrydyzacyjnej i jest sekwencjonowany.

6.10. Ukierunkowana mutageneza

Aby poznać funkcję spełnianą przez dany gen w komórce lub całym organizmie, a także funkcje poszczególnych sekwencji nukleotydowych w regulacji działania samych genów, opracowano techniki umożliwiające wprowadza-

nie precyzyjnych zmian w określonych pozycjach nici DNA. Technik tych, określanych wspólną nazwą „ukierunkowana mutageniza”, jest znanych bardzo wiele, ograniczymy się tylko do podania kilku charakterystycznych przykładów.

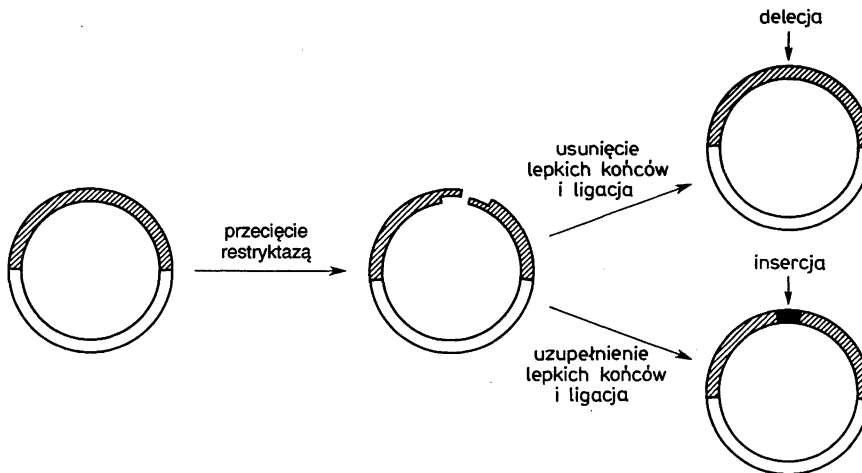
W pracach nad rekombinowaniem i klonowaniem DNA wyodrębnia się czasem geny, których funkcja nie jest znana. Ich rolę można poznać, badając efekt zastąpienia w organizmie genu dzikiego przez gen zmutowany. Procedurę mutowania konkretnych genów stosuje się z powodzeniem w mikroorganizmach, a ostatnio również i w organizmach wyższych. Polega ona na transformowaniu komórek przez DNA badanego genu, po wprowadzeniu do niego fragmentu obcej sekwencji. Jeżeli gen ten zostanie włączony do chromosomu gospodarza w wyniku klasycznej rekombinacji (konieczne jest zajście podwójnego crossing-over), to dziki gen zostanie zastąpiony przez gen zmutowany (rys. 6.17). Procedurę tę określa się nazwą „rozbite genu” (ang. gene disruption). Często jako obcy DNA wstawiany w środek sekwencji genu stosuje się inny gen, będący jednocześnie markerem selekcyjnym, pozwalającym na wyróżnienie komórek, które pobrały DNA. W przypadku organizmów wielokomórkowych



Rys. 6.17. Schemat procedury wyłączenia aktywności określonego genu. Doświadczenia tego typu określa się terminem rozbite genu lub knock-out genowy

kowych dokonuje się tego typu operacji na komórkach linii płciowych lub wczesnych zarodków, po to, aby otrzymać cały, zmutowany organizm. W ten sposób skonstruowano między innymi szczepy transgeniczných myszy, u których zmutowano odpowiedniki tych genów, których mutacje u człowieka są powodem chorób dziedzicznych. Dzięki temu otrzymano znakomite modele do testowania nowych metod leczenia tych schorzeń (p. rozdz. 14).

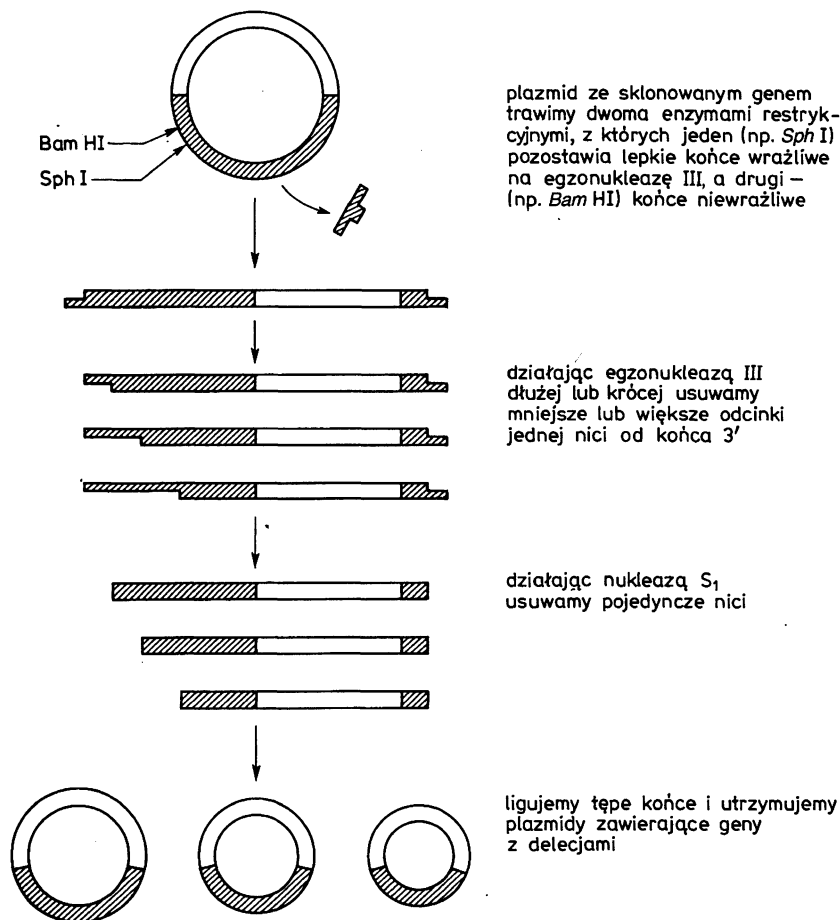
Sekwencje nukleotydowe odpowiedzialne za regulację ekspresji są położone z reguły powyżej miejsca startu transkrypcji, często w znacznej od niego odległości. Po to, aby ustalić ich rodzaj i dokładne miejsce położenia konieczne jest przeprowadzenie ich szczegółowej analizy funkcjonalnej. Polega ona na wytwarzaniu delecji odcinków DNA, poprzedzających miejsce startu transkrypcji i na wprowadzaniu punktowych zmian w sekwencjach, które podejrzewamy o spełnianie istotnej roli w regulacji działania genu. Wszelkie te manipulacje wykonuje się oczywiście na sklonowanym wraz z otaczającymi sekwencjami genie, a ich efekt sprawdza się po wprowadzeniu przekształconych genów do komórki.



Rys. 6.18. Wytwarzanie krótkich delecji i insercji w sklonowanych genach

Delecje uzyskuje się działając na DNA endo- lub egzonukleazami. Niewielkie delecje można uzyskać, stosując enzymy restrykcyjne wytwarzające lepkie końce i egzonukleazę atakującą pojedyncze nici DNA. Wystarczy przeciąć DNA, strawić egzonukleazą i zligować nowo powstałe, tępe końce (rys. 6.18). W podobny sposób możemy wprowadzać do DNA krótkie addycje, wypełniając lepkie końce za pomocą polimerazy DNA i ligując takie fragmenty.

Do wytwarzania dłuższych delecji służą egzonukleazy, takie jak BAL 31 (5', 3' egzonukleaza) lub egzonukleaza III z *E. coli* (3' egzonukleaza) w połączeniu z nukleazą S1 (endonukleaza jednoniciowego DNA). Znajdujący się na plazmidzie gen przecinamy enzymem restrykcyjnym w pozycji, od której

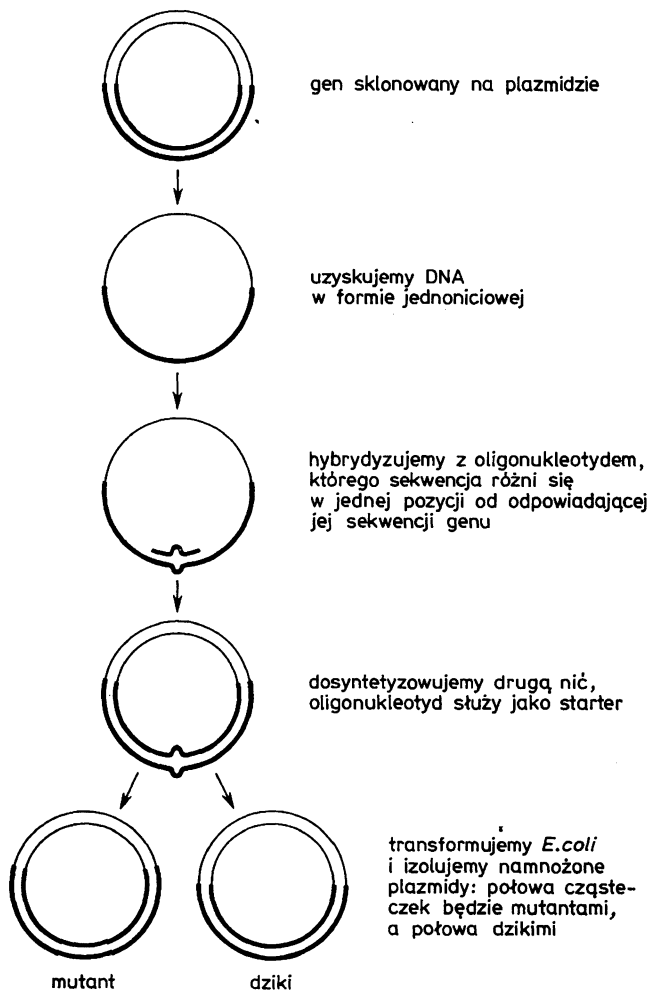


Rys. 6.19. Wytwarzanie serii delecji genowych. Procedura często stosowana do analizy sekwencji regulacyjnych i promotorów

zamierzamy generować serię delecji i trawimy egzonukleazą, przerywając reakcję po różnym czasie. Następnie inną nukleazą usuwamy pozostającą pojedynczą nić, a nadtrawiony gen ligujemy tak, jak pokazano na rysunku 6.19. Egzonukleaza III nie trawi 3'-końców nici „cofniętych” w stosunku do końców 5'. Można więc tak dobrać enzymy restrykcyjne, aby w pobliżu miejsca, od którego generujemy delecje znajdowały się dwa miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne: jedno (bliżej), którego przecięcie pozostawi tępy koniec, a drugie (nieco dalej), którego przecięcie pozostawi koniec niewrażliwy na działanie egzonukleazy. Po przecięciu DNA oboma enzymami powstanie cząsteczka liniowa, w której będziemy mogli wytwarzać delecje tylko od jednej strony i po zakończeniu reakcji odtworzyć kolistą cząsteczkę wektora przez dodanie ligazy DNA. Jeżeli dysponujemy seriami delecji obejmujących różne obszary promotora, to możemy określić, gdzie zlokalizowane są sekwencje odpowiedzialne za regulację działania genu.

Opracowano wiele technik, służących do usuwania lub zamieniania pojedynczych oligonukleotydów (sterowana mutageneza punktowa). Jedną z najczęściej stosowanych technik polega na syntetyzowaniu oligonukleotydu, różniącego się np. jednym nukleotydem od sekwencji typu dzikiego, hybrydyzacji tego oligonukleotydu ze sklonowanym na jednoniciowym wektorze *M13* dzikim genem i enzymatycznym dosyntetyzowaniu *in vitro* drugiej nici, przy czym oligonukleotyd spełnia rolę startera. Po zakończeniu syntezy powstanie cząsteczka, która w czasie replikacji (*in vivo*) da potomne dwuniciowe cząsteczki typu dzikiego i mutantu w proporcji 1 : 1 (rys. 6.20).

Opisana metoda pozwala na dodanie, ujęcie lub zamianę dowolnego nukleotydu w każdej cząsteczce DNA o znanej sekwencji. Możemy dzięki niej

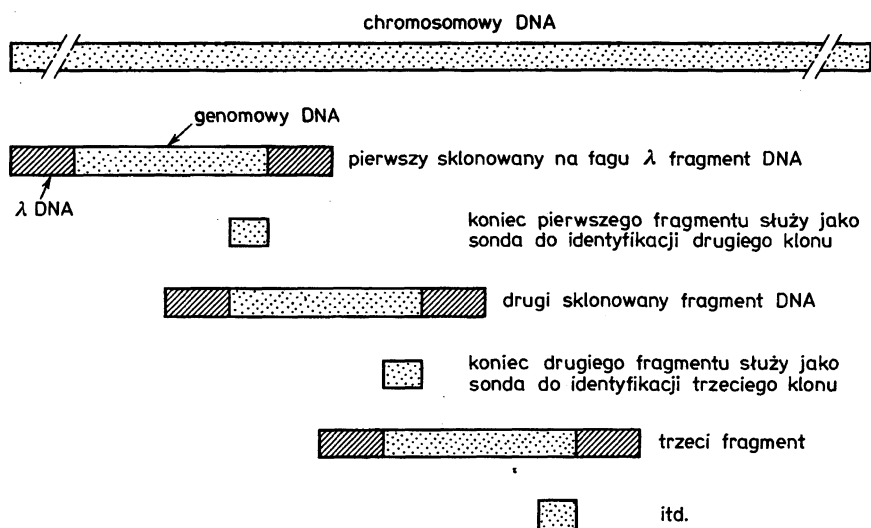


Rys. 6.20. Wprowadzenie określonej zmiany sekwencji nukleotydowej (mutacji punktowej) w sklonowanym genie z użyciem syntetycznego oligonukleotydu jako mutatora i startera polimeryzacji

wprowadzać zmiany w sekwencji kodującej genu, w wyniku czego wytwarzane przez ten gen białko będzie miało zamienione zgodnie z naszą wolą wybrane aminokwasy. Technika ta znalazła wiele zastosowań w biotechnologii.

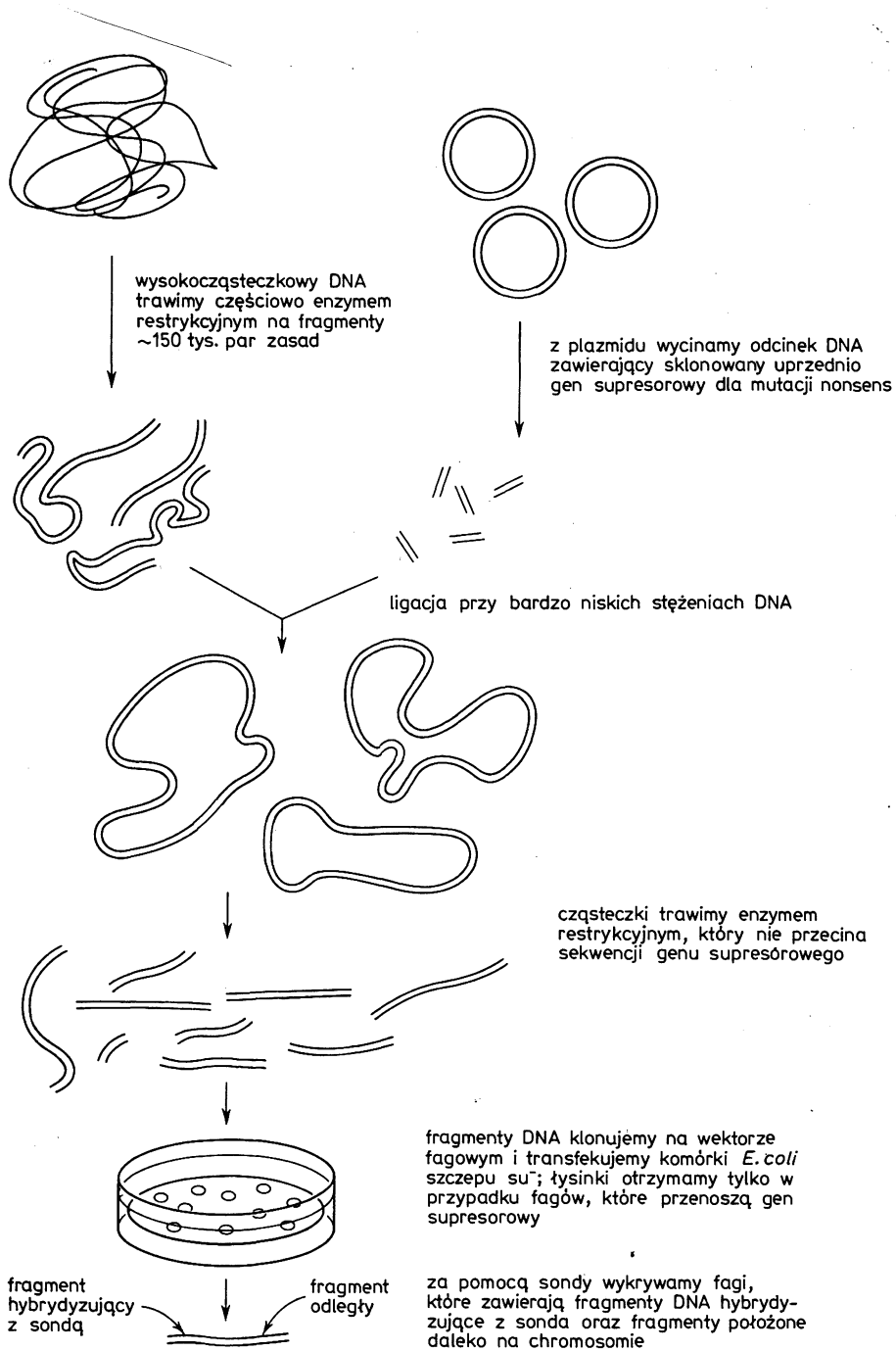
6.11. Wędrowki i skoki po chromosomach

Większość wektorów stosowanych do klonowania DNA ma stosunkowo małą „pojemność”; można w nich powielić fragmenty DNA o długości nie przekraczającej kilku lub kilkunastu tysięcy par nukleotydów. Wyjątek stanowią wspomniane kosmidy i wektory *YAC*, w których możemy klonować fragmenty DNA o długości kilkudziesięciu do kilku milionów tysięcy par nukleotydów. Trzeba mieć jednak na uwadze to, że długość niektórych genów eukariotycznych (wraz z intronami) osiąga nawet kilkaset tysięcy par nukleotydów, a mogą się także zdarzyć doświadczenia, w których klonuje się obszar genomu o długości milionów par zasad. W takich przypadkach stosuje się techniki wędrowki po chromosomie (ang. chromosome walking) lub skoków po chromosomie (ang. chromosome jumping), które umożliwiają klonowanie fragmentów DNA, znajdujących się obok siebie lub w pewnym oddaleniu na tym samym chromosomie. Punktem wyjścia dla zastosowania obu technik jest posiadanie sondy molekularnej, przynajmniej do fragmentu poszukiwanego genu lub do genu położonego w bezpośrednim sąsiedztwie.



Rys. 6.21. Wędrowka po chromosomie

Technika wędrowki po chromosomie (rys. 6.21) polega na wyszukaniu w banku genów klonu niosącego fragment DNA, który hybryduje z sondą, a następnie użyciu skrajnego odcinka tego fragmentu jako sondy do ziden-



Rys. 6.22. Skoki po chromosomie

tyfikowania kolejnego, przyległego doń odcinka chromosomu. Zabieg ten powtarza się do momentu uzyskania fragmentów DNA, obejmujących cały interesujący nas obszar chromosomu.

Technika skoków po chromosomie jest nieco bardziej skomplikowana. Polega na wytworzeniu w pierwszym etapie kolistych cząsteczek DNA, złożonych z sekwencji genu selekcyjnego (np. supresora mutacji typu nonsens) i dużych (ok. 150 tysięcy par nukleotydów) fragmentów chromosomalnego DNA. Po strawieniu tych cząsteczek enzymem restrykcyjnym, nie naruszającym genu selekcyjnego, z obu stron genu selekcyjnego pozostaną dłuższe lub krótsze fragmenty chromosomu, zależnie od odległości między końcem genu selekcyjnego a pierwszym miejscem rozpoznawanym w danym fragmencie przez użytą restryktazę. Zwykle będą one miały kilka tysięcy par nukleotydów długości, a odcinek, który w chromosomie leżał między nimi (ponad 100 tysięcy par nukleotydów), zostanie wyeliminowany z dalszej procedury. Uzyskane fragmenty klonuje się w wektorze fagowym z mutacją nonsens i transfekuje komórki bakterii, wykrywając metodą hybrydyzacji łyśinkowej klon zawierający fragment DNA hybrydujący do sondy molekularnej oraz fragment DNA pochodzący z tego samego chromosomu, odległy o ponad 100 tysięcy par nukleotydów od odcinka hybrydującego z sondą (rys. 6.22). Opisaną metodą posłużono się między innymi do sklonowania genu człowieka, którego mutacje są przyczyną mukowiscydozy (p. rozdz. 14).

6.12. Komputerowa analiza genów

W pracach nad rekombinowaniem i klonowaniem DNA komputer stał się niezbędny, przynajmniej w dwóch etapach: planowania eksperymentów i analizy sekwencji genów oraz kodowanych przez nie białek.

Przed przystąpieniem do właściwego doświadczenia często wykonuje się tzw. klonowanie komputerowe. Sekwencje wektorów i innych fragmentów DNA, które zamierzamy połączyć ze sobą, wpisuje się w pamięć komputera i analizuje za pomocą odpowiednich programów, dzięki którym można dobrać właściwe enzymy restrykcyjne, cząsteczki adaptorowe itd. Jeżeli planujemy syntezę oligonukleotydów, które będą służyć np. jako startery do syntezy fragmentu DNA techniką PCR lub z których składany będzie gen, to musimy wykonać analizę, która pozwala nam na określenie właściwej temperatury reasocjacji łańcuchów DNA i wykaże czy projektowane oligonukleotydy nie będą np. hybrydowały same ze sobą lub asocjowały w niewłaściwej kolejności.

Po sklonowaniu fragmentu DNA używa się programów komputerowych, które wyszukują w tej sekwencji otwarte ramki odczytu, charakterystyczne sekwencje nukleotydowe, sporządzają mapy restrykcyjne i porównują uzyskane sekwencje z przechowywanymi w bankach informacji sekwencjami uprzednio poznanych genów i białek. Jeżeli dysponujemy komputerem podłączonym do

sieci INTERNET, to możemy z dowolnego miejsca na ziemi przesłać badaną przez siebie sekwencję DNA do banku danych i uzyskać odpowiedź na pytanie, czy identyczna lub podobna sekwencja nukleotydowa (lub aminokwasowa) była już kiedykolwiek opisana i czy jej pochodzenie oraz funkcja jest znana. Ta rutynowa procedura przynosi czasem sensacyjne odkrycia, na przykład pierwszy przypadek przypisania onkogenowi określonej funkcji fizjologicznej: okazało się, że onkogen *v-sis* ma sekwencję homologiczną do genu kodującego czynnik wzrostowy płytek krwi, PDGF. Analiza komputerowa umożliwia badania ewolucji genów i molekularnych pokrewieństw między organizmami. Zagadnienia te są omówione szczegółowo w rozdziale 13. Analiza komputerowa oddaje również nieocenione usługi w pracach nad przestrzenną strukturą DNA, białek, kompleksów DNA – białko, jak też i innych związków chemicznych o podobnej złożoności.

7. STRUKTURA I DZIAŁANIE GENÓW PROKARIOTYCZNYCH

Do czasu, gdy techniki inżynierii genetycznej umożliwiły wniknięcie w strukturę genów eukariotycznych, większość informacji o budowie i działaniu genów pochodziła z prac nad organizmami prokariotycznymi. Wyniki tych prac, a zwłaszcza badań nad genami bakterii *E. coli* i faga λ , doprowadziły już na początku lat 60. do sformułowania podstawowych zasad regulacji działania genów, które do dziś, aczkolwiek poważnie rozszerzone i uzupełnione, są w pełni akceptowane.

U *Prokaryota* mamy do czynienia niemal wyłącznie z genami ciągłymi, tj. nie zawierającymi intronów, charakterystycznych dla większości genów *Eukaryota* (p. rozdz. 8). Prosta budowa genów nie oznacza jednak, by mechanizmy działania genów i regulacja ich funkcji były proste i zuniformizowane. Przeciwnie, u *Prokaryota* spotykamy się z bardzo wieloma sposobami regulacji działania genów, często wyjątkowo złożonych i wyrafinowanych. Wystarczy zapoznać się z systemami regulacji genetycznej, niezbędnymi do włączania w odpowiednim czasie i na właściwym poziomie kilkudziesięciu genów faga λ , aby zdać sobie sprawę i jednocześnie mieć przedsmak tego, z czym spotkamy się badając mechanizmy regulacji działania genów w procesie rozwoju i różnicowania wyższych organizmów (p. rozdz. 9). W tym rozdziale omówimy ogólne zasady transkrypcji genów prokariotycznych oraz najbardziej charakterystyczne przykłady różnych mechanizmów regulacji tego procesu.

7.1. Transkrypcja

Transkrypcja jest pierwszym etapem ekspresji genów. Proces ten katalizowany jest przez polimerazę RNA, która wiąże się z dwuniciowym DNA na początku genu i — przesuając się wzdłuż niego — syntetyzuje RNA komplementarny do jednej z dwu nici DNA. Specyficzne białka regulacyjne

determinują, czy określony gen może, czy nie może ulec transkrypcji. Transkrypcję przyjęto dzielić na trzy etapy: inicjację, elongację i terminację.

Inicjacja rozpoczyna się od związania polimerazy RNA z określoną sekwencją nukleotydową DNA, zwaną promotorem. Aby mogło dojść do zapoczątkowania syntezy RNA na matrycy jednej z dwu nici DNA, nici te muszą ulec przejściowemu rozdzieleniu; dochodzi do miejscowego rozluźnienia heliksu (topnienia) DNA. Właściwa inicjacja może być poprzedzona inicjacjami poronnymi, w których enzym, nie przesuując się wzdłuż DNA, syntetyzuje krótkie transkrypty składające się z kilku nukleotydów. Miejsce, od którego rozpoczyna się synteza RNA nazywa się miejscem startu, a odpowiednią parę nukleotydową oznacza się liczbą +1.

Elongacja jest etapem, w którym polimeraza RNA, przesuując się wzdłuż DNA i wywołując miejscowe jego topnienie, przedłuża koniec 3' łańcucha RNA. Substratem są rybonukleozydotrifosforany: ATP, GTP, UTP i CTP. Reszty monofosforanów (nukleotydy) ulegają włączeniu do łańcucha RNA z wytworzeniem wiązań 3'–5'-fosfodiesterowych. Uwolniony pirofosforan ulega hydrolizie do fosforanu. Cały proces jest egzoergiczny. W trakcie elongacji powstaje przejściowo struktura hybrydowa DNA–RNA. Ta sama cząsteczka enzymu syntetyzuje łańcuch RNA od początku (inicjacja) do końca (terminacja). Taki typ reakcji nazywamy procesywnym.

Terminacja zachodzi w ściśle określonym miejscu DNA, zwanym terminatorem, gdzie kompleks polimeraza RNA–DNA–RNA ulega dysocjacji.

7.2. Polimeraza RNA

Polimeraza RNA składa się z części rdzeniowej, kontrolującej tworzenie właściwych par między nukleotydami matrycowej nici DNA a substratowymi rybonukleozydotrifosforanami i wytwarzającej wiązania fosfodiesterowe. Rdzeń (ang. core) wystarcza do elongacji; w inicjacji i terminacji niezbędne jest współdziałanie białek pomocniczych. Niektóre z nich są niezbędne zawsze, niektóre zaś jedynie przy transkrypcji określonych genów.

Najlepiej poznana polimeraza RNA *E. coli* zawiera rdzeń składający się z trzech rodzajów podjednostek: α (40 kDa), β (155 kDa) i β' (160 kDa), kodowanych odpowiednio przez geny: *rpoA*, *rpoB* i *rpoC* i występujących w stosunku 2 : 1 : 1. Przeważająca forma komórkowej polimerazy RNA związana jest z podjednostką σ o masie 70 kDa, kodowaną przez gen *rpoD*. Podjednostka ta, zwana σ^{70} , nadaje enzymowi zdolność rozpoznawania większości promotorów *E. coli*, a więc kompletny enzym, $\alpha_2\beta\beta'\sigma^{70}$ (holoenzym E- σ^{70}), zdolny do swoistej inicjacji transkrypcji, jest dużą cząsteczką o masie zbliżonej do 500 kDa.

W komórce *E. coli* występuje ok. 7000 cząsteczek polimerazy RNA, z czego 2000–5000 cząsteczek, zależnie od aktualnych warunków fizjologicznych, jest zaangażowanych w procesie transkrypcji. Tak wysokie stężenie

enzymu wynika z jego podstawowej roli w ekspresji wszystkich, bez wyjątku, genów komórki. Polimeraza RNA przesuwa się wzdłuż DNA z nierównomierną szybkością; szybkość średnia odpowiada włączaniu ok. 40 nukleotydów na sekundę w temperaturze 37°C. Proces ten jest więc znacznie wolniejszy od przesuwania się polimerazy DNA, czy widełek replikacyjnych. Efektywność transkrypcji genu w znacznej mierze zależy od częstości inicjacji transkrypcji z promotora tego genu. W optymalnych warunkach inicjacja może zachodzić co sekundę.

Polimeraza RNA może wytwarzać słabe wiązania z dowolną sekwencją DNA; znajduje ona swoisty dla niej promotor przez kombinację ślizgania się wzdłuż DNA i przemieszczania się z innych miejsc DNA, dzięki zdolności DNA do wytwarzania pętli — a nie przez swobodną dyfuzję. Polimeraza RNA ma strukturę wydłużoną. Pokrywa 77–80 par zasad DNA podczas inicjacji. Nieco zmienia swoją konformację na początku elongacji (pokrywa ok. 60 par zasad) i znacznie bardziej w trakcie tego procesu, kiedy pokrywa tylko ok. 30 par zasad. Fragment DNA, który ulega miejscowemu topnieniu jest nie dłuższy niż 17 par zasad. Powstający w jego obrębie fragment, który tworzy strukturę hybrydową z RNA jest nie dłuższy niż 12 par zasad (rys. 7.1).

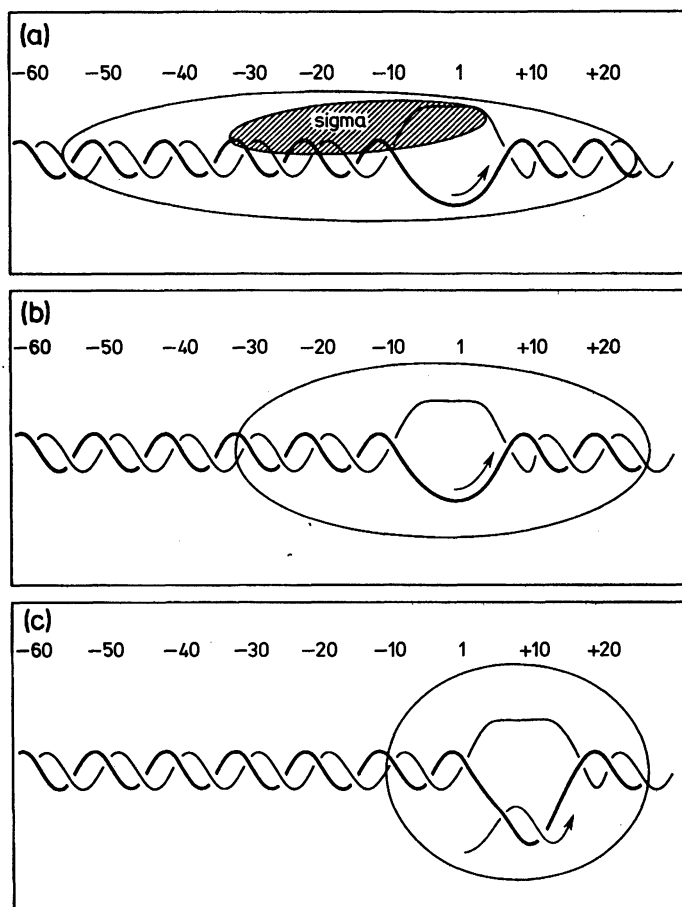
Jak się wydaje, każda z podjednostek polimerazy RNA spełnia określone funkcje. Jak już wspomniano, podjednostka σ nadaje enzymowi zdolność rozpoznawania określonych promotorów. Izolowana podjednostka nie wykazuje dużego powinowactwa do DNA, natomiast po związaniu z rdzeniem polimerazy RNA podjednostka σ zmienia właściwości enzymu; traci on zdolność słabego wiązania się z dowolnym miejscem DNA i wytwarza trwały kompleks z promotorem. Wkrótce po inicjacji, po syntezie 8–9-nukleotydowego transkryptu, podjednostka σ oddysocjuje od rdzenia enzymu.

Sądząc z lokalizacji mutacji, nadających bakteriom odporność na antybiotyk, podjednostka β jest miejscem oddziaływania dwu antybiotyków. Jednym jest ryfampicyna, która uniemożliwia inicjację, działając przed wytworzeniem się pierwszego wiązania fosfodiesterowego. Drugim jest streptolidygina, hamująca elongację. Podjednostka β wiąże niektóre analogi rybonukleozydotrifosforanów. Wszystko to sugeruje, że podjednostka ta jest zaangażowana w wiązanie substratów reakcji.

Heparyna jest polianionem, który wiąże się z podjednostką β' i hamuje transkrypcję *in vitro*. Heparyna współzawodniczy z DNA w wiązaniu się z polimerazą RNA, stąd sugestia, że podjednostka β' jest odpowiedzialna za wiązanie się enzymu z DNA.

Podjednostka α jest odpowiedzialna za montaż rdzenia enzymu. Odgrywa ona również istotną rolę w oddziaływaniach polimerazy RNA z białkami aktywującymi transkrypcję operonu fermentacji arabinozy, melibiozy, syntezy cysteiny oraz z białkiem CII faga λ , które aktywuje transkrypcję zachodzącą z promotorów p_{RE} i p_I .

Wydaje się, że złożona struktura bakteryjnej polimerazy RNA umożliwia jej współdziałanie z różnymi małowcząsteczkowymi efektorami bądź białkami



Rys. 7.1. Zmiany polimerazy RNA przy przejściu od inicjacji transkrypcji do etapu elongacyjnego. (a) Holoenzym E- σ^{70} początkowo kontaktuje się z rejonem od -55 do $+20$; powstają transkrypty poronne. (b) Syntezie 10-nukleotydowego transkryptu towarzyszy dysocjacja podjednostki σ^{70} ; enzym traci kontakt z rejonem od -35 do -55 . (c) Po wcieleniu 15–20 nukleotydów do RNA enzym zmienia swoją konformację jeszcze bardziej, pokrywając jedynie 30–40 par zasad

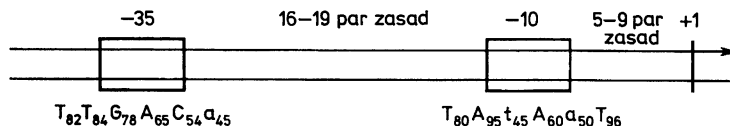
regulacyjnymi, co zapewnia funkcjonowanie tego enzymu w różnych warunkach fizjologicznych.

Polimeraza RNA, kodowana przez faga *T3* lub *T7*, zbudowana jest z jednego łańcucha polipeptydowego. Enzym ten syntetyzuje RNA z szybkością ok. 200 nukleotydów na sekundę w temperaturze 37°C , lecz rozpoznaje jedynie promotory fagowe, całkowicie odmienne w swojej sekwencji nukleotydowej od promotorów gospodarza. Ta fagowa polimeraza RNA jest zaprogramowana do wykonania jednego tylko zadania, którym jest reprodukcja faga. Układ ten wykorzystano w inżynierii genetycznej, konstruując bakterie zawierające gen polimerazy RNA faga *T7* pod kontrolą promotora o regulowanej aktywności i wprowadzając do komórek plazmid z klonowanym genem pod kontrolą promotora *T7*. Po indukcji polimerazy RNA faga *T7* uzyskuje się

z dużą wydajnością białko kodowane przez gen klonowany. Polimeraza RNA faga *T7* jest niewrażliwa na ryfampicynę. Dodanie tego antybiotyku hamuje działanie polimerazy *E. coli*. Dzięki temu uzyskuje się wyłącznie ekspresję genu klonowanego.

7.3. Promotory

Promotory polimerazy $E-\sigma^{70}$ wykazują podobieństwo sekwencji nukleotydowej, lecz nie na całej długości. Istotne są dwa heksamery; środek pierwszego z nich znajduje się zazwyczaj w pobliżu pozycji -10 i stąd jego nazwa, oprócz synonimowych nazw „sekwencja Pribnowa” od nazwiska odkrywcy lub „sekwencja TATAAT”. Środek drugiego z nich znajduje się w pobliżu pozycji -35. Oprócz tych dwu sekwencji, istotną część składową sygnału rozpoznawanego przez polimerazę RNA stanowi długość oddzielającego je fragmentu DNA (16–19 par zasad) (rys. 7.2).



Rys. 7.2. Typowy promotor polimerazy RNA z podjednostką σ^{70} ($E-\sigma^{70}$) składa się z dwu sekwencji heksamerowych, -10 i -35 i dwu fragmentów DNA o dowolnej sekwencji nukleotydowej. Jeden z nich (16–19 par zasad, ang. spacer) oddziela te fragmenty od siebie, a drugi (5–9 par zasad, ang. discriminator) oddziela heksamer -10 od miejsca startu +1. Przedstawiona jest sekwencja najwyższej zgodności (ang. consensus) obu heksamerów. Poszczególne nukleotydy występują w nich z częstością 45–96%; duże litery stosuje się do oznaczania nukleotydów występujących z częstością wyższą niż 54%

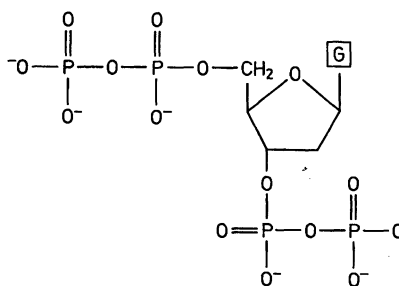
Heksamery niektórych promotorów nie wykazują podobieństwa do sekwencji kanonicznej; z reguły promotory te wymagają do rozpoznania przez polimerazę $E-\sigma^{70}$ współdziałania białek pomocniczych. Analiza efektów mutacji promotorowych sugeruje, że heksamer -35 jest pierwszym sygnałem rozpoznawanym przez polimerazę RNA; enzym ten najpierw wiąże się z tą sekwencją, a dopiero później z sekwencją -10. Natomiast funkcją heksameru -10 jest umożliwienie przejścia promotor-polimeraza RNA ze stanu zamkniętego w stan otwarty, w którym komplementarne nici DNA są od siebie rozdzielone na długości kilkunastu nukleotydów. Warto zwrócić uwagę, że heksamer -10 zbudowany jest zazwyczaj wyłącznie z par A–T, które wymagają dostarczenia mniejszej ilości energii do ich rozdzielania, niż pary G–C. Rozwinięty rejon DNA kompleksu otwartego można zidentyfikować badając dostępność zasad dla odczynników chemicznych. Doświadczenia, polegające na metylacji reszt adeniny i cytozyny, wykazały, że rejon otwarty znajduje się między -9 i +3, a więc sekwencja w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca startu ma wpływ na inicjację. Z kolei rejon ulegający najwcześniejszej

transkrypcji (od +1 do +30) wpływa na szybkość opuszczania promotora przez polimerazę RNA, umożliwiając inicjację transkrypcji przez następną cząsteczkę polimerazy RNA. Powinowactwo polimerazy do promotora, łatwość przechodzenia w stan kompleksu otwartego i szybkość opuszczania promotora przez enzym stanowią o „sile” promotora. Tylko silne promotory, zapewniające dużą efektywność ekspresji, wykorzystywane są w inżynierii genetycznej.

Znaczenie rozdzielania komplementarnych nici DNA w inicjacji transkrypcji uwidacznia się w badaniu wpływu superhelikalności DNA na ten proces. Negatywnie superhelikalny DNA wymaga mniej energii do miejscowego stopienia DNA w kompleksie inicjacyjnym, co jest prawdopodobnie przyczyną tego, że *in vitro* DNA taki jest bardziej efektywną matrycą od tego samego DNA w stanie zrelaksowanym. Ujemna superhelikalność DNA *in vivo* w wyniku działania gyrazy na ogół stymuluje transkrypcję. Dotyczy to m.in. genu kodującego topoizomerazę I — enzym zmniejszający superhelikalność wywoływaną przez gyrazę. Do wyjątków należą promotory genów kodujących podjednostki gyrazy, które ulegają osłabieniu przy wzroście ujemnej superhelikalności. Występuje tu zatem regulacja stopnia superhelikalności DNA przez ujemne sprzężenie zwrotne.

Rola dyskryminatora, sekwencji między heksamerem –10 a miejscem startu, wyszła na jaw w badaniach nad odpowiedzią ścisłą (ang. stringent) *E. coli*. Odpowiedź ta pozwala komórce bakteryjnej na zmianę metabolizmu w czasie głodu aminokwasowego z nieproduktywnego wytwarzania rybosomów na wytwarzanie enzymów syntezy aminokwasów. Bezpośrednią odpowiedzią komórki na głód aminokwasowy jest synteza 5'difosforanu 3'difosforanu guanozyny, ppGpp (rys. 7.3), alarmonu informującego komórkę o głod-

Rys. 7.3. Cząsteczka ppGpp, 5'difosforanu 3'difosforanu guanozyny, alarmonu głodu aminokwasowego *E. coli*



dzie aminokwasowym. Ten małowcząsteczkowy efektor wiąże się z polimerazą RNA, zmieniając jej powinowactwo do większości promotorów. Transkrypcja genów kodujących rRNA, tRNA i białka rybosomalne ulega zahamowaniu, a transkrypcja operonów syntezy aminokwasów — aktywacji. Okazało się, że promotory ulegające represji przez ppGpp są bogatsze w pary G—C, a te ulegające aktywacji — bogatsze w pary A—T w rejonie dyskryminatora. Istotne znaczenie mają tu również zmiany sekwencji nukleotydowej –10.

7.4. Czynniki sigma

Drastyczna zmiana stylu życia, zachodząca przy przejściu bakterii *Bacillus subtilis* od fazy wegetatywnej do sporulacji po wyczerpaniu substancji odżywczych środowiska, wymaga ekspresji odmiennego zespołu genów. Od dawna wiadomo było, że u podstaw molekularnych tej zmiany leży zastąpienie standardowej podjednostki σ^{43} (analogu σ^{70} *E. coli*) podjednostkami specyficznymi dla poszczególnych faz sporulacji. Zjawisko to budzi duże zainteresowanie ze względu na pewne analogie do procesu różnicowania się komórek eukariotycznych. Najlepiej zbadanym układem modelowym jest tu bakteriofag *SPO1* atakujący *B. subtilis*. W cyklu infekcyjnym tego faga ekspresja genów zachodzi w trzech etapach. Bezpośrednio po zakażeniu geny wczesne faga ulegają transkrypcji przez polimerazę RNA gospodarza, $\alpha_2\beta\beta'\sigma^{43}$; wśród nich znajduje się gen 28, kodujący fagową podjednostkę σ o masie cząsteczkowej 26 kDa. Podjednostka σ^{26} zastępuje podjednostkę σ^{43} , w wyniku czego geny fagowe okresu pośredniego ulegają transkrypcji. Wśród genów tych znajdują się geny 33 i 34, kodujące białka o masie odpowiednio: 13 kDa i 24 kDa, które wspólnie zastępują podjednostkę σ^{26} . Polimeraza E- $\sigma^{13,24}$ jest zdolna do inicjacji transkrypcji z promotorów genów późnych. W cyklu rozwojowym faga *SPO1* występuje więc kaskada transkrypcji — od wczesnych przez pośrednie do późnych genów, wynikająca z regulacji inicjacji transkrypcji. Podobny efekt końcowy, lecz uzyskany przez regulację terminacji transkrypcji, występuje w cyklu rozwojowym faga λ *E. coli*.

W standardowych warunkach wzrostu za ponad 90% aktywności polimerazy RNA w komórce *E. coli* odpowiada E- σ^{70} . Alternatywne podjednostki σ , występujące w niewielkich stężeniach, kontrolują ekspresję genów należących do dwu zasadniczych klas. Jedna z nich zawiera geny umożliwiające komórce odpowiednie reagowanie na sytuacje stresowe i(lub) zmiany środowiska, takie jak: szok cieplny, szok chemiczny i głodzenie. Geny drugiej klasy mają funkcje związane z procesami rozwoju, np. z wytwarzaniem rzepek czy przejściem do stacjonarnej fazy wzrostu. W określonych warunkach dochodzi do znacznego zwiększenia udziału określonej podjednostki σ w aktywności polimerazy RNA w komórce przez przyspieszenie syntezy tej podjednostki i(lub) zahamowanie jej rozpadu.

Bakterie *E. coli* dysponują mechanizmem ochronnym (odpowiedź stresowa), umożliwiającym przeżycie w warunkach gwałtownego podwyższenia temperatury — szoku cieplnego. Odpowiedź stresowa, należąca do typu kontroli nadrzędnych, polega na szybkiej indukcji syntezy białek stresowych, spełniających różne funkcje ochronne, m.in. renaturację lub proteolizę zdenaturowanych termicznie białek komórkowych. Geny regulonu stresu cieplnego (jest ich ok. 20) mają promotory różniące się sekwencją od promotorów rozpoznawanych przez E- σ^{70} . Te właśnie promotory są rozpoznawane specyficznym przez polimerazę RNA, zawierającą podjednostkę σ^{32} , kodowaną przez gen *rpoH* (ang. heat shock). Podjednostka σ^{32} w warunkach standardowych

ulega szybkiej proteolizie. Podwyższenie temperatury o 10°C wywołuje przejściową jej stabilizację, być może przez okresowe zahamowanie aktywności swoistej proteazy lub nasycenie substratowe tego enzymu. Efektem tego procesu jest znaczne zwiększenie transkrypcji genów regulonu w czasie 14–20 min po pojawieniu się bodźca. Odpowiedź stresowa zależna od σ^{32} może być wywołana przez inne czynniki, jak: działanie etanolu, odczynników utleniających, promieniowania UV lub zakażenie fagowe.

Niedawno odkryto drugą podjednostkę σ uczestniczącą w odpowiedzi stresowej, σ^{24} , działającą w temperaturze przewyższającej 42°C. Do tej pory zidentyfikowano tylko dwa geny z promotorami rozpoznawanymi przez E- σ^{24} : *htrA*, kodujący proteazę i *rpoH*, kodujący σ^{32} . O złożoności regulacji ekspresji genu *rpoH* świadczy fakt, że ma on cztery promotory; dwa z nich są rozpoznawane przez E- σ^{70} .

Polimeraza E- σ^{28} zawiera podjednostkę σ kodowaną prawdopodobnie przez gen *flaI*. Współdziałając z białkiem FlbB transkrybuje ona geny odpowiedzialne za powstawanie rzęsek i za chemotaksję. Ekspresja genu *flbB* znajduje się pod kontrolą kataboliczną, zatem nie może zachodzić w obecności glukozy. Operon zawierający geny *flbB* i *flaI* odgrywa główną rolę w kaskadzie transkrypcji genów rzęskowych.

Dużą uwagę skupia wykryta niedawno podjednostka kodowana przez gen *rpoS* (*katF*) *E. coli*, uczestnicząca w indukcji genów determinujących przejście do stacjonarnej fazy wzrostu. Komórki przy przejściu do fazy stacjonarnej stają się mniej wrażliwe na podwyższoną temperaturę, H₂O₂ lub wysoką osmolarność środowiska. Komórki te zaczynają syntetyzować glikogen jako materiał zapasowy i mimo że ogólna synteza białka zostaje zredukowana — dochodzi w nich do indukcji syntezy 30–50 białek, m.in. katalazy HPII (*katE*), egzonukleazy III (*xthD*) i kwaśnej fosfatazy (*appA*). Jak się wydaje, w ekspresji tych genów bierze udział podjednostka σ , kodowana przez *rpoS*. Najlepiej zbadany jest udział tej podjednostki w transkrypcji genu *bolA*. Produkt tego genu bierze udział w procesach morfogenetycznych *E. coli*, również w podziale komórkowym. O ile komórki typu dzikiego, przechodząc do fazy stacjonarnej, zmieniają kształt z pałeczkowatego w kulisty, mutanty *bolA* pozostają pałeczkami. W promotorze genu *bolA* heksamer –35 wykazuje podobieństwo do analogicznego heksameru promotora E- σ^{70} , heksamer –10 ma natomiast całkowicie odmienną sekwencję.

Do lepiej zbadanych podjednostek należy σ^{54} , kodowana przez gen *rpoN* (*glnF*, *ntrA*), funkcjonująca w asymilacji NH₃ przy niskim jego stężeniu, w bakteriach *E. coli* i *S. typhimurium* (p. podrozdz. „Regulacja azotowa”). Ta sama podjednostka funkcjonuje w bakteriach wielu innych gatunków, m.in. w wiązaniu azotu atmosferycznego przez *Klebsiella pneumoniae*, w wytwarzaniu białek wirulencji patogena roślin *Pseudomonas syringae*, w wykorzystaniu molekularnego wodoru jako źródła energii przez *Alcaligenes eutrophus*. Ciekawe, że we wszystkich tych przypadkach transkrypcja przez E- σ^{54} wymaga

obecności sekwencji wzmacniającej ekspresję (ang. enhancer) i wiążącego się z nią aktywatora: NtrC, NifA lub podobnego do nich białka, a nieraz także białka IHF, wywołującego zginanie dwuniciowej cząsteczki DNA.

Porównanie sekwencji aminokwasowej podjednostek σ *E. coli* i *B. subtilis* wykazuje istnienie charakterystycznych obszarów homologii. W najbardziej zbliżonych (i największych) podjednostkach σ^{70} *E. coli* i σ^{43} *B. subtilis* występują cztery obszary homologii, oznaczone numerami od 1 do 4.

Tabela 7.1. Porównanie struktury promotorów *E. coli* rozpoznawanych przez polimerazę RNA związaną z różnymi podjednostkami σ . W pierwszej kolumnie — nazwy genów kodujących te podjednostki, w drugiej — nazwy samych podjednostek σ . Dalej: sekwencje nukleotydowe w pozycji -35, liczba nukleotydów fragmentu (*spacer*) oddzielającego tę sekwencję od sekwencji -10 i sekwencja nukleotydowa w tej pozycji. Wyjątkowo dla σ^{54} pozycja -27 zastępuje pozycję -35. N — nukleotyd dowolny, Y — pirymidynowy, a R — purynowy. W tabeli uwzględniono również nazewnictwo podjednostek σ związane z ich wykorzystaniem: σ^H (heat shock), σ^F (flagella and chemotaxis), σ^S (stationary phase), σ^N (nitrogen regulation). Podjednostki σ^D i σ^E nazwy swe w tym systemie wzięły od nazw odpowiednich genów, *rpoD* i *rpoE*.

<i>rpoD</i>	σ^{70} (σ^D)	-35 TTGACA	N ₁₇	-10 TATAAT
<i>rpoH</i> (<i>htpR</i>)	σ^{32} (σ^H)	TNTCNCCCTTGAA	N ₁₃₋₁₅	CCCCATTTA
<i>rpoE</i>	σ^{24} (σ^E)	GAACTT	N ₁₆	TCTGA
<i>rpoF</i> (<i>flaI</i> ?)	σ^{28} (σ^F)	TAAA	N ₁₅	GCCGATAA
<i>rpoS</i> (<i>katF</i>)	σ (σ^S)	CTGCAA	N ₁₆₋₂₀	CGGCNAGTA
<i>rpoN</i> (<i>glnF</i> , <i>ntrA</i>)	σ^{54} (σ^N)	-27 CTGGYAYR	N ₄	-10 TTGCA

W pozostałych, mniejszych podjednostkach, występują trzy lub mniej obszarów homologii, co świadczy o wspólnym pochodzeniu ewolucyjnym tych białek. Całkowicie odmienna jest natomiast sekwencja aminokwasowa podjednostki σ^{54} *E. coli*. Zgodnie z tym promotor rozpoznawany przez $E\text{-}\sigma^{54}$ ma całkowicie odmienną strukturę i sekwencję nukleotydową (tab. 7.1).

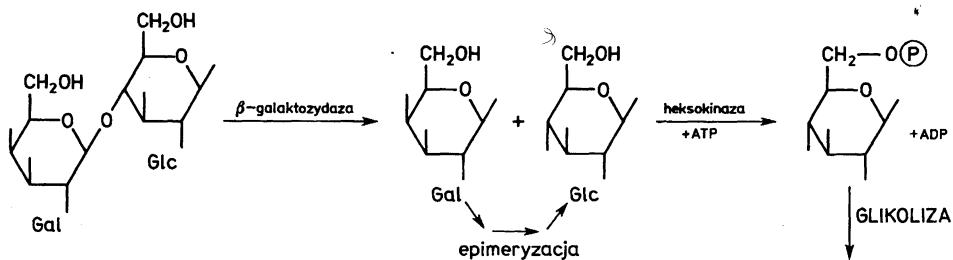
7.5. Indukcja i represja

Organizmy jednokomórkowe muszą szybko reagować na zmiany środowiska: przeżywalność zależy od zdolności adaptacji metabolizmu do tego substratu, który się w bezpośrednim sąsiedztwie pojawi. W stałej konkurencji, większą szansę na przeżycie będą miały te organizmy, które ewolucyjnie wykształciły oszczędne mechanizmy gospodarki materiałowej i energetycznej. A więc tylko te enzymy powinny być syntetyzowane, które w danym momencie są rzeczywiście potrzebne. Synteza enzymów określonego szlaku metabolicznego powinna być zatem równocześnie i szybko włączana i wyłączana. Przedstawione założenia spełniane są zarówno w katabolizmie, gdzie modelowym szlakiem jest fermentacja węglowodanu, m.in. laktozy, jak i w anaboliz-

mie, gdzie modelowym szlakiem jest biosynteza aminokwasu, np. tryptofanu. W obu przypadkach geny określonego szlaku metabolicznego występują obok siebie tworząc operon, w którym podlegają one wspólnemu mechanizmowi kontroli. Regulacja operonu zachodzi przez oddziaływanie regulatorowej makrocząsteczki z sekwencją DNA położoną w pobliżu promotora. Transkrypcji ulegają kolejno wszystkie geny operonu, co zapewnia ich skoordynowaną ekspresję. Policistronowe transkrypty operonów są szybko degradowane przez nukleazy, co umożliwia szybkie zakończenie syntezy enzymów danego szlaku metabolicznego, gdy już nie są one komórce potrzebne. Twórcami koncepcji operonu byli Jacques Monod i François Jacob, którzy pracowali w tym samym czasie w Instytucie Pasteura w Paryżu, pierwszy — nad indukcją operonu laktozowego, a drugi — nad indukcją profaga λ w bakteriach lizogennych. Monod i Jacob, a także André Lwoff (badania nad lizogenezacją), uzyskali nagrodę Nobla w zakresie medycyny i fizjologii w roku 1965.

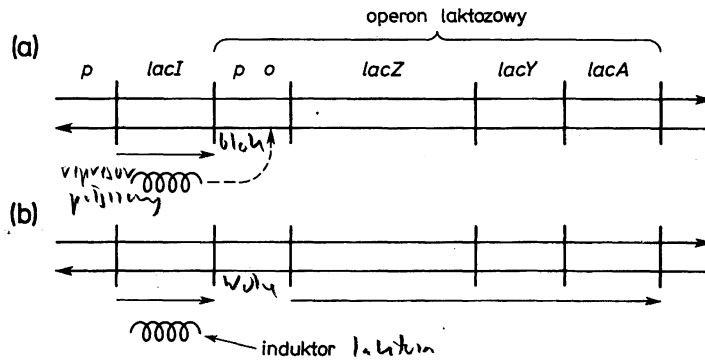
7.6. Indukcja operonu laktozowego

Synteza enzymów w odpowiedzi na pojawienie się specyficznego substratu, to indukcja. Ten typ regulacji jest szeroko rozpowszechniony wśród bakterii; występuje również u niższych eukariontów, takich jak drożdże. Fermentacja laktozy (rys. 7.4) przez *E. coli* stanowi modelowy przykład procesu regulowanego za pomocą mechanizmu indukcji.



Rys. 7.4. Fermentacja laktozy rozpoczyna się od hydrolizy wiązania β -galaktozydowego. W powstającej cząsteczce galaktozy (Gal) następuje inwersja grupy hydroksylowej przy węglu c_4 (epimeryzacja), dzięki której zostaje ona przekształcona w glukozę (Glc). Obie cząsteczki glukozy ulegają dalszym przemianom w szlaku glikolitycznym, którego pierwszym ogniwem jest glukozo-6-fosforan

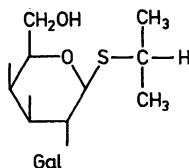
Operon laktozowy (operon *lac*, rys. 7.5) składa się z trzech genów strukturalnych: *lacZ* (β -galaktozydaza), *lacY* (β -galaktozydopermeaza) i *lacA* (transacetylaza galaktozydowa). Permeaza β -galaktozydów jest białkiem błonowym, odpowiedzialnym za transport β -galaktozydów ze środowiska przez bakteryjną błonę komórkową do wnętrza komórki. Fizjologiczna rola transacetylazy nie jest znana. Regulatorową makrocząsteczką dla operonu *lac* jest



Rys. 7.5. Struktura i funkcjonowanie genów odpowiedzialnych za fermentację laktozy. Gen *lacI*, determinujący konstytutywną syntezę represora Lac ma własny promotor i terminator transkrypcji. Geny strukturalne *lacZ*, *lacY* i *lacA*, które kodują, odpowiednio β -galaktozydazę, β -galaktozydopermeazę i transacetylazę galaktozydów, tworzą — wraz z promotorem i operatorem — operon *lac*. (a) Represor Lac wiąże się z operatorem, uniemożliwiając transkrypcję operonu *lac*. (b) Represor Lac, wiążąc induktor, którym jest β -galaktozyd, zmienia swoją konformację i traci powinowactwo do operatora, co umożliwia transkrypcję operonu *lac*

białko represorowe, kodowane przez gen *lacI*. Gen ten, zlokalizowany w pobliżu operonu *lac*, jest transkrybowany stale (w sposób konstytutywny) z niską efektywnością. Represor Lac wiąże się z operatorem — sekwencją DNA zachodzącą z jednej strony na sekwencję promotora, a z drugiej obejmującą ponad 20 par zasad genu *lacZ*. Białko represora składa się z czterech identycznych podjednostek; każda z nich ma miejsce wiążące sekwencję operatorową oraz miejsce wiążące induktor. Induktorem może być laktoza lub inny β -galaktozyd. Represor Lac może wiązać się z operatorem jedynie pod nieobecność induktora. Ta substancja małowcząsteczkowa, wiążąc się kooperatywnie z tetramerowym represorem, wywołuje w nim allosteryczną zmianę konformacji, prowadzącą do utraty powinowactwa do operatora. Wiązanie represora z operatorem uzależnione jest więc od małych zmian stężenia efektora allosterycznego — β -galaktozydu.

W badaniach indukcji i w jej wykorzystaniu w inżynierii genetycznej ważną rolę odgrywają induktory „bezinteresowne” (ang. gratuitous inducers) — cząsteczki podobne do laktozy na tyle, że wiążą się z represorem Lac i wywołują indukcję, ale na tyle różne, że nie są już hydrolizowane przez β -galaktozydazę. A więc induktory bezinteresowne nie są metabolizowane i pozostają w komórce w stałym stężeniu. Piętnowany izotopowo izopropylotiogalaktozyd, IPTG (rys. 7.6), „bezinteresowny” induktor operonu *lac* został wykorzystany w pre-



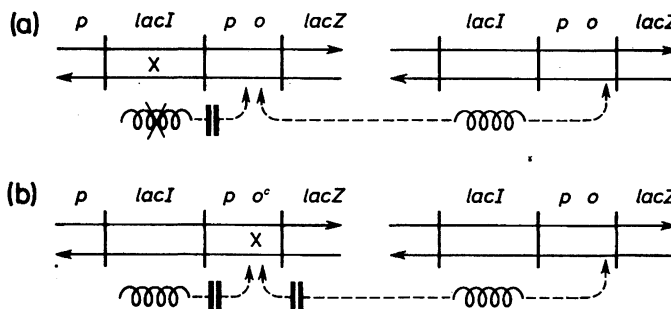
Rys. 7.6. Cząsteczka IPTG, izopropylotiogalaktozydu, najczęściej stosowanego induktora bezinteresownego, który wiążąc się z represorem Lac wywołuje indukcję, lecz nie ulega hydrolizie przez β -galaktozydazę

paratywnej izolacji pierwszego białka represorowego, represora Lac, przez Waltera Gilberta na Uniwersytecie Harvarda. Nagrodę Nobla w zakresie chemii uzyskał Gilbert, a także Frederick Sanger i Paul Berg — później, w roku 1980, za opracowanie metody sekwencjonowania DNA.

Jeżeli komórka *E. coli* rośnie przy braku laktozy lub innego β -galaktozydu, to zawiera zaledwie kilka cząsteczek β -galaktozydazy. Śladowa ekspresja operonu *lac* w stanie represji umożliwia transport pierwszych cząsteczek laktozy ze środowiska do wnętrza komórki. Fizjologicznym induktorem jest izomer laktozy — allolaktoza, która powstaje z laktozy w wyniku transglikozylacji. Już po 2–3 min od pojawienia się laktozy w środowisku stężenie β -galaktozydazy w cytoplazmie i permeazy w błonie komórkowej zaczyna rosnać; zwiększa się zatem transport laktozy (dodatknie sprzężenie zwrotne). Stężenie β -galaktozydazy osiąga szybko wartość ok. 5000 cząsteczek na komórkę. Nietrwałość mRNA *lac* jest przyczyną, z powodu której synteza enzymów operonu *lac* po usunięciu induktora ustaje bardzo szybko.

Represor Lac spełnia dwie funkcje: wiąże się z operatorem i wiąże się z induktorem. W związku z tym istnieją dwie klasy mutacji genu *lacI*. Pierwsza klasa, *lacI⁻*, wywołuje utratę zdolności wiązania się represora Lac z operatorem, co doprowadza do konstytutywnej (bez udziału induktora) syntezy enzymów operonu *lac*. Jeżeli w komórce częściowo diploidalnej zawierającej dwa operony *lac* (np. jeden z nich w chromosomie, a drugi w plazmidzie) występują dwa allele genu *lacI*, *lacI⁺* i *lacI⁻*, to nie zmutowany allel *lacI⁺* obsługuje oba operony *lac*: oba podlegają normalnej regulacji (rys. 7.7(a)). Represor Lac obsługuje zatem również operon *lac*, znajdujący się w innej cząsteczce DNA: działa „w trans”. Mutacja *lacI⁻* jest recesywna, a jej komplementacja przez allel nie zmutowany świadczy, że represor Lac jest względnie trwały i zdolny do dyfuzji.

Druga klasa mutacji (nie przedstawiona na rys. 7.7), *lacI^s*, wywołuje utratę zdolności wiązania się represora Lac z induktorem. Tak zmieniony represor Lac, pomimo obecności induktora, jest stale związany z operatorem, nie



Rys. 7.7. Mutacje blokujące wiązanie represora Lac z operatorem, *lacI⁻* (a) i *lacI^s* (b), wykazują identyczny efekt fenotypowy — konstytutywną syntezę enzymów operonu *lac*, zachowują się jednak różnie w teście komplementacji. Objaśnienia są w tekście

zezwalając na indukcję operonu *lac*. Jeżeli w komórce częściowo diploidalnej zawierającej dwa operony *lac* występują dwa allele genu *lacI*, *lacI*⁺ i *lacI*^s, to zmieniony represor Lac blokuje oba operony. A zatem w teście komplementacji dominujący efekt mutacji *lacI*^s przejawia się „w *trans*”.

Utrata zdolności wiązania się represora z operatorem może wynikać z mutacji operatora; jej efektem jest konstytutywna ekspresja operonu *lac*, stąd jej nazwa *o*^c (ang. constitutive). W komórce częściowo diploidalnej zawierającej dwa operony *lac* z operatorami, odpowiednio, *o*⁺ i *o*^c, operony te zachowują się niezależnie od siebie (rys. 7.7(b)). Ekspresja pierwszego podlega normalnej regulacji, a ekspresja drugiego jest konstytutywna. A zatem efekt mutacji *o*^c przejawia się „w *cis*”: dotyczy jedynie operonu, którego częścią składową jest zmutowany operator.

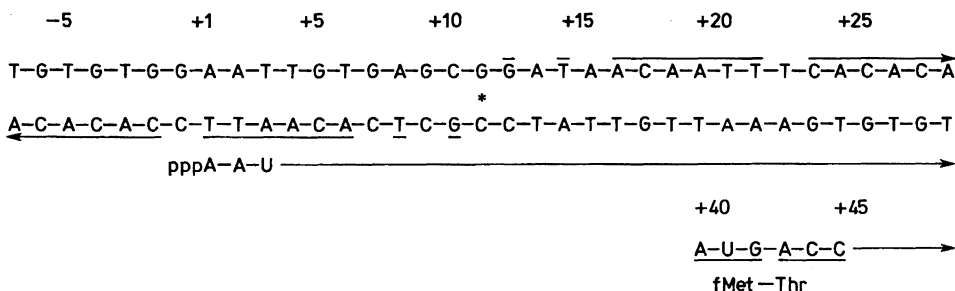
Obecność represora w miejscu operatorowym, stanowiąc zawadę przestrzenną, może w niektórych przypadkach zablokować wiązanie polimerazy RNA przez promotor. W przypadku operonu *lac* okazało się jednak, że oba te białka mogą się wiązać z odpowiadającymi im sekwencjami równocześnie (rys. 7.8). Obecność represora Lac stymuluje nawet wiązanie polimerazy RNA



Rys. 7.8. Rejon promotorowo-operatorowy *lac*, z zaznaczonymi miejscami wiązania represora Lac przez operator i polimerazy RNA przez promotor. Kompleks represor – operator stymuluje wiązanie polimerazy RNA. Po usunięciu represora w trakcie indukcji sekwencja DNA zaznaczona na rysunku może ulec rozwinięciu — „zamknięty” kompleks promotor – polimeraza RNA przechodzi w kompleks „otwarty”

z promotorem *lac*. Represor jednak nie pozwala na rozwinięcie dwuniciowej struktury DNA — utworzenie „otwartego” kompleksu promotor – polimeraza RNA. Represor Lac związany z operatorem umożliwia przechowywanie polimerazy RNA w miejscu promotorowym. Po usunięciu kompleksu represor – induktor z operatora nie trzeba czekać, aż polimeraza RNA znajdzie promotor, gdyż już jest tam obecna. „Zamknięty” kompleks promotor – polimeraza RNA bardzo szybko przekształca się w kompleks „otwarty” — wstęp do inicjacji transkrypcji.

Operator *lac* ma cechę wspólną dla wielu miejsc rozpoznawanych przez białka regulatorowe — wykazuje sekwencję palindromową. Sekwencja nukleotydowa jednego ramienia po obróceniu o 180° jest w znacznej mierze powtórzeniem sekwencji ramienia drugiego (rys. 7.9). Mutacje punktowe *o*^c pozwoliły na identyfikację tych par zasad, które decydują o wiązaniu represora



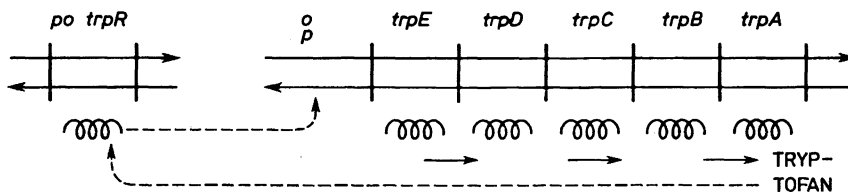
Rys. 7.9. Sekwencja operatora *lac*. Dwa, prawie identyczne ramiona palindromu zaznaczone są strzałkami, a jego środek gwiazdką. Transkrypcja rozpoczyna się w +1, natomiast kodon inicjacji translacji (w tym przypadku syntezy β -galaktozydazy) — AUG — kodujący metioninę w pozycji inicjatorowej (formylometioninę), jest zawarty od +39 do +41

Lac, a delekcje z lewej i z prawej strony zdefiniowały oba końce sekwencji operatorowej. Chemiczna reakcja metylacji DNA, głównie reszt adeniny i cytozyny, pozwoliła zbadać, które fragmenty DNA są chronione przez związany z operatorem *lac* represor. Te różne podejścia eksperymentalne doprowadziły do ogólnego wniosku, że stosunkowo mała liczba kontaktów między resztami aminokwasowymi represora i nukleotydami operatora jest odpowiedzialna za niezwykle specyficzną asocjację operatora z represorem. O istotnej roli sekwencji palindromowej świadczą mutacje zwiększające jej symetrię; powinowactwo operatora do represora może w tych przypadkach wzrosnąć aż dziesięciokrotnie. Najprawdopodobniej każde z dwu prawie identycznych ramion palindromu wiąże dimer represora; w ten sposób z całym palindromem związany jest tetramer.

7.7. Represja operonu biosyntezy tryptofanu

Zahamowanie syntezy enzymów szlaku biosyntetycznego w odpowiedzi na nadmiar końcowego produktu tego szlaku nazywamy represją. Końcowy produkt danego szlaku może pojawić się w komórce w nadmiarze bądź w wyniku mniejszego na niego zapotrzebowania, bądź na skutek przypadkowego pojawienia się go w środowisku. Jednym z lepiej zbadanych pod tym względem szlaków jest synteza tryptofanu, gdzie dodatkowym mechanizmem regulującym transkrypcję jest atenuacja. Mechanizm ten, wraz ze schematem całego szlaku metabolicznego (rys. 7.27) zostanie przedstawiony później, teraz natomiast zajmiemy się różnymi aspektami represji operonu biosyntezy tryptofanu (operonu *trp*).

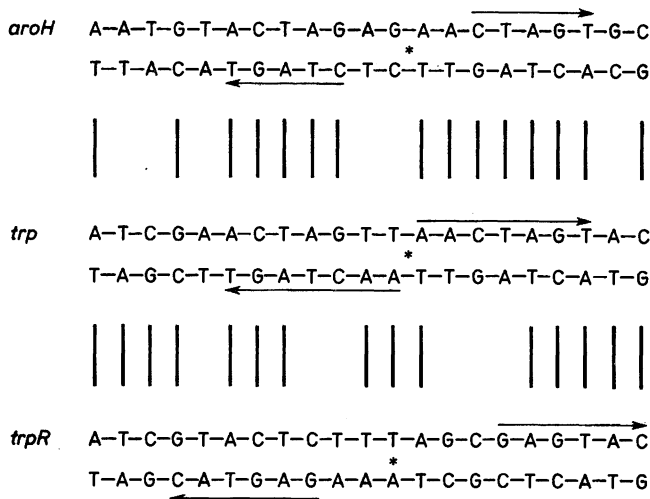
W odróżnieniu od represora Lac, białko represorowe Trp syntetyzowane jest w formie nieaktywnej, zwanej aporepresorem; do jego aktywacji niezbędny jest małowcząsteczkowy korepresor — tryptofan. W efekcie nadmiar tryptofanu blokuje ekspresję operonu *trp* — hamuje syntezę enzymów katalizujących



Rys. 7.10. Represja syntezy enzymów operonu tryptofanowego (kodowanych przez geny *trpE*, *D*, *C*, *B*, *A*) wywołana nadmiarem tryptofanu — końcowego produktu szlaku biosyntezy. Gen *trpR* determinujący syntezę represora jest oddalony od operonu *trp*. Operator *trp* znajduje się wewnątrz sekwencji promotora *trp*. Represor zaktywowany przez tryptofan wiąże się z operatorem, uniemożliwiając transkrypcję operonu

syntezę tryptofanu, co stanowi przykład ujemnego sprzężenia zwrotnego (rys. 7.10).

W odróżnieniu od represora Lac, który działa jedynie na operator operonu laktozowego, represor Trp może wiązać się z trzema rozproszonymi po genomie *E. coli* operatorami, kontrolując w ten sposób trzy nie związane ze sobą geny lub zespoły genów. Oprócz operonu *trp* jest to gen *aroH*, kodujący jeden z trzech enzymów początkowego etapu szlaku biosyntezy aminokwasów aromatycznych. Trzecim jest gen *trpR*, represor Trp bowiem



Rys. 7.11. Sekwencja trzech operatorów rozpoznawanych przez represor Trp. Pionowymi liniami wskazano podobieństwa sekwencji, strzałkami zaznaczono ramiona sekwencji palindromowej

reguluje własną syntezę: gdy znajduje się w nadmiarze hamuje, wiążąc się z operatorem, transkrypcję własnego genu. Ta autoregulacja jest kolejnym przykładem ujemnego sprzężenia zwrotnego. Wymienione trzy operatory wykazują podobieństwo sekwencji i podobną, lecz nieidentyczną symetrię palindromów (rys. 7.11). Widocznie są to cechy wystarczające do wy-

tworzenia specyficznych oddziaływań między białkiem represorowym a sekwencją operatora.

Wymienione operatory mieszczą się wewnątrz odpowiadających im promotorów (*trp*, *aroH*) bądź daleko nań zachodzą (*trpR*); można więc przypuszczać, że w tych przypadkach wiązanie represora uniemożliwia dostęp polimerazy RNA do promotora. Należy tu jednak wspomnieć, że w innych operonach znane są przypadki lokalizacji operatorów w dużej odległości od promotora. Bywa i tak, że do represji niezbędne jest współdziałanie dwu (i więcej) operatorów, niekoniecznie położonych obok siebie: represory związane z tymi operatorami muszą oddziaływać na siebie bezpośrednio. Gdy operatory oddalone są od siebie, fragment DNA, znajdujący się między nimi, tworzy pętlę.

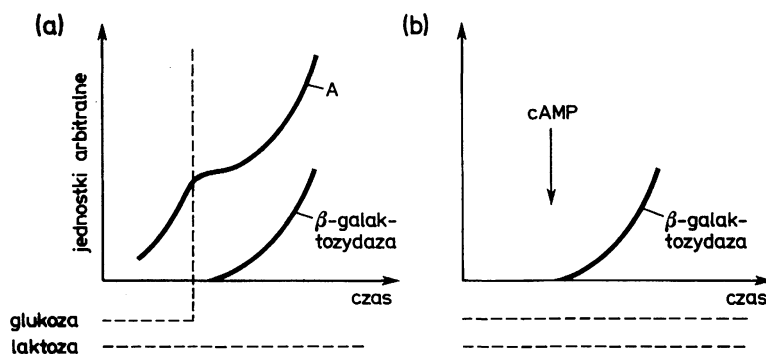
Indukcja operonu laktozowego i represja operonu tryptofanu są przykładami kontroli (regulacji) negatywnej. Geny pod kontrolą negatywną ulegają ekspresji, póki nie zostaną wyłączone przez białko represorowe. Generalnie: białko represorowe albo wiąże się z DNA, by uniemożliwić polimerazie RNA inicjację transkrypcji, albo wiąże się z mRNA, by uniemożliwić rybosomowi inicjację translacji. Operony pod kontrolą negatywną dzielimy na te, które ulegają indukcji i na te, które ulegają represji — w zależności od ich odpowiedzi na małowcząsteczkowe efekторы: induktory i korepresory.

Geny znajdujące się pod kontrolą pozytywną ulegają ekspresji dopiero pod wpływem działania aktywnego białka regulatorowego, które może wiązać się z DNA lub z polimerazą RNA. Jako przykład regulatorów pozytywnych mogą służyć podjednostki σ , decydujące o selekcji promotorów przez polimerazę RNA, oraz białka antyterminacyjne, zmieniające zdolność rozpoznawania terminatorów transkrypcji przez ten enzym. Przykładem regulacji pozytywnej jest również aktywacja kompleksu promotor-polimeraza RNA operonów katabolicznych, związana z tzw. represją glukozową lub kataboliczną.

7.8. Represja kataboliczna

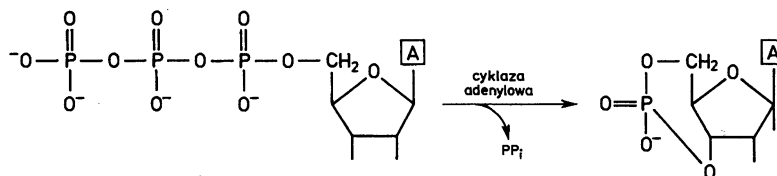
Przedstawiony uprzednio model indukcji operonu laktozowego (rys. 7.5) wyjaśnia zachowanie się komórek *E. coli*, gdy źródłem węgla jest laktoza zamiast źródła standardowego, jakim jest glukoza. Jeżeli jednak laktoza występuje obok glukozy, to do indukcji β -galaktozydazy dochodzi dopiero po wyczerpaniu całej glukozy z pożywki (rys. 7.12(a)). A więc istnieje jakiś mechanizm, dzięki któremu glukoza nie dopuszcza do indukcji operonu *lac* przez β -galaktozyd; stąd nazwa — represja glukozowa. Represji glukozowej podlega, oprócz operonu *lac*, wiele innych operonów katabolicznych, np. operony galaktozy czy arabinozy. Stąd ogólna nazwa opisanego zjawiska — represja kataboliczna.

Okazało się, że do indukcji, oprócz induktora — β -galaktozydu, niezbędny jest cAMP (rys. 7.12(b)), którego stężenie w komórce wzrasta, gdy brak glukozy doprowadza do stanu głodu węglowego. Być może, aktywacja związa-



Rys. 7.12. Represja glukozowa. (a) Glukoza nie dopuszcza do indukcji β -galaktozydazy. Po wyczerpaniu glukozy z pożywki wzrost bakterii (mierzony jako przyrost absorbancji A) zostaje na krótko zahamowany. Dopiero teraz dochodzi do indukcji β -galaktozydazy. Po adaptacji bakterii do nowego źródła węgla zwiększa się znów szybkość wzrostu. (b) Pomimo równoczesnej obecności glukozy i laktozy w pożywce dodanie cyklicznego AMP (10^{-2} – 10^{-3} M) wywołuje indukcję β -galaktozydazy, co wskazuje, że cAMP jest efektem represji glukozowej

nej z błoną komórkową cykazy adenyłowej wywołana jest ustaniem transportu glukozy do wnętrza komórki. Enzym ten, kodowany przez gen *cya*, katalizuje powstawanie cyklicznego AMP z ATP (rys. 7.13).



Rys. 7.13. Katalizowane przez cykazy adenyłową przekształcanie ATP w cykliczny AMP, alarmon głodu węglowego

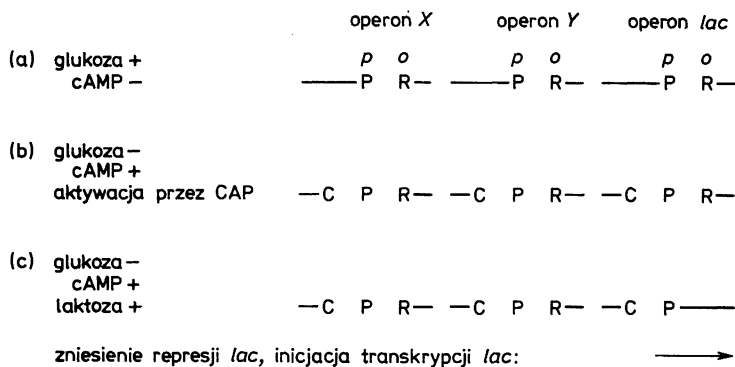
cAMP należy do klasy alarmonów — sygnałów alarmowych dla komórki. Pojęcie to wprowadził do biologii molekularnej Bruce Ames z Uniwersytetu Kalifornijskiego w Berkeley. Jednym z pierwszych poznanych alarmonów jest ppGpp, informujący komórkę o stanie głodu aminokwasowego. Cykliczny AMP jest alarmonem głodu węglowego. Cząsteczka ta aktywuje białko regulatorowe, znane jako CAP (ang. catabolite activator protein) lub CRP (ang. cyclic AMP receptor protein), kodowane przez gen *crp*. Oczywiście mutanty *cya* i *crp* wylamują się spod represji katabolicznej.

Białko CAP składa się z dwu identycznych podjednostek; po związaniu cząsteczki cAMP przyłącza się do swoistej sekwencji palindromowej w pobliżu promotora (operon *lac*), zachodząc nań (operon *gal*) lub w pewnym oddaleniu od promotora (w kierunku przeciwnym transkrypcji, operon *ara*). W pierwszych dwu przypadkach CAP może kontaktować się bezpośrednio z polimerazą RNA, związaną z promotorem, w ostatnim do kontaktu dochodzić może przez dodatkowe białko regulatorowe.

Promotory zależne od CAP wykazują liczne odstępstwa od kanonicznej sekwencji silnego promotora *E. coli*. Żaden z nich nie zawiera sekwencji –35 zbliżonej do sekwencji najwyższej zgodności, a u niektórych to dotyczy również sekwencji –10. Obecność CAP zwiększa zdolność polimerazy RNA do inicjacji transkrypcji z tych ułomnych promotorów. Istnieją dwa modele funkcjonowania CAP. Według jednego z nich białko to stwarza dodatkowe miejsce wiązania polimerazy RNA: enzym ten wiązałby się więc i z sekwencją promotorową, i z białkiem CAP. Drugi model zakłada, że CAP działa wyłącznie na skutek wiązania się z DNA. Być może w promotorach zależnych od CAP sama polimeraza RNA nie jest zdolna do rozwinięcia dwuniciowej struktury DNA i wytworzenia kompleksu otwartego. Za tym modelem przemawiają doświadczenia wykazujące, że CAP powoduje silne zagięcie DNA w miejscu wiązania. Zagięciu DNA z reguły towarzyszy pewne rozwinięcie struktury dwuniciowej, które może się przenosić wzdłuż cząsteczki DNA.

Operon laktozowy, podobnie jak inne operony kataboliczne, podlega równocześnie regulacji negatywnej — przez oddziaływanie represor—operator i regulacji pozytywnej — przez oddziaływanie CAP z kompleksem promotor—polimeraza RNA. Alarm głodu węglowego stawia w stan pogotowia wszystkie operony kataboliczne. Jeżeli w środowisku pojawi się określone źródło węgla (np. laktoza), to swoisty dla niego operon (w tym przypadku *lac*) ulega indukcji (rys. 7.14).

Wykorzystanie źródeł węgla i energii ze środowiska jest procesem o niezwykle złożonej regulacji, składającej się z wielu mechanizmów, poza represją



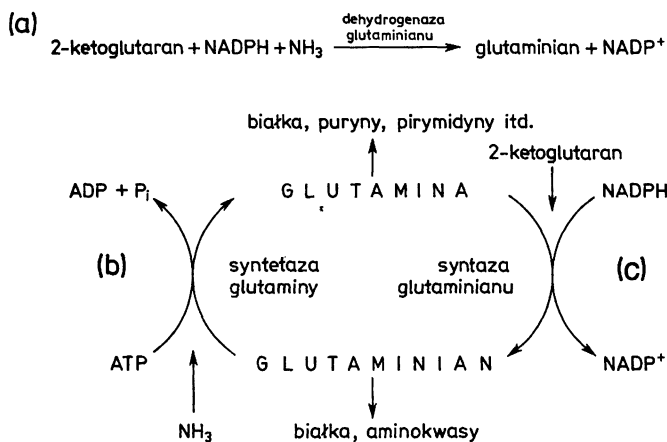
Rys. 7.14. Funkcjonowanie dwu nakładających się na siebie regulacji operonów katabolicznych: pozytywnej (CAP) o małej swoistości i wybitnie swoistej regulacji negatywnej (represor Lac) w warunkach zbliżonych do panujących w środowisku naturalnym. P — polimeraza RNA; R — represor; C — aktywne białko CAP; *p* — promotor; *o* — operator. (a) W obecności glukozy operony kataboliczne X, Y i *lac* nie funkcjonują. Operatory zablokowane są swoistymi dla nich represorami; przyjęto, że tak, jak w przypadku operonu *lac*, z promotorami operonów X i Y związane są cząsteczki polimerazy RNA. (b) Po wyczerpaniu glukozy w komórce pojawia się cAMP; zaktywowane białko CAP wiąże się ze swoistą sekwencją (w przedstawionych przypadkach w pobliżu promotora), stawiając wszystkie operony w stan pogotowia. (c) W środowisku pojawia się laktoza; dochodzi do inaktywacji represora *lac* i inicjacji transkrypcji — wyłącznie w operonie *lac*

kataboliczną i funkcjonowaniem systemu cAMP-CAP. Przykładowo, efekt glukozowy — hamujące działanie glukozy na indukowaną syntezę enzymów katabolicznych — funkcjonuje nie tylko przez zmniejszanie stężenia cAMP. Jednym z lepiej poznanych mechanizmów jest wykluczanie induktora — mechanizm, poprzez który glukoza nie dopuszcza do wejścia induktora do komórki. Polega on na przejściowej inaktywacji permeaz przez białko błonowe III^{Glc} — przenośnik fosforanów w systemie pobierania i fosforylacji glukozy. Przy braku glukozy białko to występuje w formie ufosforylowanej, która nie przeszkadza w funkcjonowaniu permeaz. Zachowanie się operonów regulonu cAMP-CAP nie może być w pełni wyjaśnione zmianami stężenia cAMP. Poza tym znane są operony podlegające katabolicznej represji, lecz nie podlegające regulacji przez cAMP-CAP. A więc stosunkowo dobrze poznany regulon cAMP-CAP może być częścią składową nadrzędnego systemu regulacyjnego Cer (ang. carbon and energy), wykorzystania węgla i energii, kontrolującego ekspresję genów (operonów, regulonów) wielu szlaków metabolicznych.

7.9. Regulacja azotowa i enhancery

Enterobakterie, których najlepiej poznаныmi przedstawicielami są *E. coli* i *S. typhimurium*, mogą do swojego wzrostu wykorzystywać różne organiczne lub nieorganiczne źródła azotu. Amoniak, wnioskując z szybkości wzrostu, jest preferowanym źródłem azotu, podobnie jak glukoza jest preferowanym źródłem węgla i energii. Bakterie te mogą asymilować azot z amoniaku w wyniku redukcyjnej aminacji 2-ketoglutaranu, katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianu (rys. 7.15(a)).

Reakcja ta jest jednak nieefektywna (K_m dla NH_3 — ok. 1 mM), przy niskim stężeniu NH_3 . Asymilacja azotu wymaga więc zwiększenia ekspresji wielu operonów metabolizmu azotowego, zwanych operonami *ntr* (ang. nitro-

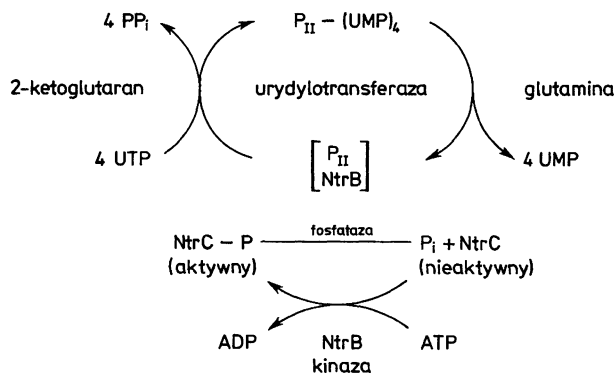


Rys. 7.15. Asymilacja NH_3 zachodząca przy jego wysokich (a) i niskich (b), (c) stężeniach

gen-regulated). Białkowe produkty tych operonów ułatwiają najpierw asymilację, przy niskich stężeniach NH_3 , opisanym szlakiem z udziałem syntetazy glutaminy i syntazy glutaminianu (rys. 7.15(b)), a potem umożliwiają wykorzystanie alternatywnych źródeł azotu.

Jeżeli amoniaku jest po dostatkim, zarówno reakcja (a), jak i reakcja (c) prowadzą do powstania glutaminianu. Przy niskich stężeniach NH_3 reakcja (a) nie może zachodzić: syntetaza glutaminy (b) jest jedynym enzymem przyczyniającym się do asymilacji amoniaku, a syntaza glutaminianu (c) — jedynym enzymem powodującym wytwarzanie glutaminianu. Jeżeli wzrost komórek jest ograniczony dostępnością NH_3 , syntetaza glutaminy, kodowana przez gen *glnA*, pełni dwie funkcje: syntezy glutaminy i asymilacji NH_3 .

Jeżeli stężenie NH_3 spada poniżej 1 mmol/dm^3 , wzrasta stężenie 2-ketoglutaranu, bo reakcja (a) nie zachodzi, a obniża się stężenie glutaminy, ze względu na jej małą podaż w reakcji (b) i znaczne zużycie w reakcji (c). Stanowi to sygnał uruchamiający kaskadę enzymatyczną (rys. 7.16), której efektem jest



Rys. 7.16. Stosunek stężeń 2-ketoglutaran/glutamina reguluje aktywność białka NtrC, które w formie fosforylowanej — NtrC-P — aktywuje transkrypcję genu syntetazy glutaminy, *glnA*. Przy wysokim stężeniu 2-ketoglutaranu kinaza NtrB fosforyluje NtrC. Przy wysokim stężeniu glutamina białko NtrC-P ulega inaktywacji pod wpływem fosfatazy $\text{P}_{\text{II}}-\text{NtrB}$

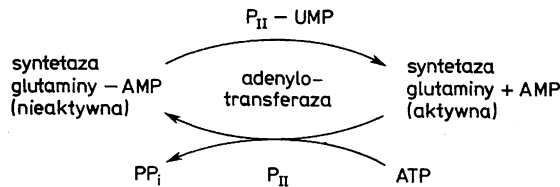
aktywacja, przez fosforylację, białka NtrC (zwanego też NR_1 , kodowanego przez *ntrC = glnG*), które z kolei aktywuje transkrypcję genu syntetazy glutaminy *glnA*. 2-ketoglutaran aktywuje urydylotransferazę (kodowaną przez *glnD*), przenoszącą reszty urydyłowe na białko P_{II} (produkt genu *glnB*) i powoduje jego dysocjację od enzymu NtrB. Proces ten wyzwala aktywność kinazy NtrB, fosforylującej (i przez to aktywującej) białko NtrC.

Jeżeli stężenie NH_3 w środowisku wzrasta, stosunek 2-ketoglutaran/glutamina zmienia się na korzyść glutaminy, co wywołuje usunięcie reszt urydyłowych z białka P_{II} i wytworzenie kompleksu $\text{P}_{\text{II}}-\text{NtrB}$ o aktywności fosfatazy, przekształcającej NtrC-P w nieaktywne białko NtrC (rys. 7.16).

Niezależnie od aktywacji transkrypcji genu syntetazy glutaminy, *glnA*, przez NtrC-P , która zostanie opisana później, dochodzi do aktywacji samej

syntetazy. Enzym ten składa się z 12 identycznych podjednostek, z których każda może być adenylowana; adenylacja inaktywuje syntetazę glutaminy.

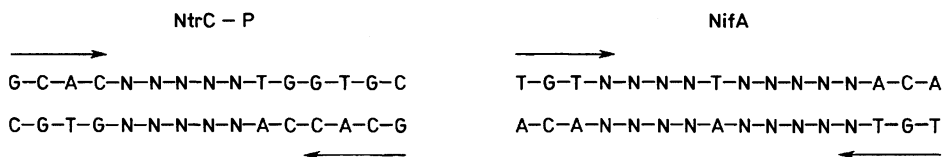
Aktywacja/inaktywacja syntetazy glutaminy katalizowana jest przez adenylotransferazę, której aktywność z kolei jest regulowana przez białko P_{II}. Powstające przy wysokim stężeniu 2-ketoglutaranu białko P_{II}-UMP (rys. 7.16) stymuluje reakcję prowadzącą do aktywnej formy syntetazy glutaminy nie zawierającej grup adenylowych, a białko P_{II} stymuluje inaktywację tego enzymu (rys. 7.17).



Rys. 7.17. Zmiany aktywności adenylotransferazy pod wpływem P_{II}-UMP, bądź P_{II}. W pierwszym przypadku następuje aktywacja, w drugim — inaktywacja syntetazy glutaminy, enzymu składającego się z 12 identycznych podjednostek, z których każda może ulec adenylacji

Białko NtrC-P aktywuje transkrypcję z promotorów *ntr*, katalizowaną przez polimerazę RNA zawierającą podjednostkę σ^{54} (gen *rpoN* = = *glnF* = *ntrA*). Promotory *ntr* wykazują całkowicie odmienną strukturę od pozostałych promotorów *E. coli* (tab. 7.1). Niewielka z początku liczba cząsteczek NtrC-P w komórce wystarcza jedynie do aktywacji transkrypcji operonu *glnALG*, który wyróżnia się dużą liczbą sekwencji wiążących NtrC-P, enhancerów (funkcjonowanie enhancerów — sekwencji wzmacniających transkrypcję — zostanie opisane później). Następuje wzrost poziomu syntetazy glutaminy (*glnA*) oraz białek NtrB (*glnL*) i NtrC (*glnG*). Jeżeli komórkowe stężenie NtrC staje się wysokie, aktywacji mogą ulec promotory *ntr* zawierające tylko jedną sekwencję enhancerową.

Ważną grupą operonów należących do regulonu *ntr* są operony systemu Nif (ang. nitrogen fixation), odpowiedzialne za wiązanie azotu cząsteczkowego (atmosferycznego). Operony *nif* występują u bakterii wolno żyjących, takich jak pokrewna *E. coli* bakteria *K. pneumoniae*, symbiotycznych (*Rhizobium* sp.) oraz asocjacyjnych (np. *Azospirillum* sp.). System Nif składa się z 7 operonów, których geny kodują enzymy wiązania azotu i z operonu *nifLA*, którego geny

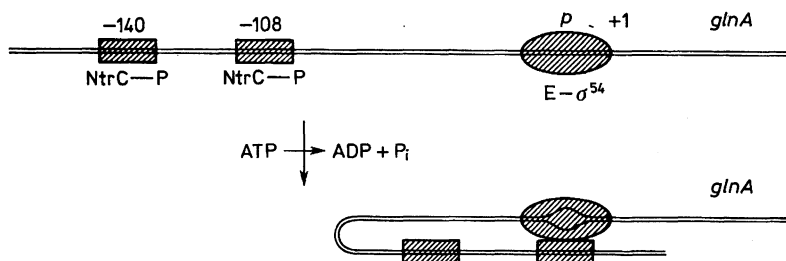


Rys. 7.18. Sekwencje nukleotydowe (enhancery) wiążące białka NtrC-P i NifA, aktywujące transkrypcję w metabolizmie azotu. Strzałkami zaznaczono ramiona sekwencji palindromowej

regulują transkrypcję tych 7 operonów. Transkrypcja operonu *nifLA* jest aktywowana przez białko NtrC-P, z kolei produkt genu *nifA* aktywuje transkrypcję innych operonów *nif*. Produkt genu *nifL* inaktywuje białko regulatorowe NifA w odpowiedzi na obecność tlenu i amoniaku, sprawiając, że 7 operonów *nif* może ulegać transkrypcji tylko w warunkach anaerobiozy i przy braku amoniaku. Białko NifA spełnia podobną rolę co NtrC, a sekwencje nukleotydowe wiążące to białko pełnią rolę enhancerów (rys. 7.18).

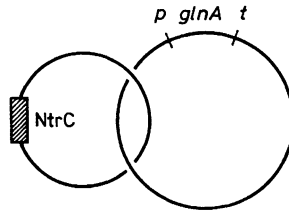
Jedynie centralne domeny tych dwu białek wykazują podobieństwo sekwencji aminokwasowej. Przypuszcza się, że jest to związane z ich oddziaływaniem z podjednostką σ^{54} ; dla NtrC-P wykazano, że domena ta jest odpowiedzialna również za wiązanie ATP i aktywność ATPazy.

Enhancery transkrypcji, wykryte najpierw w organizmach eukariotycznych, zdefiniowano pierwotnie jako sekwencje DNA zlokalizowane w dużej odległości od regulowanego promotora w kierunku zgodnym z transkrypcją lub przeciwnym, w dowolnej orientacji, funkcjonujące „w *cis*”. Obecnie wiadomo, że są to miejsca wiążące białka regulujące pozytywnie lub negatywnie transkrypcję, które mogą działać na promotor zlokalizowany w innej części DNA, a więc „w *trans*”. Działanie enhancerów bakteryjnych zostało dobrze poznane dzięki badaniom, w których stosowano oczyszczone białka i ściśle zdefiniowany DNA substratowy. Najlepiej zbadany jest układ aktywacji transkrypcji genu *glnA*, który koduje syntetazę glutaminy, przez NtrC-P (rys. 7.19).



Rys. 7.19. Promotor (*p*) polimerazy RNA $E-\sigma^{54}$ *S. typhimurium* dla genu syntetazy glutaminy, *glnA*, poprzedzony jest dwoma enhancerami, -108 i -140, wiążącymi białko NtrC-P. Wytworzenie otwartego kompleksu promotor-polimeraza RNA wymaga zmiany konformacyjnej tego enzymu (kosztem hydrolizy ATP) wywołanej bezpośrednim oddziaływaniem NtrC-P

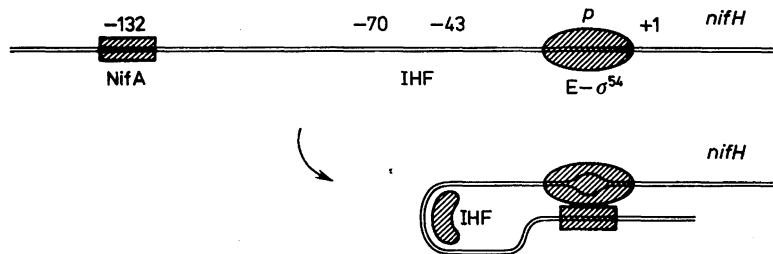
Najpierw wykazano, że białko NtrC-P może aktywować transkrypcję, gdy sekwencja enhancerowa została umieszczona, metodami inżynierii genetycznej, w odległości kilku tysięcy par zasad od promotora *glnA* w kierunku zgodnym lub niezgodnym z kierunkiem transkrypcji. Następnie używając oczyszczonych białek, NtrC-P i polimerazy RNA z podjednostką σ^{54} , wykazano, że NtrC-P może aktywować transkrypcję, gdy enhancer znajduje się na jednej (kolistej) części DNA, a promotor *glnA* na drugiej, jeśli tylko te dwie koliste części DNA są utrzymywane w bliskości przez katenację (rys. 7.20), a więc tak jak dwa ogniwa łańcucha. Doświadczenie to wykluczyło możliwość przeno-



Rys. 7.20. Katenat (dwa kółka łańcucha), składający się z plazmidu zawierającego enhancer wiążący białko NtrC i z plazmidu zawierającego gen syntetazy glutaminy — *glnA*, wraz z promotorem (*p*) i terminatorem (*t*) transkrypcji. W układzie tym dochodzi do aktywacji transkrypcji genu *glnA* przez białko NtrC. Po dekatencji (rozdzieleniu dwóch ogniw łańcucha) aktywacja staje się niemożliwa

szenia się zmian strukturalnych wzdłuż DNA od enhancera do promotora. Wyniki te świadczą, że istotne jest tu utrzymywanie kompleksu enhancer–NtrC przez kompleks promotor–polimeraza RNA „na postronku” (ang. tether), którym jest długi fragment DNA dzielący te miejsca. Mechanizm ten zwiększa częstość interakcji między NtrC i polimerazą. Białko NtrC kontaktuje się z polimerazą bezpośrednio ze swojego odległego miejsca enhancerowego, tworząc widoczną w mikroskopie elektronowym pętlę DNA, i wywołuje przejście kompleksu promotor–polimeraza RNA z formy zamkniętej do otwartej z równoczesną hydrolizą ATP. Nieaktywne białko NtrC, chociaż wiąże się z enhancerem, nie ma aktywności ATPazy i dopiero jego fosforylacja (do NtrC–P) aktywność tę wyzwala.

Homolog NtrC, białko NifA, katalizuje wytwarzanie kompleksu otwartego m.in. w promotorze *nifHDK* *Klebsiella pneumoniae*, kodującego nitrogenazę, kompleks enzymatyczny katalizujący wiązanie i redukcję N_2 do NH_3 . W tym przypadku enhancer musi być umieszczony przed promotorem; między tymi dwoma sekwencjami występuje sekwencja wiążąca IHF (ang. integration host factor), białko wywołujące silne zagięcie podwójnej nici DNA (rys. 7.21). Zgięcie DNA, wywołane wiązaniem IHF, zwiększa stężenie NifA w pobliżu promotora.



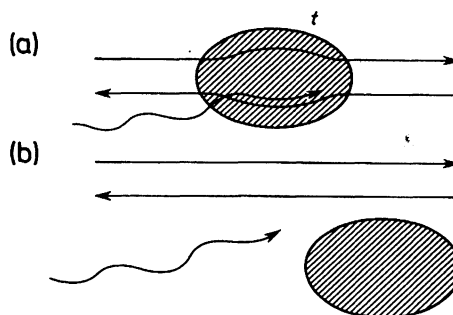
Rys. 7.21. Promotor (*p*) polimerazy RNA $E-\sigma^{54}$ *Klebsiella pneumoniae* dla operonu *nifHDK*, kodującego nitrogenazę, poprzedzony jest enhancerem w pozycji –132, wiążącym białko NifA. Między promotorem i enhancerem znajduje się sekwencja (od –43 do –70) wiążąca białko IHF, które wywołuje zagięcie dwuniciowego DNA, co ułatwia bezpośredni kontakt NifA–polimeraza RNA. Efektem tego oddziaływania jest wytworzenie otwartego kompleksu promotor–polimeraza RNA

Chociaż podjednostka σ^{54} została wykryta jako czynnik niezbędny do transkrypcji genów *ntr*, wiadomo obecnie, że jest także wykorzystywana do transkrypcji genów spełniających różnorodne funkcje w wielu gatunkach bakterii. W każdym z tych przypadków wykryto zależność transkrypcji od białka aktywatorowego, działającego podobnie jak NtrC, czy NifA. Każde z nich umożliwia transkrypcję w odpowiedzi na określony sygnał fizjologiczny lub środowiskowy. Wszystkie te aktywatory mają domenę homologiczną do centralnej domeny białka NtrC (oddziaływanie z σ^{54} , wiązanie ATP), a więc prawdopodobnie aktywność ATPazy jest istotna dla ich funkcjonowania. W wielu przypadkach istotną rolę odgrywa białko IHF.

7.10. Terminatory

Terminacja transkrypcji zachodzi w ściśle zdefiniowanym miejscu DNA, zwanym terminatorem (rys. 7.22). Uczestniczą w niej specyficzne białka, jak NusA i Rho. Polimeraza RNA ($\alpha_2\beta\beta'$ NusA) przestaje przesuwać się wzdłuż DNA i przyłączać nukleotydy do wydłużanego końca 3'. Dysocjacji kompleksu DNA–RNA–polimeraza RNA towarzyszy przywrócenie pierwotnej struktury DNA.

Rys. 7.22. (a) Polimeraza RNA (zaciemniony owal) przesuwa się z lewa na prawo wzdłuż dwuniciowego DNA, wywołując przejściowe rozplecenie heliksu (topnienie) w miejscu syntezy RNA (linia falista). (b) Po osiągnięciu sekwencji terminatorowej (*t*) następuje dysocjacja kompleksu DNA–RNA–polimeraza RNA



Ze względu na możliwość działania rybonukleaz koniec 3' wyizolowanego z komórki RNA nie zawsze jest efektem terminacji. Ustalenie miejsca inicjacji transkrypcji jest łatwiejsze, ponieważ występuje tam naturalny wyznacznik — reszta trifosforanowa na końcu 5'. W celu ustalenia miejsca terminacji niezbędna jest rekonstrukcja tego procesu *in vitro* z elementów możliwie jak najlepiej oczyszczonych od nukleaz. Oparcie się wyłącznie na wynikach doświadczeń *in vitro* może jednak doprowadzić do fałszywych wniosków, ze względu na trudność odtworzenia środowiska wewnątrzkomórkowego; na terminację *in vitro* wywiera wpływ wiele czynników, a z nich najważniejszym jest siła jonowa buforu. Dopiero gdy oba kierunki doświadczenia doprowadzają do tego samego wyniku, można z dużą dozą prawdopodobieństwa określić miejsce terminacji transkrypcji.

Terminatory transkrypcji pełnią trzy ważne funkcje w ekspresji genów.

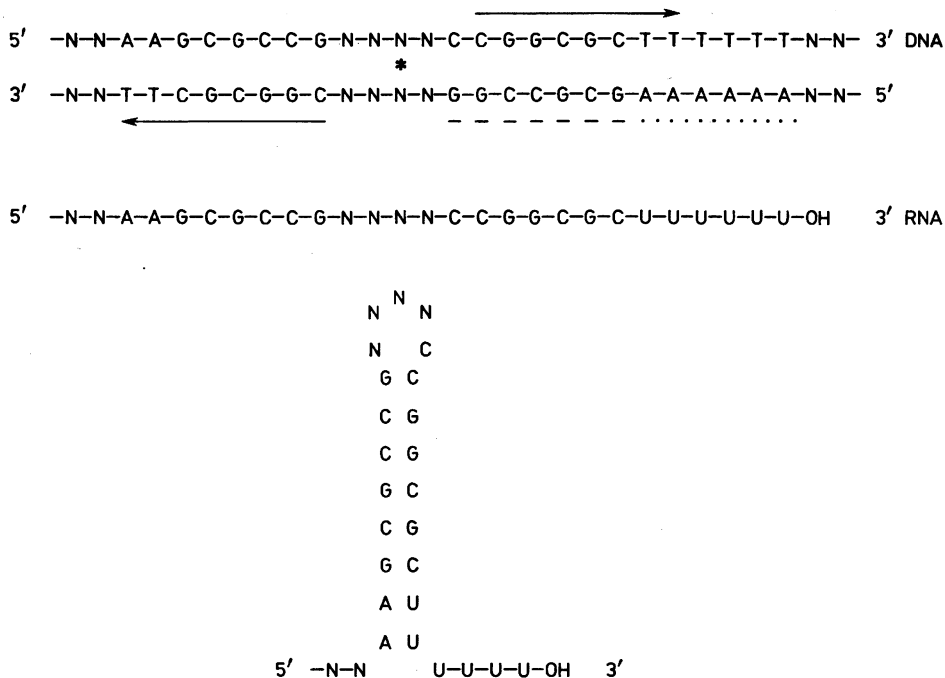
1) Stanowią sygnał, który wyznacza koniec jednostki transkrypcyjnej — genu, czy zespołu genów. Terminatory operonów są istotnymi elementami organizacji genów, ponieważ pozwalają na całkowicie niezależną ekspresję sąsiadujących ze sobą fragmentów DNA.

2) Mogą występować między genami znajdującymi się pod kontrolą tego samego promotora, gdzie służą do regulacji poziomu ekspresji genów wewnątrz operonu. Terminatory w rejonie między promotorem a pierwszym genem operonu służą do regulacji poziomu ekspresji całego operonu (atenuacja).

3) Mogą występować również wewnątrz genów. Terminatory wewnątrzgenowe funkcjonują jedynie wtedy, gdy znika sprzężenie między translacją a transkrypcją w wyniku zmiany mutacyjnej genu, bądź w wyniku stresu metabolicznego, jakim jest np. głód aminokwasowy. Terminatory te przerywają syntezę mRNA, który nie może już być wykorzystany w translacji.

W bakteriach *E. coli* występują dwa molekularne mechanizmy terminacji transkrypcji. W jednym z nich cząsteczka RNA uwalnia się spontanicznie, gdy polimeraza RNA dotrze do określonej sekwencji nukleotydowej, w drugim niezbędne jest działanie czynnika uwalniającego RNA — białka Rho. Transkrypcja jest reakcją niezwykle procesywną — polimeraza RNA wraz ze świeżo zsyntetyzowanym fragmentem RNA jest bardzo stabilnie związana z matrycowym DNA. Jednak w przypadku niektórych sekwencji nukleotydowych stabilność ta zostaje zmniejszona do poziomu, w którym kompleks ten ulega rozpadowi. Te samodzielnie działające terminatory składają się z ok. 40 par zasad DNA. Na początku występuje fragment bogaty w pary G—C, stanowiący element sekwencji palindromowej, a przy końcu — ok. 6 reszt deoksyadenozyny w łańcuchu transkrybowanym (rys. 7.23). Uwolnienie RNA następuje w momencie, gdy transkrypcja dobiega końca tej sekwencji. Końcowa sekwencja nukleotydowa RNA może wytwarzać strukturę „szpilki do włosów” (ang. hairpin).

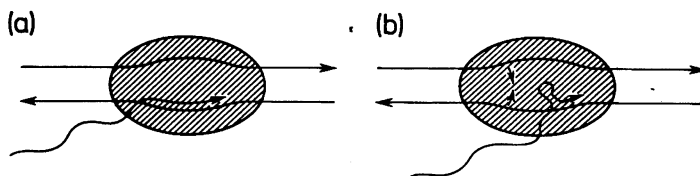
Mutacje punktowe i delecyjne, zmieniające strukturę terminatora, wpływają na jego funkcjonowanie, co świadczy o tym, że oba elementy: wytwarzanie struktury „szpilki do włosów” przez RNA oraz końcowa sekwencja poli-U odgrywają istotną rolę w terminacji. Uwolnienie transkryptu z powstającego hybrydu DNA—RNA polega prawdopodobnie na konkurencji energetycznie korzystniejszej struktury RNA—RNA, tworzącej się w postaci „szpilki do włosów” (rys. 7.23 i rys. 7.24(b)). Jednocześnie występuje tendencja do odtworzenia wyjściowej struktury DNA wewnątrz kompleksu — przez reasocjację komplementarnych nici DNA. Być może, te właśnie procesy wywołują zwolnienie biegu, a nawet zatrzymanie się polimerazy RNA. Czas trwania tego spoczynku wynosi ok. 60 s w przypadku typowego terminatora. Zatrzymanie się polimerazy RNA umożliwia terminację, dla której istotnym sygnałem jest łańcuch reszt urydynowych. Spośród wszystkich hybrydów RNA—DNA, hybryd składający się z par rU—dA wymaga najmniej energii do dysocjacji na łańcuchy składowe. A zatem bogate w pary A—T rejonu DNA odgrywają istotną rolę nie tylko w inicjacji transkrypcji, lecz i w jej terminacji niezależnej



Rys. 7.23. Struktura terminatora transkrypcji niezależnego od czynnika Rho. Po fragmencie bogatym w pary GC (podkreślenie linią przerywaną) następuje 6 reszt deoksyadenozyny (podkreślenie linią kropkowaną) w transkrybowanym łańcuchu DNA. Oba te fragmenty stanowią ramiona sekwencji palindromowej (strzałki); jej środek zaznaczono gwiazdką. Poniżej przedstawiono transkrypt po terminacji, z wolną grupą hydroksylową w pozycji 3'. RNA ten wykazuje silną tendencję do wytwarzania struktury drugorzędowej w postaci „szpilki do włosów”. Środek pętli odpowiada środkowi sekwencji palindromowej

od białka Rho. Być może, zmiany kompleksu wywołane reasocjacją komplementarnych nici DNA, przedstawione na rysunku 7.24, odgrywają również rolę w jego rozpadzie.

Samodzielnie działające (niezależne od Rho) terminatory występują na końcach jednostek transkrypcji, w miejscach kontrolnych między genami i w większości atenuatorów; jest więc oczywiste, że wystarczają do pełnienia tej funkcji. Tym niemniej, u *E. coli* występują także terminatory wymagające

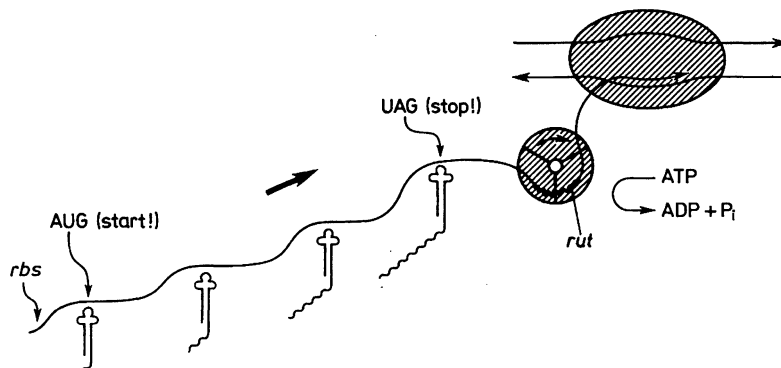


Rys. 7.24. Struktura kompleksu DNA-RNA-polimeraza RNA tuż przed terminacją (a) i w trakcie terminacji (b). Wytwarzanie energetycznie preferowanej struktury RNA-RNA, „szpilki do włosów”, sprzyja reasocjacji komplementarnych nici DNA (strzałki). Pozostający krótki hybryd, składający się z par rU-dA łatwo ulega dysocjacji

współdziałania białka Rho. Można je znaleźć tam, gdzie występują terminatory niezależne od Rho, ale — jak się wydaje — funkcjonują one przede wszystkim jako terminatory wewnętrzne.

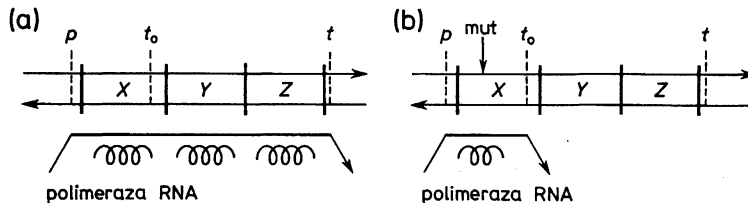
Białko Rho, zbudowane z 6 identycznych podjednostek, przypomina swoją budową pierścień składający się z 3 dimerów. Bierze ono udział w terminacji przez współdziałanie ze świeżo zsyntetyzowanym RNA w reakcji napędzanej przez hydrolizę ATP. Białko Rho wiąże się ze specyficznym miejscem RNA, zwanym *rut* (ang. rho utilisation), w którym rozpoczyna ono swoją translatację wzdłuż RNA w kierunku końca 3' (rys. 7.25).

W ostatecznym efekcie działanie białka Rho usuwa polimerazę RNA (prawdopodobnie przez zmianę jej konformacji) z miejsca przez nią zajmowanego w kompleksie z DNA, uniemożliwiając dalszą elongację RNA. W warunkach *in vitro* białko Rho tworzy z polimerazą RNA kompleks, który, jak się wydaje, nie jest artefaktem. Fenotyp odpowiadający pewnym mutacjom *missense* w genie *rho* ulega supresji (powraca do stanu pierwotnego) przez niektóre mutacje genu *rpoB*, kodującego podjednostkę β polimerazy RNA. Sugeruje to powstawanie kompleksu składającego się z obu tych białek *in vivo*: w wyniku ich wzajemnych oddziaływań allosterycznych dochodzi do przywrócenia naturalnej konformacji białka Rho. Miejsca *rut* nie wykazują podobieństwa sekwencji, są natomiast bogate w reszty cytydyny, a ubogie w reszty guanozyny, co decyduje o braku struktur drugorzędowych. W normalnych warunkach szybkość



Rys. 7.25. Hipotetyczny mechanizm działania białka Rho, ATPazy zależnej od RNA, biorącej udział w terminacji transkrypcji. Rybosomy (nie uwidocznione na schemacie) przyłączają się do mRNA w miejscu *rbs* (ang. ribosome binding site) i, przemieszczając się w kierunku 5'→3' (gruba strzałka), rozpoczynają syntezę łańcucha polipeptydowego od kodonu „start!” (AUG; formylometionina). Na rysunku zaznaczono przedłużające się łańcuchy polipeptydowe związane z cząsteczkami tRNA. Do terminacji translacji i do dysocjacji rybosomów dochodzi przy kodonie „stop!” (UAG; amber). Białko Rho ma więc dostęp do mRNA dopiero na odcinku od UAG do końca 3'. Wiąże się ono z miejscem *rut* i, wykorzystując energię hydrolizy ATP, przesuwa się w kierunku 5'→3', być może przez obrót pierścienia i „nawijanie” RNA. Białko Rho, po dotarciu do polimerazy RNA, zmienia jej konformację, doprowadzając do terminacji transkrypcji

translacji odpowiada ściśle szybkości elongacji transkrypty, w związku z tym polimeraza RNA jest oddzielona od najbliższego rybosomu bardzo krótkim odcinkiem RNA. Warunki przestrzenne uniemożliwiają więc dostęp heksameru Rho do miejsca *rut*. Przesuwanie się rybosomu wzdłuż RNA może zostać zahamowane w wyniku pojawienia się kodonu terminacji translacji (np. kodonu *amber* UAG) lub ze względu na brak aminoacylo-tRNA, odpowiadającego kolejnemu kodonowi (głód aminokwasowy). W tych warunkach odcinek RNA dzielący zatrzymany w swoim biegu rybosom od kontynuującej swój bieg polimerazy RNA ulega przedłużeniu, zezwalając na wejście do akcji białka Rho (rys. 7.25). Działanie białka Rho jest więc uzależnione od dostępności fragmentu RNA zawierającego miejsce *rut*, nie zajętego przez rybosomy. To wyjaśnia możliwość współdziałania białka Rho z terminatorami znajdującymi się na końcu operonów (sekwencja wolna od rybosomów), a także niefunkcjonalność terminatorów wewnątrzgenowych, które podczas normalnej translacji zajęte są przez rybosomy. Należy podkreślić, że wśród zależnych od Rho terminatorów



Rys. 7.26. Polarność mutacji wywołana obecnością wewnątrzgenowego, zależnego od Rho terminatora. (a) Polimeraza RNA, po związaniu się z promotorem *p*, transkrybuje geny operonu *X*, *Y* i *Z*, po czym odłącza się, gdy osiągnie terminator *t*. Wewnątrzgenowy terminator t_0 nie funkcjonuje, gdyż pierwszy rybosom przesuwa się wzdłuż mRNA tuż za polimerazą RNA: brak wolnego od rybosomów fragmentu RNA, niezbędnego do funkcjonowania białka Rho. W wyniku translacji powstają białka (przedstawione jako spiralki) kodowane przez wyżej wymienione geny. (b) Rybosomy zatrzymują się na nonsensownym kodonie *amber*, powstałym w wyniku mutagenезy w miejscu zaznaczonym *mut*; pojawia się więc wolny od rybosomów fragment mRNA, zdolny do przyłączenia białka Rho. Białko to „dogania” polimerazę RNA, wywołując dysocjację kompleksu DNA–RNA–polimeraza RNA w miejscu t_0 . W wyniku translacji powstaje jedynie N-terminalny fragment białka determinowanego przez gen *X*, który najczęściej ulega degradacji

nie znaleziono żadnego podobieństwa sekwencji, ani nawet sekwencji bogatych w pary A–T, co różni te terminatory od terminatorów niezależnych od Rho.

Występowanie terminatorów wewnątrzgenowych tłumaczy znane od dawna zjawisko polarności mutacji. Otóż zdarza się od czasu do czasu, że mutacja nonsensowna w jednym z genów operonu nie tylko unieczynnia ten gen, lecz również uniemożliwia lub zmniejsza ekspresję tych genów operonu, które są położone dalej, zgodnie z kierunkiem transkrypcji (ang. downstream). Dzieje się to wtedy, gdy mutacja ta pojawia się w odpowiedniej odległości przed wewnątrzgenowym terminatorem (rys. 7.26). Rybosom zatrzymuje się wtedy

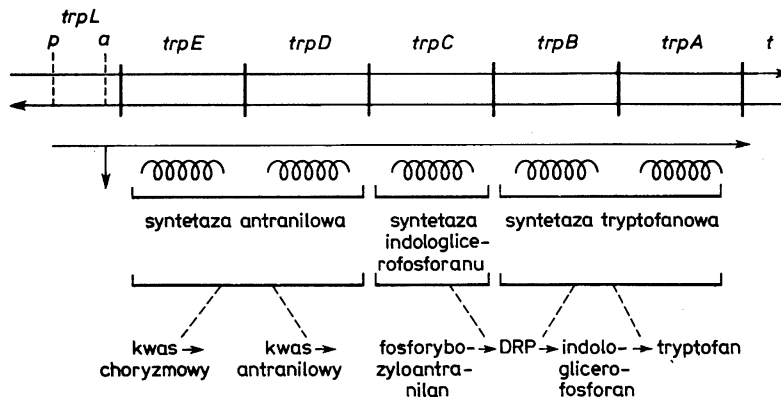
na nonsensownym kodonie RNA, wskutek czego pojawia się wolny od rybosomów RNA, umożliwiając przyłączenie białka Rho i przedwczesną terminację transkrypcji.

7.11. Atenuacja

Terminatory transkrypcji, niezależnie od tego, czy wymagają współdziałania Rho, czy nie, wykazują różny stopień efektywności. Jedynie w przypadku niezależnych od Rho terminatorów można to tłumaczyć odstępstwami od kanonicznej sekwencji nukleotydowej „silnego” (efektywnego) terminatora.

Istnieją terminatory, których efektywność jest regulowana w zależności od potrzeb komórki bakteryjnej (atenuacja) czy programu rozwoju wirusa bakteryjnego (antyterminacja). W obu przypadkach zmniejszenie efektywności terminacji umożliwia transkrypcję genów położonych za terminatorem, zgodnie z kierunkiem biegu polimerazy RNA. A więc kontrola ekspresji genów odbywać się może nie tylko przez inicjację transkrypcji, lecz również na etapie jej terminacji.

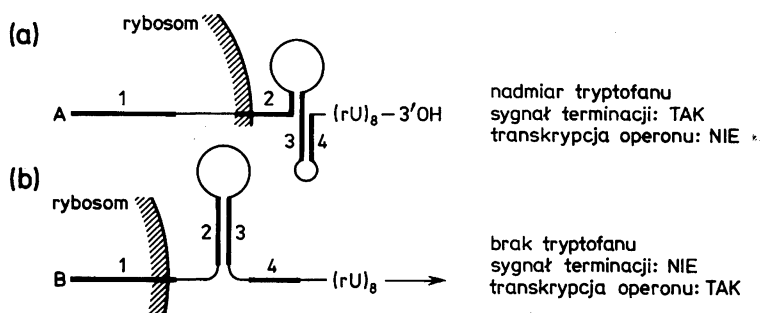
Wiele operonów biosyntezy aminokwasów podlega regulacji przez atenuację, mechanizm, który uzależnia syntezę aminokwasu od zniesienia sygnału terminacji dla polimerazy RNA. Niezależny od Rho terminator, zwany atenuatorem, znajduje się między promotorem a zespołem genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy aminokwasu (rys. 7.27). Istotą tego mechanizmu kontrolnego jest dostosowanie syntezy aminokwasu do wewnątrzkomórkowego stężenia



Rys. 7.27. Operon biosyntezy tryptofanu, składający się z 5 genów strukturalnych: *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, *trpA*, determinujących syntezę 3 syntetaz: antranilowej, indologlicerofosforanu i tryptofanowej. Przy zapotrzebowaniu na tryptofan polimeraza RNA transkrybuje cały operon, od promotora *p* do terminatora *t*. Natomiast przy nadmiarze tryptofanu dochodzi do przedwczesnej terminacji (atenuacji) w „warunkowym” terminatorze, czyli atenuatorze *a*. Część operonu zawarta między promotorem a pierwszym genem strukturalnym, zawierająca atenuator, to rejon liderowy (ang. leader), *trpL*

nia aminoacylo-tRNA: gdy aminoacylo-tRNA jest dostępny, synteza ulega zahamowaniu, lecz gdy aminoacylo-tRNA zostanie zużyty, synteza aminokwasu będzie wznowiona.

Rozwiązanie zagadki molekularnego mechanizmu atenuacji jest w dużej mierze zasługą Charlesa Yanofsky'ego z Uniwersytetu Stanforda. Punktem wyjścia była obserwacja, że w tzw. rejonie liderowym, zawartym między promotorem a pierwszym genem strukturalnym każdego operonu, występują tandemowo co najmniej dwa kodony dla tego aminokwasu, którego syntezie dany operon służy. A więc w rejonie liderowym operonu syntezy tryptofanu *trpL* występują obok siebie dwa kodony tryptofanowe UGG. W rejonie wiodącym operonu histydyny jest aż siedem kodonów histydyny. Wysłano więc hipotezę, że mRNA rejonu liderowego ulega translacji i że — gdy brak tryptofanylo-tRNA — zatrzymanie rybosomu na kodonach tryptofanowych pozwala tej części mRNA, która się przed nim znajduje, na wytworzenie struktury drugorzędowej uniemożliwiającej powstanie „szpilki do włosów” — sygnału terminacji transkrypcji. Analiza sekwencji nukleotydu rejonu *trpL* wykazała możliwość utworzenia dwu rodzajów struktur drugorzędowych przez odpowiadający temu rejonowi mRNA (rys. 7.28).



Rys. 7.28. Struktury drugorzędowe rejonu liderowego operonu syntezy tryptofanu. W rejonie tym można wyróżnić cztery sekwencje, oznaczone numerami od 1 do 4. O wytworzenie struktury dwuniciowej z sekwencją nr 3 konkurują sekwencje nr 2 i nr 4. (a) Kombinacja 3–4 wytwarza strukturę „szpilki do włosów”, która jest sygnałem terminacji transkrypcji. Do wytworzenia tej struktury dojść może tylko wtedy, gdy sekwencja nr 2 zostaje zablokowana przez rybosom. Dzieje się tak, gdy tryptofan występuje w nadmiarze. (b) Gdy rybosom zostaje zatrzymany na kodonach tryptofanowych (ze względu na brak tryptofanylo-tRNA), sekwencja nr 2 wygrywa we współzawodnictwie o sekwencję nr 3, uniemożliwiając wytworzenie sygnału terminacji. Następuje ekspresja genów operonu tryptofanu

Do tej pory nie udało się wykryć postulowanego „peptydu liderowego”; być może jest on wyjątkowo niestabilny. Analiza mutantów *trpL* (uzyskanych przez mutagenезę ukierunkowaną) o zmienionych możliwościach tworzenia struktur drugorzędowych dowodzi jednak słuszności przedstawionej hipotezy. A zatem attenuator, w odróżnieniu od innych terminatorów, jest elementem regulacji

transkrypcji, a atenuacja — mechanizmem opartym na przedwczesnej terminacji transkrypcji, który pozwala na dostosowanie niektórych procesów biosyntezy do potrzeb komórki.

Tabela 7.2. Efektywność regulacji ekspresji operonu syntezy tryptofanu, mierzona stopniem zmniejszenia transkrypcji tego operonu. Jako układ odniesienia przyjęto maksymalną transkrypcję operonu *trp* przy całkowitym braku tryptofanu w środowisku

	System regulacji ekspresji operonu <i>trp</i>	Efektywność
1	Regulacja inicjacji transkrypcji przez represję	70 ×
2	Regulacja przedwczesnej terminacji transkrypcji	8–10 ×
1 × 2	560–700 ×

W ekspresji operonu syntezy tryptofanu atenuacja nakłada się na regulację inicjacji transkrypcji opartą na represji. Nadmiar tryptofanu, końcowego produktu szlaku metabolicznego, aktywuje swoiste dla niego białko represorowe, które, wiążąc się z sekwencją operatora (wewnątrz promotora *trp*), blokuje inicjację transkrypcji. Jest to więc przykład regulacji w wyniku ujemnego sprzężenia zwrotnego. Z każdym z tych mechanizmów związana jest określona efektywność działania; ich współpraca doprowadza do bardzo wysokiej efektywności (tab. 7.2).

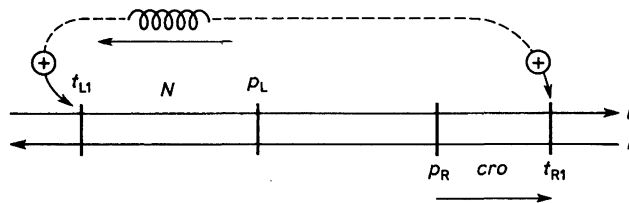
7.12. Antyterminacja

Możliwość zniesienia sygnału terminacji transkrypcji zezwala niektórym fagom w trakcie ich wewnątrzkomórkowego rozwoju na przejście od ekspresji jednego rejonu do ekspresji następnego rejonu DNA. Mechanizm tego procesu, całkowicie różny od atenuacji, nosi nazwę antyterminacji. Jak to opisano wcześniej, niektóre fagi do tego samego celu wykorzystują kontrolę na poziomie inicjacji transkrypcji: kodowane przez faga białka, nowa polimeraza RNA lub nowe podjednostki σ służą do rozpoznawania „późniejszych” fagowych promotorów, różniących się od promotorów „wcześniejszych”. Antyterminacja wymaga określonej organizacji genów: wczesne geny występują w bezpośrednim sąsiedztwie genów, których ekspresja zachodzi później i są od nich odgródzone terminatorem. Zniesienie terminacji transkrypcji powoduje, że polimeraza RNA rozpoczynająca transkrypcję w promotorze genów wczesnych kontynuuje ją w rejonie genów ekspymowanych później. Natomiast regulacja transkrypcji na poziomie inicjacji nie wymaga występowania rejonu genów późniejszych w tandemie z rejonem genów wcześniejszych.

Najlepiej poznano mechanizm antyterminacji w rozwoju faga λ . Ogólny przebieg jest taki, jak dla innych fagów: polimeraza RNA gospodarza transkrybuje wczesne geny, a jedno z białek determinowanych przez ten rejon umożliwia transkrypcję następnego zespołu genów fagowych. U faga λ geny

transkrybowane bezpośrednio po zakażeniu nazywane są najwcześniejszymi (ang. immediate-early), kolejne geny — wczesnymi (ang. early), a te transkrybowane na końcu — późnymi (ang. late). Przejście od pierwszego do drugiego etapu wymaga białka N, kodowanego przez jeden z fagowych genów najwcześniejszych, a przejście od drugiego do trzeciego etapu — białka Q, kodowanego porzez jeden z fagowych genów wczesnych. Występuje tu więc kaskada ekspresji genów, chyba pierwsza tak dobrze zbadana w historii genetyki molekularnej. Każde z tych białek regulatorowych N i Q funkcjonuje w swoistej dlań antyterminacji, stanowiąc element kontroli pozytywnej: ich mutacyjna inaktywacja blokuje przejście od wcześniejszego do późniejszego etapu transkrypcji; są to oczywiście mutacje letalne dla faga.

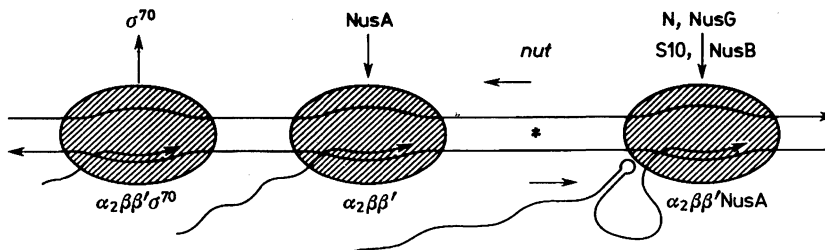
Poniżej przedstawiono mechanizm antyterminacji. Geny rejonu najwcześniejszego *N* i *cro* oddzielone są od rejonów wczesnych zależnymi od Rho



Rys. 7.29. Transkrypcja rejonu najwcześniejszego faga λ . Nić DNA faga λ transkrybowana w lewo nazywa się *l*, w prawo — *r*. Pozostałe objaśnienia są w tekście

terminatorami. Polimeraza RNA *E. coli* wiąże się z dwoma promotorami, p_L i p_R (ang. Left i Right) i transkrybuje geny *N* i *cro*, aż do terminatorów, odpowiednio t_{L1} i t_{R1} . Białko N działa tak, że polimeraza RNA już nie rozpoznaje sygnałów terminacji w miejscach t_{L1} i t_{R1} (rys. 7.29).

Wkrótce po inicjacji transkrypcji podjednostka σ^{70} spontanicznie oddysocjuje od polimerazy RNA *E. coli*. Enzym ten w trakcie elongacji wiąże białko NusA, niezbędne dla terminacji, a także dla przyłączania białek antyterminacyjnych. Powstanie kompleksu antyterminacyjnego zawierającego białko



Rys. 7.30. Przekształcanie kompleksu elongacyjno-terminacyjnego $\alpha_2\beta\beta'$ NusA w kompleks elongacyjno-antyterminacyjny podczas „najwcześniejszej” transkrypcji DNA faga λ . Proces może zajść dopiero po transkrypcji sekwencji *nut*; istotną rolę w przyłączeniu fagowego białka N i bakteryjnych białek NusB, NusG i S10 odgrywa mRNA *nut* o strukturze „szpilki do włosów”

N może nastąpić dopiero po transkrypcji miejsca *nut* (ang. N utilisation), zawierającego sekwencję palindromową. Wszystko wskazuje na to, że fragment *nut* mRNA, tworzący strukturę „szpilki do włosów” odgrywa zasadniczą rolę w tym procesie. Po związaniu fagowego białka N i mRNA *nut*, z polimerazą RNA wiążą się bakteryjne białka: NusB, NusG i S10; ostatnie zaliczane jest do białek rybosomalnych (rys. 7.30). Kompleks polimerazy RNA z wymienionymi pięcioma białkami elongacji transkrypcji jest niewrażliwy na działanie białka Rho i nie zatrzymuje się na zależnych od Rho terminatorach; tak dochodzi do transkrypcji rejonu wczesnego.

W obecności fagowego białka antyterminatorowego N terminacja transkrypcji w zależnych od Rho terminatorach bakteryjnych zachodzi normalnie. Jednak, jeżeli gen bakteryjny z zależnym od Rho terminatorem zostanie włączony metodami inżynierii genetycznej do rejonu wczesnej transkrypcji faga λ , to białko N wywoła antyterminację. Najprawdopodobniej brak odpowiednio zlokalizowanych miejsc *nut* w chromosomie bakteryjnym jest przyczyną niezachodzenia N-antyterminacji.

Białko N jest niestabilne (czas połowicznego rozpadu wynosi 5 min), lecz nie przeszkadza to w jego funkcjonowaniu, ponieważ transkrypcja i translacja genu *N* zachodzi tuż przed jego działaniem „w *cis*” po transkrypcji miejsca *nut*. Transkrypcja z wczesnych promotorów p_L i p_R jest zbędna, a nawet szkodliwa w późniejszym okresie rozwoju faga λ ; m.in. wtedy powinien powstać nowy kompleks antyterminacyjny, zawierający białko Q. W tym aspekcie niestabilność białka N jest uzasadniona.

7.13. Uwagi końcowe

W przedstawionym opisie struktury i funkcjonowania genów organizmów prokariotycznych zajęto się przede wszystkim transkrypcją DNA i regulacją tego procesu, kluczowego dla przekazywania informacji genetycznej od DNA do białka. Należy jednak wspomnieć o tym, że transkrypcja bierze udział w regulacji dwu pozostałych „wielkich” procesów biologii molekularnej — replikacji DNA i translacji — u tych jednokomórkowych organizmów. Transkrypcja rozplata heliks DNA *E. coli* w celu umieszczenia białkowego kompleksu replikacyjnego między komplementarnymi niciami DNA w miejscu inicjacji replikacji. Być może, to właśnie ta „transkrypcyjna aktywacja *ori* replikacji” pośredniczy w przekazywaniu nie zdefiniowanego jeszcze sygnału inicjacji replikacji, który powstaje na określonym etapie cyklu komórkowego. W regulacji translacji z kolei istotną rolę odgrywa niekiedy „antisense RNA”, który, wytwarzając strukturę drugorzędową z komplementarnym fragmentem mRNA, uniemożliwia funkcjonowanie tego mRNA w translacji. Podane przykłady powiązania transkrypcji z replikacją i translacją są dogodnym modelem do badania analogicznych procesów zachodzących w organizmach eukariotycznych. W miarę postępu badań coraz częściej zdarza się, że zjawiska

„zarezerwowane” dla eukariontów można wykryć u prokariotów. W tym kontekście należy wymienić obecność intronu w genie syntetazy tymidylanowej faga *T4* i jego wycinanie w komórce *E. coli*, a także syntezę DNA na matrycy RNA (odwrotna transkrypcja) prowadzącą do powstawania msDNA (ang. multicopy single stranded) u *Myxococcus xanthus* i *E. coli*. W celu zapoznania się z tymi problemami, a także pogłębienia i uaktualnienia wiedzy zawartej w poszczególnych podrozdziałach odsyłamy czytelnika do drugiego wydania monografii „*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology”, F.C. Neidhardt, J. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H. Umbarger, ASM, Washington, D.C.

8. STRUKTURA I DZIAŁANIE GENÓW EUKARIOTYCZNYCH

U *Eukaryota* regulacja działania genów różni się pod dwoma podstawowymi względami od regulacji działania genów u bakterii. Po pierwsze, *Eukaryota* mają jądro komórkowe, co, powodując oddzielenie procesu transkrypcji i translacji, wprowadza dodatkowe możliwości regulacji działania genów, np. przez regulację eksportu mRNA z jądra. Po drugie, większość *Eukaryota* to organizmy wielokomórkowe, u których dla danej komórki nie jest konieczne włączanie wszystkich możliwych genów. Niektóre muszą być czynne zawsze, inne tylko w danym momencie życia komórki (np. w konkretnym stadium rozwoju), jeszcze inne muszą być włączane zawsze po zadziałaniu odpowiedniego bodźca, np. hormonu czy szoku cieplnego. Co więcej, w trakcie rozwoju pewne geny są wyłączone w sposób nieodwracalny. Dotychczas nie bardzo wiadomo, jak komórki eukariotyczne dają sobie z tym radę. Na pewno duże znaczenie ma struktura chromatyny, omówiona w rozdziale 3. W tym rozdziale omówione będą poziomy, na których może być regulowane działanie genów, z wyjątkiem translacji, która jest omówiona w rozdziale 5.

Pierwszym etapem w ekspresji genu jest transkrypcja. U *Eukaryota* istnieją trzy polimerazy RNA, odpowiedzialne za syntezę stabilnych klas RNA (polimeraza I i III) oraz za syntezę cząsteczek RNA kodujących białka (polimeraza II). Podstawowym problemem jest wiązanie polimerazy z DNA, żadna z eukariotycznych polimeraz sama z DNA się nie wiąże i potrzebne są dodatkowe czynniki białkowe, zwane czynnikami transkrypcyjnymi, które umożliwiają polimerazie związanie się z DNA i rozpoczęcie transkrypcji. Cała istota regulacji działania genu opiera się na obecności i interakcjach tych czynników transkrypcyjnych. Ich obecność i aktywność zależy od stanu fizjologicznego komórki, od jej otoczenia, od jej przeszłości i od wielu innych parametrów, tak że podjęcie decyzji „włączyć gen” czy „wyłączyć gen” nie jest sprawą łatwą.

Po zajęciu transkrypcji RNA ulega przemianom. W większości genów kodujących białka, a także w wielu genach kodujących stabilne klasy RNA

(tRNA) u *Eukaryota* obszary kodujące produkt genu przerywane są przez sekwencje niekodujące — introny, które są usuwane w procesie składania transkryptu. Geny takie, zwane genami nieciągłymi, z bardzo nielicznymi wyjątkami nie występują u bakterii. Usuwanie intronów — to kolejny etap regulacji działania genu, ponieważ dla niektórych transkryptów istnieje możliwość wytworzenia kilku rodzajów mRNA. Regulowane są także dalsze etapy — wychodzenie transkryptu z jądra do cytoplazmy, jego stabilność, translacja i stabilność ostatecznego produktu — białka.

8.1. W komórkach *Eukaryota* trzy różne rodzaje polimeraz RNA przeprowadzają transkrypcję

W odróżnieniu od bakterii, u których występuje jedna polimeraza RNA, przeprowadzająca transkrypcję wszystkich genów (choć nie zawsze z tą samą podjednostką σ), w komórkach eukariontów obecne są trzy różne polimerazy RNA, zwane I, II i III. Transkrybują one odrębne klasy genów, a rozróżniane są na podstawie wrażliwości na truciznę — α -amanitynę (tab. 8.1). Najbardziej wrażliwa jest polimeraza II, najmniej — I, a polimeraza III wykazuje właściwości pośrednie.

Tabela 8.1. Polimerazy RNA u *Eukaryota*

Nazwa	Produkty transkrypcji	Wrażliwość na α -amanitynę
Polimeraza I	5.8S, 18S i 26S rRNA	—
Polimeraza II	białka, snRNA	+
Polimeraza III	5S rRNA, tRNA, snRNA 7SL RNA	+ ±

Dotychczas nie jest ustalona dokładna budowa polimeraz eukariotycznych. Każda składa się z dwóch dużych podjednostek (masa powyżej 100 kDa) i ok. 8 mniejszych; duże podjednostki są odrębne dla każdego rodzaju polimerazy, natomiast część małych jest wspólna dla pewnych klas. Największa podjednostka polimeraz ma homologię do podjednostki β' -polimerazy bakteryjnej. W polimerazie II na C-końcu największego białka znajduje się sekwencja heptapeptydu Ser—Pro—Ser—Tyr—Ser—Pro—Tre powtórzona kilkadziesiąt razy (np. 26 razy u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, 40 razy u *Drosophila melanogaster*), która jest niezbędna dla działania enzymu.

8.2. Polimerazy RNA wiążą się z DNA tylko w obecności dodatkowych czynników transkrypcyjnych

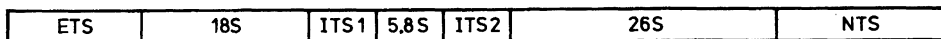
Wspólną cechą dla wszystkich trzech polimeraz *Eukaryota* jest to, że żadna z nich nie potrafi łączyć się z DNA sama, wszystkie wymagają do tego dodatkowych czynników, zwanych czynnikami transkrypcyjnymi. Czynniki te

noszą różne nazwy, ale na ogół stosowana jest ujednolicona nomenklatura, gdzie każdy czynnik oznacza się symbolem TF (ang. transcription factor), następnie jest liczba I, II lub III, mówiąca, z którą polimerazą czynnik ten współdziała i duża litera (A, B, C itp.) określająca dany czynnik. Na przykład TFIID — to czynnik transkrypcyjny dla polimerazy II, a TFIIIA — to czynnik transkrypcyjny dla polimerazy III, który bierze udział wyłącznie w transkrypcji genów kodujących 5S rRNA.

Ostatnio nazewnictwo czynników transkrypcyjnych uległa pewnej komplikacji, ponieważ okazało się, że większość czynników z grupy IIF składa się z wielu białek, które w miarę jak zostają uzyskiwane w formie czystej otrzymują własne nazwy.

8.3. Polimeraza I odpowiedzialna jest za syntezę trzech klas rRNA

W skład rybosomów *Eukaryota* wchodzi 4 klasy rRNA — 26S, 18S, 5.8S i 5S rRNA. Geny kodujące 5S rRNA transkrybowane są przez polimerazę III, natomiast geny kodujące trzy pozostałe klasy rRNA tworzą wspólną jednostkę transkrypcyjną, zbudowaną tak jak to przedstawiono na rysunku 8.1. U większości *Eukaryota* jednostki te są tandemowo powtórzone w genomie. Obszar inicjacji

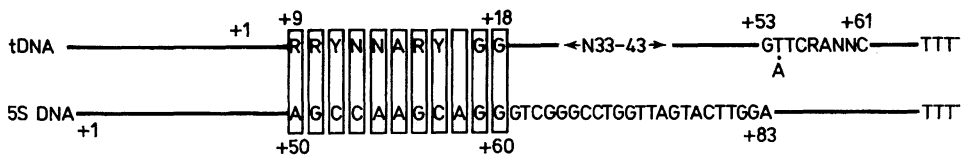


Rys. 8.1. Organizacja genów rRNA — tzw. jednostka powtarzająca się, złożona z sekwencji odpowiadających 18S, 5.8S i 26S rRNA. Pierwotny transkrypt zawiera sekwencje poprzedzające gen 18S rRNA, krótki odcinek za 3'-końcem genu 26S rRNA i oczywiście sekwencje trzech rRNA oraz dwie krótkie sekwencje położone między nimi (ITS i ITS2). Część jednostki powtarzającej nie ulega transkrypcji (NTS). Pierwotny transkrypt jest przerabiany na trzy dojrzałe w jąderku

transkrypcji poprzedza sekwencję genu 18S rRNA. Produktem transkrypcji jest cząsteczka zwana pre-rRNA, zawierająca trzy klasy rRNA połączone ze sobą we wspólnym transkrypcie, z którego następnie są odcinane fragmenty położone przed końcem 5' 18S rRNA i za końcem 3' 26S rRNA oraz wycinane są regiony położone między sekwencjami poszczególnych rRNA. Proces ten zachodzi w jąderku i bierze w nim udział kompleks enzymów oraz kwas rybonukleinowy — tzw. U3 snRNA. U niektórych organizmów (*Tetrahymena*, *Physarum*) w genach kodujących 26S rRNA obecne są introny, które muszą ulec wycięciu.

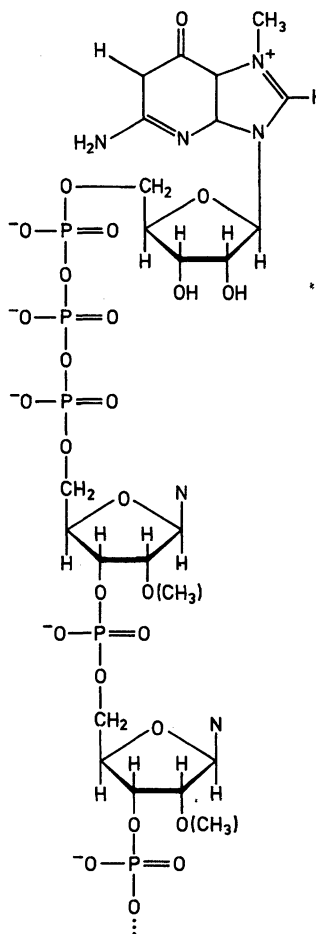
8.4. Polimeraza III RNA syntetyzuje wiele klas małych RNA

Polimeraza III odpowiedzialna jest za transkrypcję wielu genów, których produktami są małe cząsteczki RNA. Są to m. in. geny kodujące tRNA (ok. 75 nukleotydów), 5S rRNA (120 nukleotydów) i wiele innych RNA, w tym również kodowanych przez niektóre wirusy.



Rys. 8.2. Sekwencje zachowawcze w obrębie promotora genów 5S rRNA i tRNA. Zaznaczono homologię między pierwszym blokiem promotora genów tRNA i promotorem genów 5S rRNA. R — puryna, Y — pirymidyna, N — dowolny nukleotydy. +1 oznacza pierwszy nukleotydy transkryptu

Sensacją było stwierdzenie, że promotor polimerazy III jest dla genów 5S rRNA i tRNA położony w ośrodku samego genu (rys. 8.2). Dla genu 5S był to obszar od 50 do 80 nukleotydy, a dla genów tRNA dwa obszary — od 9 do 20 i od 50 do 70 nukleotydy. W przypadku genów tRNA odległość między dwoma blokami mogła być zmieniana o ok. 30 nukleotydy bez wpływu na transkrypcję, a dwa konserwowane bloki odpowiadały konserwowanym pętłom tRNA (rys. 8.3).



Rys. 8.3. Struktura czapeczki na 5'-końcu eukariotycznych mRNA i hnRNA. Końcowy nukleotydy połączony jest z 5'-końcem mRNA za pomocą wiązania 5'-5'. Ryboza następnego nukleotydy, a czasem także i drugiego, ulega metylacji

Do transkrypcji genów tRNA niezbędne są dwa czynniki transkrypcyjne TFIIB i TFIIC, do syntezy 5S rRNA wymagany jest dodatkowo czynnik TFIIA.

Polimeraza III odpowiedzialna jest także za syntezę innych małych cząsteczek RNA, w tym U6 snRNA, który bierze udział w procesie wycinania intronów. Promotor dla genów U6 snRNA ma inną budowę niż wyżej opisane promotory dla polimerazy III. Położony jest w kierunku 5' genu i nie obejmuje sekwencji kodujących.

8.5. Geny kodujące białka są transkrybowane przez polimerazę II

Przyпуска się, że w genomach ssaków jest ok. 50 000 genów, olbrzymia większość z nich koduje białka. Są one transkrybowane przez polimerazę II, która również jest odpowiedzialna za syntezę wielu małych RNA i snRNA, wchodzących w skład kompleksu, który usuwa introny z pierwotnych transkryptów. Charakterystyczną strukturą dla wszystkich transkryptów syntetyzowanych przez polimerazę II jest tzw. czapeczka (cap), czyli guanozynotrifosforan (GTP) przyłączony na końcu 5' powstającego RNA za pomocą wiązania 5'—5'. Tylko niektóre klasy RNA, syntetyzowane przez inne polimerazy, mają czapeczkę (np. U6 snRNA); ma ona jednak inną budowę.

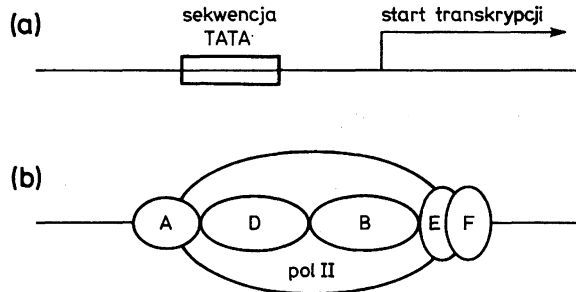
Polimeraza II do rozpoczęcia transkrypcji wymaga dwóch grup czynników. Pierwsza grupa to czynniki TFII (A, B, D, E i F), wiele z tych czynników składa się z białek i współdziała jeszcze z dodatkowymi białkami. Geny kodujące wiele składników tych czynników zostały już sklonowane i niektóre wykazują podobieństwo do bakteryjnego czynnika σ . Czynniki te są niezbędne do związania polimerazy RNA, ale wydaje się, że nie regulują aktywności genów. Funkcje regulatorowe pełni druga, bardzo duża grupa czynników, która będzie omówiona poniżej.

8.6. Promotory dla polimerazy II składają się z wielu sekwencji, z którymi wiążą się czynniki transkrypcyjne

Promotor dla polimerazy II — to przylegający do miejsca startu transkrypcji obszar regulatorowy, wiążący różne czynniki transkrypcyjne. Obejmuje on od kilkudziesięciu do ok. 200 nukleotydów, a z sekwencjami mogą wiązać się różne czynniki. W regionie tym poza sekwencją TATA (–30) dość często występuje w –80 sekwencja CAAT. Na transkrypcję wpływają także inne obszary, położone poza obszarem promotora, zwane sekwencjami wzmacniającymi (enhancerami).

Dla większości genów do przyłączenia polimerazy II do DNA konieczna jest sekwencja TATA, położona w pozycji –30 w stosunku do pierwszego

nukleotydu transkrybowanego przez tę polimerazę. Z sekwencją tą wiąże się czynnik TFIID (a dokładnie jego składnik TBP — TATA binding protein), przy czym wiązanie zachodzi jedynie w obecności czynnika TFIIA. Po przyłączeniu TFIID kolejno wiążą się TFIIB, sama polimeraza, a następnie czynniki TFIIE i TFIIIF (rys. 8.4).



Rys. 8.4. Czynniki transkrypcyjne biorące udział w wiązaniu polimerazy II. (a) Odstoniony promotor. (b) Kompleks transkrypcyjny powstający po zawiązaniu kolejno czynnika transkrypcyjnego TFIIA (A), TFIID (D), TFIIB (B), polimerazy RNA (pol II) i czynników TFIIE (E) i TFIIIF (F)

Niedawno wykryto, że TBP jest wspólnym elementem dla wszystkich trzech rodzajów polimeraz RNA i mimo swojej nazwy jest także konieczny do inicjacji transkrypcji z promotorów, w których nie występuje sekwencja TATA.

Regulacja działania genu polega na przyłączaniu się do jego obszarów regulatorowych odpowiednich białek. To, czy dane białka przyłączą się, zależy od ich obecności w danej tkance i od obecności aktywatorów oraz inhibitorów, które wpływają na działanie tych czynników.

8.7. Sekwencje wzmacniające transkrypcję, podobnie jak promotory, wiążą czynniki transkrypcyjne, ale w odróżnieniu od promotorów wpływają na ekspresję niezależnie od swojego położenia i orientacji względem genu

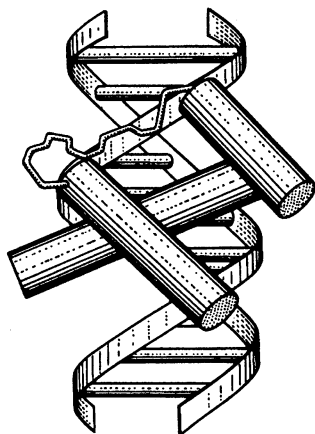
Regulacja działania genów wymaga kooperacji dwóch obszarów — promotorów, wiążących czynniki transkrypcyjne, oraz obszarów, zwanych sekwencjami wzmacniającymi transkrypcję. Niektóre czynniki wiązane przez sekwencje w enhancerach mogą być takie same, jak czynniki wiążące się w promotorach, chociaż nie dotyczy to czynników z grupy TFII. Natomiast o ile promotor musi przylegać do transkrybowanej sekwencji, o tyle sekwencja wzmacniająca może leżeć parę tysięcy par zasad przed genem, za genem, czy nawet w obrębie genu — w jego intronie. Co więcej, jeśli eksperymentalnie odwróci się sekwencję wzmacniającą o 180° w stosunku do genu, nie traci ona swojej funkcji.

Proponowano kilka mechanizmów działania tych sekwencji, obecnie uważa się, że zachodzą bezpośrednie interakcje między czynnikami transkrypcyjnymi związanymi z ehancerem i czynnikami transkrypcyjnymi związanymi z promotorem; w wyniku tych interakcji polimeraza rozpoczyna transkrypcję danego genu.

Warto może dodać, że oprócz sekwencji wzmacniających transkrypcję znane są też sekwencje osłabiające transkrypcję (ang. silencer), które też mogą być położone daleko od genu.

8.8. Czynniki transkrypcyjne mogą być białka o różnej budowie

Struktura wielu czynników transkrypcyjnych jest już dokładnie poznana. Każde z tych białek zawiera co najmniej dwie odrębne domeny — jedna służy do wiązania się z DNA, a druga, zwana obszarem lub domeną aktywującą, służy do interakcji z innymi elementami aparatu transkrypcyjnego (polimerazą czy innymi czynnami transkrypcyjnymi). Obszary te oddzielono od siebie doświadczalnie, konstruując zrekombinowane białka zawierające domenę wiążącą i domenę aktywującą z różnych czynników transkrypcyjnych i stwierdzono, że dany obszar wiążący DNA może współdziałać z różnymi obszarami aktywującym. Zagadnienie to będzie dokładniej omówione w podrozdziale 8.9, na przykładzie czynnika transkrypcyjnego drożdży, zwanego GAL. W wielu znanych czynnikach transkrypcyjnych obszar aktywujący jest tzw. amfipatycznym kwaśnym heliksem, tzn. jest to obszar zawierający kwasowe aminokwasy, które w α -heliksie położone są po jednej stronie. Wydaje się, że obszar ten nie ma jakiegóś specyficznej sekwencji; ważny jest kwasowy charakter. Inne obszary aktywujące zawierają sekwencje poliglutaminowe lub poliprolinowe. Przypuszcza się, że kwasowe obszary aktywujące mogą oddziaływać z zawierającym powtórzony heptapeptyd C-końcem największej podjednostki polimerazy II lub z histonami, albo z czynnikiem TBP.

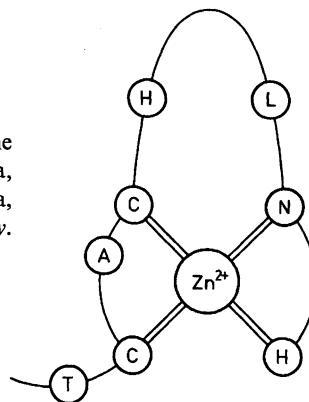


Rys. 8.5. Budowa białka typu heliks-skret-heliks (wg D. Voet i J.G. Voet, *Biochemistry*. John Wiley, 1990 — zmodyf.)

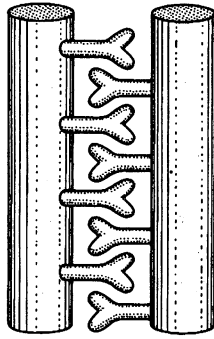
Czynniki transkrypcyjne klasyfikuje się na podstawie budowy domeny wiążącej DNA.

Jedną grupę stanowią białka o strukturze heliks–skręt–heliks (rys. 8.5). Większość białek regulatorowych u bakterii ma właśnie taką strukturę, a u *Eukaryota* występuje on m.in. wśród białek z tzw. domeną homeotyczną, obecną m.in. w wielu produktach genów związanych z regulacją rozwoju u *Drosophila*, a także w innych białkach eukariotycznych z tzw. grupy POU (skrót od pit, oct, unc — p. niżej). Domena homeotyczna składa się z 60 aminokasów i jest silnie konserwowana. Białka z grupy POU zawierają dodatkową niezbędną do wiązania DNA domenę 75 aminokwasów. Do białek z grupy POU należą białka: OCT1, OCT2, UNC86 i PIT1 pełniące funkcje regulatorów transkrypcji u różnych organizmów eukariotycznych, od nicieni do ssaków.

Rys. 8.6. Palec cynkowy. Zaznaczono konserwowane aminokwasy. H — histydyna, C — cysteina, A — asparagina, T — tyrozyna, F — fenyloalanina, L — leucyna (wg D. Voet i J.G. Voet, *Biochemistry*. John Wiley, 1990 — zmodyf.)



Inną grupę stanowią białka zawierające tzw. palce cynkowe, ogólny schemat ich budowy przedstawiono na rysunku 8.6. Pierwszym zbadanym białkiem tego typu był czynnik transkrypcyjny dla polimerazy III RNA, zwany TFIIIA. Specyficzny dla tych białek układ cystein i histydyń pozwala na wytworzenie palców wiążących jony cynku. Do grupy tej należą m.in. białka SP1 i Kruppel. Znane są też białka o palcach cynkowych zawierających tylko cysteinę, np. GATA1 — specyficzny czynnik transkrypcyjny erytroblastów oraz areA, związany z regulacją metabolizmu azotowego u grzyba *Aspergillus nidulans*. Następne dwie grupy czynników transkrypcyjnych stanowią białka wiążące się z DNA tylko w formie dimerów. Fakt ten ma duże znaczenie dla regulacji działania genów, ponieważ mogą powstawać różne rodzaje homodimerów i heterodimerów, co powoduje, że z danej grupy np. czterech mogących tworzyć dimery czynników może powstać 10 różnych dimerów. Sam obszar wiążący jest zasadowy, ale monomeryczne białka nie wiążą się z DNA. Do pierwszej grupy należą czynniki transkrypcyjne fos i jun (analogi czynnika AP1, oba wykryte jako onkogeny retrowirusów) i białko regulatorowe biosyntezy aminokwasów u drożdży GCN4; czynniki te zawierają tzw. suwaki leucynowe (ang. leucine zippers) (rys. 8.7.) W białku występują w regularnych odstępach leucyny,



Rys. 8.7. Suwak leucynowy utworzony przez dwa α -heliksy (wg D. Voet i J.G. Voet, *Biochemistry*. John Wiley, 1990 — zmodyf.)

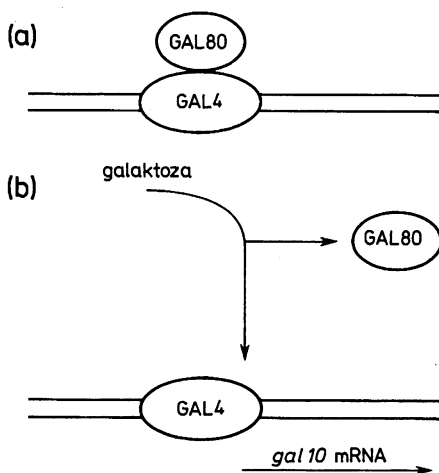
których hydrofobowe reszty tworzą szczebelki, a dwa monomery łączą się ze sobą za pomocą tych szczebelków.

Druga grupa też zawiera białka z obszarami niezbędnymi do dimeryzacji, złożonymi ze struktury dwu heliksów oddzielonych przez pętle, zwane HLH (ang. helix-loop-helix — heliks-pętla-heliks). Do grupy tej należą: białko myoD odpowiedzialne za różnicowanie się mięśni i białka związane z różnicowaniem się układu nerwowego u *Drosophila*.

Niektóre białka aktywujące transkrypcję łączą się nie z DNA, lecz z innymi białkami. Najbardziej znanym białkiem jest czynnik E1A z adenowirusa, który m.in. łączy się z czynnikiem TBP.

8.9. Regulacja niektórych genów została już dobrze poznana

Do zrozumienia mechanizmów regulacji genów u organizmów eukariotycznych szczególnie dużo wniosły prace Struhla i Ptashnego dotyczące systemu regulacji katabolizmu galaktozy i biosyntezy aminokwasów u drożdży.



Rys. 8.8. Regulacja katabolizmu galaktozy u *S. cerevisiae* na przykładzie jednego z genów, *gal10*. Przy braku galaktozy do aktywatora GAL4 przyłącza się białko GAL80 hamujące jego działanie. Obecność galaktozy powoduje odłączenie GAL80 od GAL4 i aktywację transkrypcji *gal10*

Ekspresja genów kodujących enzymy rozkładające galaktozę podlega kontroli dwóch genów regulatorów *GAL4* i *GAL80*. Produktem genu *GAL4* jest „klasyczny” aktywator transkrypcji wiążący się z tzw. sekwencją UAS (ang. upstream activating sequence). Produktem genu *GAL80* jest białko, które wiąże się z aktywatorem, umożliwiając jego działanie. Galaktoza, będąca induktorem tego systemu, uniemożliwia związanie białka *GAL80* z aktywnym *GAL4*, co powoduje przyłączenie białka *GAL4* do UAS i pozwala na rozpoczęcie transkrypcji (rys. 8.8).

Analiza mutacji w obrębie genu *GAL4* pozwoliła na zlokalizowanie trzech domen w kodowanym przez ten gen białku, które odpowiadają za wiązanie się z DNA, wiązanie z białkiem *GAL80* i aktywację transkrypcji. Za pomocą technik inżynierii genetycznej skonstruowano wiele genów hybrydowych, w których fragmenty kodujące poszczególne domeny zastąpiono fragmentami pochodzącymi z innych genów. Na przykład obszar wiążący DNA w białku *GAL4* zastępowano odpowiednią domeną z represora *LexA*¹ z *E. coli*, a UAS przez miejsce wiązania *LexA*. Białko hybrydowe *LexA-GAL4* było zdolne do aktywacji transkrypcji genu leżącego przy miejscu wiązania *LexA*. To znaczy, że do działania domeny aktywującej białka niezbędne jest związanie aktywatora transkrypcji z DNA, ale nie musi to być związane z konkretną sekwencją, skoro obszar wiążący może być zastąpiony przez zupełnie inny.

8.10. Niektóre geny nie podlegają regulacji

Dotychczas opisywano tutaj geny, do działania których niezbędne są kompleksy białek regulatorowych i których promotory obejmują sekwencję ponad 100 nukleotydów; nieomal zawsze zawierają one sekwencję TATA w pozycji –30. Istnieje jednak klasa genów, określana terminem angielskim „housekeeping genes”, oznaczającym geny niezbędne do utrzymania metabolizmu komórkowego, których ekspresja nie podlega regulacji. Do transkrypcji tych genów potrzebna jest tylko bardzo krótka sekwencja (ok. 30 par zasad), przylegająca do miejsca startu transkrypcji, zazwyczaj bogata w GC i zawierająca miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego SP1. W genach tych nie występuje sekwencja TATA. Do grupy tej należą m.in. geny kodujące białka rybosomalne, enzymy cyklu Krebsa itp.

8.11. Geny eukariotyczne są najczęściej nieciągłe

Na początku lat 70. wiadomo było, że w jądrze obecne są duże cząsteczki RNA, zwane hnRNA (ang. heterogeneous nuclear RNA — heterogenny jądrowy RNA), niestabilne i zawierające sekwencje nieobecne w cytoplaz-

¹ Produkt genu *lexA* jest represorem wielu genów u *E. coli*.

matycznym RNA. Podejrzewano, że są one prekursorami mRNA, lecz zależność między hnRNA i mRNA zrozumiano dopiero po wykryciu zjawiska nieciągłości genów.

Zjawisko to wykryto w połowie lat 70. u adenowirusów; wkrótce okazało się, że jest ono raczej regułą niż wyjątkiem u wszystkich eukariontów. Polega ono na obecności w obrębie genów tzw. intronów, czyli sekwencji, które nie kodują ostatecznego produktu genu i są jak gdyby wtrętami w sekwencji kodującej. Niektóre introny w genach kodujących białka obecne są w obszarze przed sekwencją N-końca białka. Sekwencje kodujące nazwano egzonomi.

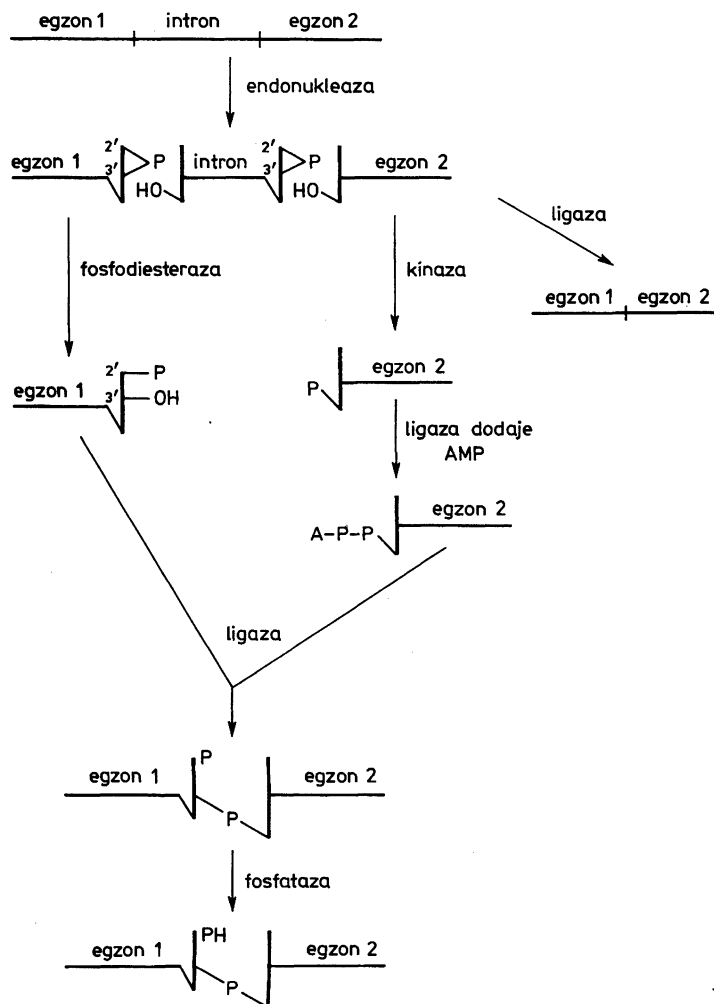
Introny występują zarówno w genach kodujących białka, jak i w genach kodujących tRNA oraz rRNA, zarówno w genomach jądrowych, jak w organellach. Aby powstał funkcjonalny produkt genu (w postaci dojrzałej cząsteczki tRNA, rRNA czy mRNA), konieczne jest wycięcie intronów z pierwotnego transkryptu genu i połączenie ze sobą egzonomów. Proces ten określa się jako składanie RNA (ang. splicing).

8.12. Mechanizmy wycinania intronów

Istnieje kilka różnych mechanizmów wycinania intronów z pierwotnych powstających transkryptów. W genach tRNA introny występują zawsze o jeden nukleotyd za antykodonem i są dość krótkie — 19–60 nukleotydów. Mechanizm ich usuwania z transkryptu został przedstawiony na rysunku 8.9. U ssaków reakcja przeprowadzana jest przez dwa enzymy, jeden z nich rozszczepia wiązania między egzonomi i intronem, drugi zaś łączy ze sobą dwa egzony.

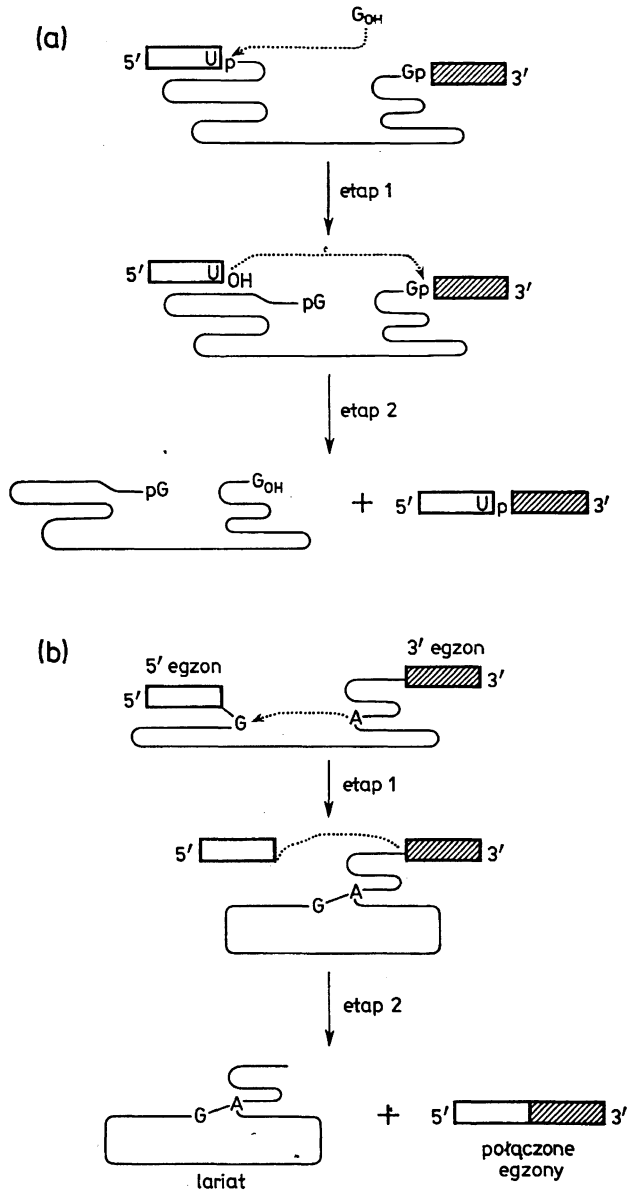
Dla tzw. intronów grupy I — obecnych w niektórych genach 26S rRNA i w wielu genach mitochondrialnych charakterystyczna jest skomplikowana drugorzędowa struktura, która powoduje dość bliskie położenie obu styków intron–egzon. T. Cech i jego współpracownicy wykazali, że do usunięcia *in vitro* jednego z intronów, w genie kodującym 26S rRNA u *Tetrahymena thermophila*, nie są potrzebne jakiegokolwiek białka. Schemat samowycinania tego intronu przedstawiony jest na rysunku 8.10 (a). W podobny sposób ulega wycinaniu wiele intronów obecnych w genach mitochondrialnych. Wydaje się, że mimo iż *in vitro* proces ten przebiega bez udziału białek, *in vivo* w proces ten zaangażowane są białka przyspieszające reakcję.

Inne introny, tzw. klasy II, spotykane w genach mitochondrialnych, są także zdolne do samowycinania, ale według nieco innego schematu (rys. 8.10 (b), podobnego do wycinania intronów z transkryptów genów jądrowych kodujących białka. W obu przypadkach powstaje wiązanie 2'—5' między ostatnim 5'-terminalnym nukleotydem intronu i tzw. miejscem rozgałęzienia w intronie (rys. 8.10 (b) i 8.11). Wycinanie intronów klasy II nie wymaga *in vitro* ani ATP, ani żadnych białek. Introny II grupy mają, podobnie jak introny grupy I, silnie konserwowaną strukturę drugorzędową.

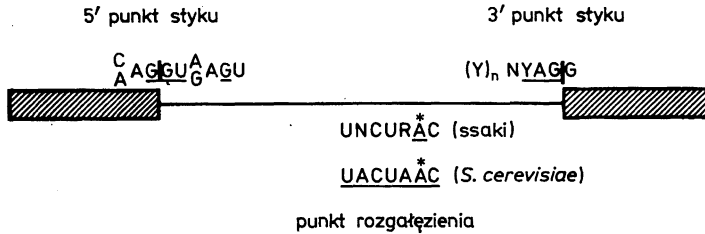


Rys. 8.9. Wycinanie intronów z pierwotnych transkryptów genów tRNA. Pierwszy etap polegający na przecięciu obu styków intron–egzon przebiega tak samo u roślin, drożdży i zwierząt. Taki sam jest też ostateczny wynik, natomiast o ile u zwierząt następuje prosta jednoetapowa religacja obu egzonów, o tyle u roślin i drożdży proces ten przebiega w kilku etapach i wymaga dodatkowo energii z ATP

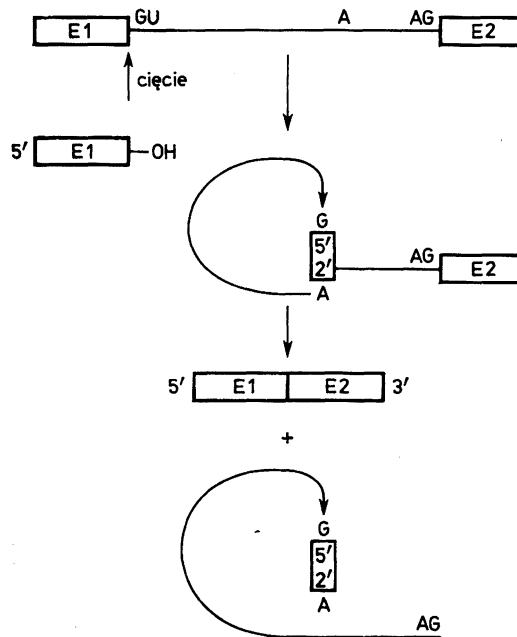
Wycinanie intronów z hnRNA przebiega według schematu podanego na rysunku 8.12, z udziałem wielu małych RNA z grupy snRNA (małe jądrowe RNA) i wielu białek; RNA wraz z białkami tworzą tzw. spliceosom. Wspólne dla wszystkich *Eukaryota* jest zachowanie stałych złączy intron–egzon. Złącze lewe (tzw. donorowe) rozpoznawane jest przez U1 snRNA, miejsce rozgałęzienia przez U2 snRNA. W procesie bierze jeszcze udział kompleks U4/U6 snRNA i U5 snRNA. U wszystkich eukariontów przebieg tego procesu jest podobny — następuje pęknięcie wiązania na styku lewy egzon–intron, następn-



Rys. 8.10. Samowycinanie się intronów grupy I (a) i II (b). W przypadku intronów grupy I potrzebna jest ganozyna lub GTP i w wyniku reakcji uwalniany jest intron w formie liniowej. W przypadku intronów grupy II nie jest konieczna obecność dodatkowych czynników i intron uwalniany jest w formie lasa (lariatu), w którym zaznaczona na rysunku adenozyzna wytwarza oprócz normalnych wiązań dodatkowe wiązanie 2'—5' z pierwszym nukleotydem intronu



Rys. 8.11. Konserwowane sekwencje na stykach intron–egzon, w obrębie intronu u ssaków oraz u drożdży *S. cerevisiae*. Nukleotydy szczególnie silnie konserwowane podkreślono. Odcinek polipirymidynowy położony w pobliżu prawego złącza intron–egzon składający się z kilkunastu pirymidyn występuje tylko u ssaków R — puryna; Y — pirymidyna; N — dowolna zasada

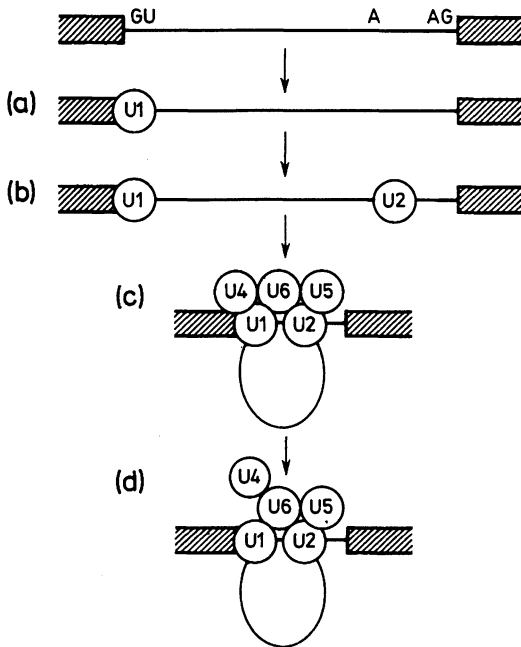


Rys. 8.12. Wycinanie intronu z pre-mRNA. W pierwszym etapie zachodzi (w spliceosomie) przecięcie lewego złącza egzon–intron oraz przyłączenie 5'-końca intronu do punktu rozgałęzienia, którym jest zawsze A. W drugim etapie następuje przecięcie drugiego złącza egzon–intron, uwolnienie intronu i połączenie ze sobą dwóch egzonów

nie wolny 5'-koniec intronu (nukleotyd G) tworzy wiązanie 2'—5' z adeniną w miejscu rozgałęzienia, a następnie zachodzi pęknięcie na drugim styku intron–egzon połączone z ligacją obu egzonów. Tworzenie kompleksu przedstawiono na rysunku 8.13.

8.13. Regulacja ekspresji genów u *Eukaryota* odbywa się też po transkrypcji

Wydaje się, że olbrzymia większość genów u *Eukaryota* jest regulowana na poziomie transkrypcji, ale istnieją też inne poziomy regulacji działania genów. Są to: wybór jednego z kilku miejsc terminacji transkrypcji, tzw. alternatywny



Rys. 8.13. Wytwarzanie spliceosomu. Zaznaczono konserwowane nukleotydy na obu końcach intronu i miejsce rozgałęzienia. Jako pierwszy przyłącza się kompleks U1 snRNP (tzn. kompleks U1 snRNA-białka) (a), jako drugi U2 snRNP (b), potem kompleks U4/U5/U6 snRNP (c). Następnie U4 snRNA, który jest połączony wiązaniami wodorowymi z U6 snRNA odłącza się od U6 snRNA, pozostając przyłączony do spliceosomu, który w tym momencie (d) jest zdolny do wycięcia intronu i religacji egzonów

splicing, czyli różne wycinanie intronów z gotowego transkryptu, zmiany sekwencji transkryptu (tzw. editing, czyli redagowanie), regulacja transportu mRNA z jądra i jego stabilności oraz regulacja stabilności białek.

8.14. W pewnych układach transkrypt nie jest kolinearny z genem — redagowanie RNA (editing)

Dla wielu genów wykryto w ciągu ostatnich paru lat zadziwiające zjawisko, które polega na tym, że sekwencje transkryptu tych genów nie są w pełni kolinearne z odpowiednimi genami, lecz zawierają bądź punktowe mutacje, bądź całkiem rozległe delecje i addycje pojedynczych nukleotydów. Przykłady genów, dla których wykryto to zjawisko podano w tabeli 8.2. Zjawisko to określa się terminem redagowanie transkryptów (ang. editing).

Tabela 8.2. Znane przypadki redagowania transkryptów

Typ redagowania	Występowanie
Insercja i delecja jednego lub więcej U	mitochondrialne mRNA u pierwotniaków <i>Trypanosoma</i> i <i>Leishmania</i>
Zamiana C → U	mRNA apolipoprotein B u ssaków, mRNA mitochondrialne roślin
Zamiana A → G	mRNA receptora kwasu glutaminowego w mózgu
Dodanie dodatkowych C	mRNA mitochondrialnego genu kodującego podjednostkę α syntazy ATP u <i>Physarum</i>
Dodanie dodatkowych G	niektóre geny paramyksowirusów

Znane są dotychczas dwa przypadki redagowania transkryptów genów jądrowych, reszta dotyczy genów mitochondrialnych lub wirusowych. Pierwszy przypadek dotyczy genu kodującego apolipoproteinę B u ssaków; gen ten koduje dwa polipeptydy, dłuższy o wielkości 512 kDa występuje w wątrobie, krótszy o wielkości 242 kDa — w jelicie. Sekwencja jelitowego mRNA zawiera w pozycji kodonu 2153 trójkę nonsensowną UAA, w mRNA w wątrobie w tej samej pozycji znajduje się CAA (glutamina). Kodon CAA obecny jest w tej pozycji także w samym genie. W wyniku mechanizmów posttranskrypcyjnych w jelicie specyficzna trójka CAA w pozycji 2153 ulega deaminacji, dając kodon nonsensowny UAA i powodując powstanie krótszego polipeptydu.

Drugi przypadek dotyczy receptora kwasu glutaminowego w kanałach glutaminowych komórek mózgu. W genach występuje trójka CAG (glutamina), natomiast w niektórych mRNA w analogicznej pozycji znajduje się trójka CGG (arginina). Mechanizm wprowadzania tej zmiany jest na pewno posttranskrypcyjny, ale zupełnie nie jest znany.

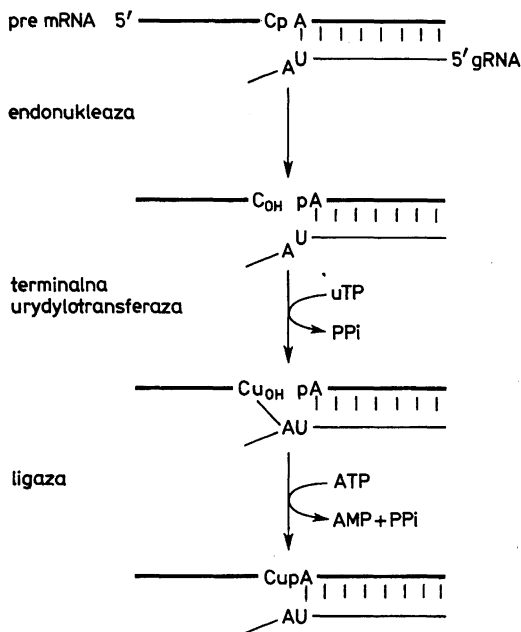
U niektórych wirusów, m.in. u paramyksowirusa, przy transkrypcji niektórych genów polimeraza RNA zaczyna się jąkać (ang. polymerase stuttering) i wprowadza w konkretnym miejscu dodatkowe nukleotydy G (1 lub 2 u dwóch różnych wirusów), co w efekcie powoduje powstawanie dwóch białek. Mechanizm tego zjawiska nie jest dotychczas poznany, ale jego skutkiem jest zwiększenie liczby białek kodowanych przez genom wirusa.

Wszystkie pozostałe przypadki redagowania zachodzą w mitochondriach. W mitochondriach ssaków geny upakowane są tak ciasno, że czasami nie są zakończone kodonem stop, tylko na końcu mRNA występuje pojedynczy U; dopiero w wyniku poliadenylacji powstaje nie zakodowany w genomie kodon stop UAA. Przez jakiś czas wydawało się, że w mitochondriach roślinnych istnieje odstępstwo od uniwersalnego kodu genetycznego. Sądono, że w wielu białkach mitochondrialnych kodon CGG (arginina) powodował włączanie do białek tryptofanu. Okazało się, że w wyniku posttranskrypcyjnych modyfikacji niektóre kodony CGG są zamieniane na normalne kodony tryptofanowe UGG.

U śluzowca *Physarum* w transkrypcie mitochondrialnego genu kodującego podjednostkę α syntazy ATP w 54 miejscach włączana jest nie kodowana w genie mitochondrialnym cytydyna.

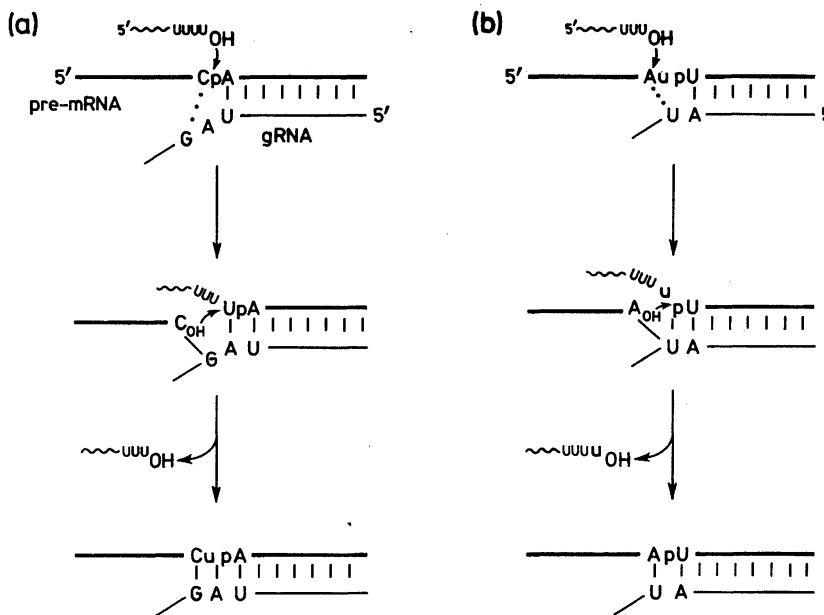
Najbardziej rozbudowany i zadziwiający jest system redagowania transkryptów genów mitochondrialnych u pierwotniaków *Trypanosoma* i *Leishmania*. U organizmów tych mitochondrialny DNA obecny jest w formie dwóch rodzajów kolistych cząsteczek „maksi” i „mini” różniących się wielkością (ang. maxicircles i minicircles). Duże cząsteczki są jednorodne, jest ich 20–50 kopii w jednym mitochondrium komórki, położonym przy podstawie jedynej występującej w komórce wici. Występuje ok. 10 000 minikółek; są one mniej lub bardziej jednorodne i tworzą coś w rodzaju sieci. Geny mitochondrialne znajdują się na maksi kółkach, ale dla niektórych genów konieczne jest redagowanie transkryptów po to, by powstał mRNA kodujący syntezę danego

białka mitochondrialnego. Zakres redagowania może być różny dla różnych transkryptów. Na przykład u *Trypanosoma brucei* w transkrypcie genu kodującego II podjednostkę oksydazy cytochromowej dodawane są posttranskrypcyjnie 4 urydyny, a w transkrypcie genu kodującego III podjednostkę oksydazy cytochromowej musi być dodanych 398 reszt urydyny w 158 różnych miejscach oraz 19 reszt urydyny w 9 miejscach musi ulec delecji.



Rys. 8.14. Jeden z proponowanych modeli redagowania, zakładający istnienie kompleksu enzymatycznego — endonukleazy, terminalnej urydylotransferazy (TUTazy) i ligazy

Ponieważ redagowanie tych transkryptów zachodzi w sposób powtarzalny, postuluje się istnienie mechanizmu odpowiedzialnego za precyzyjne modyfikowanie RNA. Zarówno na dużych, jak i na małych cząsteczkach mitochondrialnego DNA obecne są sekwencje transkrybowane na krótkie RNA (ang. guide RNA), które służą jako wyznaczniki miejsc redagowanych, do których są częściowo komplementarne. Mechanizm tych reakcji nie jest w pełni poznany, przez analogię z rybosomem i spliceosomem mówi się o edytosomie zawierającym wiele aktywności enzymatycznych: endonukleazę, terminalną urydylotransferazę, ligazę RNA oraz 3'-egzonukleazę służącą do wycinania urydyny w prekursorze mRNA (rys. 8.14). Ostatnio Cech zaproponował znacznie prostszy mechanizm redagowania, zbliżony do wycinania intronów grupy I, tzn. za pomocą reakcji transestryfikacji (rys. 8.15). Dodawanie urydyny pochodzącej z obecnej na 3'-końcu gRNA sekwencji poliU nie wymaga żadnych dodatkowych czynników ani energii (rys. 8.15 (a)), natomiast usuwanie urydyny przypomina reakcję wycinania intronu, usunięte U przyłącza się do sekwencji na 3'-końcu gRNA (rys. 8.15 (b)).



Rys. 8.15. Model redagowania według Cecha, dodawanie U (a) jest reakcją transestryfikacji, usuwanie U (b) reakcją typu składanie z usuwaniem miniintronu

8.15. Regulacja przez wybór miejsca terminacji transkrypcji

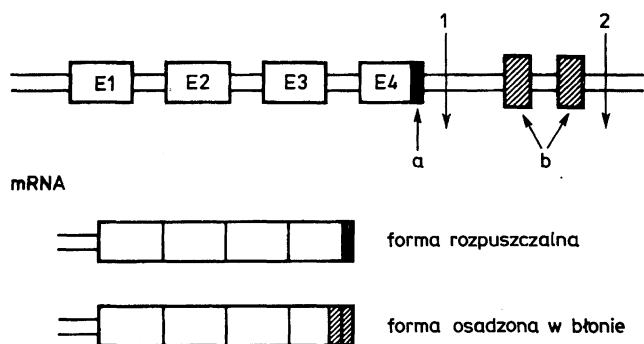
Większość transkryptów syntetyzowanych przez polimerazę II ma na swoim 3'-końcu sekwencję poliA, która nie jest zakodowana w samym genie, lecz jest dodawana posttranskrypcyjnie. Sekwencje nukleotydowe poprzedzające tzw. miejsce poliadenylacji, czyli dodawania poliA są przedstawione w tabeli 8.3. U zwierząt sekwencja AAUAAA znajduje się na 10–30 nukleotydów przed miejscem poliadenylacji, a za samym miejscem znajduje się kilka powtórzeń GU lub U. Niektóre geny mają więcej niż jedno miejsce poliadenylacji i wybór

Tabela 8.3. Sygnały poliadenylacji u *Eukaryota*

Organizm	Sekwencja najwyższej zgodności
Drożdże (<i>S. cerevisiae</i>)	UAG—UAUGU—UUU—10n—! UACAU—100n—! !—50n—UAUUA
Rośliny	UUAGUAUGUAUUUGUA—13n—AAUAAA—14n—!
Ssaki	AUAAA—10—30n—!—10n—(GU) _n (lub) (U) _n

Wykrzyknik oznacza miejsce poliadenylacji; dla drożdży podano kilka sekwencji ważnych dla poliadenylacji. Sekwencja roślinna, w odróżnieniu od sekwencji przedstawionych dla *S. cerevisiae* i ssaków, nie jest sekwencją najwyższej zgodności, ale najlepiej poznanym sygnałem poliadenylacji mRNA wirusa mozaiki kalafiora; n — nukleotydy.

tęgo miejsca może determinować rodzaj powstającego transkryptu. Z taką sytuacją mamy na przykład do czynienia w genach kodujących ciężki łańcuch immunoglobuliny, gdzie miejsce terminacji transkrypcji i związane z nim miejsce poliadenylacji decydują o tym, czy powstanie przeciwciało rozpuszczalne, czy związane z błoną (rys. 8.16). Warto może zaznaczyć, że nie jest jasne, jaki dokładnie jest sygnał terminacji transkrypcji dla większości genów, a w każdym razie dla genów, których transkrypty ulegają poliadenylacji. Wiadomo, że sekwencja AAUAAA lub odpowiednie inne sekwencje u drożdży i roślin są rozpoznawane przez endonukleazę i następnie enzym polimeraza poliA dodaje kilkadziesiąt do kilkuset adenin. Enzym ten wymaga kolejno dwóch czynników warunkujących jego specyficzność: czynnika zwanego CPF



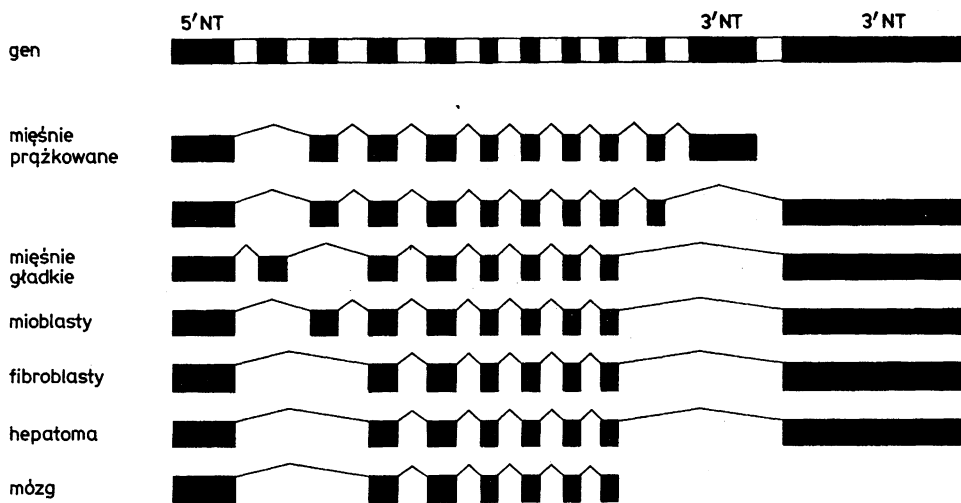
Rys. 8.16. To, czy powstanie rozpuszczalna, czy osadzona w błonie komórkowej forma przeciwciała zależy od transkrypcji łańcucha ciężkiego mu (μ): są dwa możliwe miejsca poliadenylacji, nie jest jasne co powoduje wybór jednego z nich. Przy wyborze pierwszego miejsca powstaje rozpuszczalna, przy wyborze drugiego miejsca — osadzona w błonie forma. Przy wyborze drugiego miejsca zaznaczony kolorem czarnym egzon specyficzny dla formy rozpuszczalnej ulega wycięciu w czasie składania; a — egzon specyficzny dla formy rozpuszczalnej, b — egzony specyficzne dla formy osadzonej w błonie

(ang. cleavage and polyadenylation factor — czynnik potrzebny do cięcia i poliadenylacji), niezbędnego dla dodania pierwszych 10 adenin, oraz tzw. czynnika wiążącego poliA, który jest wymagany do syntezy reszty łańcucha poliA.

Dobrze poznany jest mechanizm terminacji transkrypcji genu kodującego histon H3 u jeźowca, jednego z nielicznych genów eukariotycznych, które nie mają transkryptów zakończonych poliA. Do terminacji transkrypcji niezbędny jest jeden z snRNA, tzw. U7 o długości 57 nukleotydów, który jest komplementarny do obszaru terminacji transkrypcji histonu H3. Mutacje zaburzające komplementarność między dwoma rodzajami RNA powodują powstanie nieprawidłowych 3'-końców mRNA dla histonu H3. Tak więc przyłączenie tego snRNA jest warunkiem prawidłowej terminacji transkrypcji.

8.16. Regulacja przez wybór jednej z dróg składania transkryptu

W rozdziale 13 przedstawiono pogląd na pochodzenie i rolę intronów. Jedną z korzyści ewolucyjnych ich obecności jest możliwość uzyskiwania więcej niż jednego produktu końcowego z danego obszaru kodującego, ponieważ dla niektórych genów istnieje kilka możliwości składania pierwotnego transkryptu (ang. alternative splicing). W wyniku łączenia ze sobą różnych egzonów danego genu powstaje więcej niż jeden rodzaj mRNA. Mechanizm, który powoduje wybór jednej z kilku możliwości nie jest jeszcze poznany. Przykład takiego zjawiska podano na rysunku 8.17.



Rys. 8.17. Alternatywny splicing pokazany na przykładzie genu kodującego α -tropomiozynie u szczura. Egzony — czarne, introny — białe, 5' NT i 3' NT — obszary nie ulegające translacji

8.17. Regulacja eksportu mRNA do cytoplazmy

W jądrze komórkowym w danym momencie znajdują się dziesiątki tysięcy różnych transkryptów, w tym transkrypty zawierające jeden lub więcej intronów, które nie powinny znaleźć się w cytoplazmie. Mechanizmy zatrzymujące takie transkrypty w jądrze nie są dobrze poznane, ale wiadomo, że np. u retrowirusów mogą istnieć specjalne mechanizmy pozwalające na transport z jądra transkryptów odpowiadających całemu genomowi wirusa, tzn. zawierających introny. Wiadomo też, że dla nielicznych genów wyższych *Eukaryota*, nie posiadających intronów, warunkiem prawidłowego eksportu z jądra jest interakcja z generującym dojrzały 3'-koniec transkryptu układem, tzn. w zależności od sytuacji bądź z kompleksem przeprowadzającym poliadenylację, bądź, jak to ma np. miejsce w przypadku histonów, z U7 snRNA i odpowiednimi enzymami.

8.18. Regulacja stabilności mRNA

Stabilność mRNA jest bardzo istotna dla regulacji ekspresji genów — od tego jak długo dany mRNA może być matrycą dla syntezy białek zależy jak długo utrzyma się efekt włączenia danego genu.

Okres półtrwania mRNA eukariotycznych zawiera się w bardzo szerokich granicach — od bardzo krótkich — minuty (wiele mRNA dla protoonkogenów czy innych białek związanych z regulacją) do bardzo długich (mRNA dla β -globiny — wiele dni).

Wiadomo, że na stabilność mRNA ma wpływ obecność sekwencji bogatych w AU na 3'-końcu mRNA w obszarze nie ulegającym translacji. Występuje ona w mRNA dla wielu protoonkogenów. Natomiast u zwierząt w mRNA dla histonów, które są intensywnie produkowane w fazie S, na obszarze 3'-końca obecna jest sekwencja warunkująca zależność stabilności mRNA od cyklu komórkowego. Okres półtrwania tych mRNA waha się od 1 h w komórkach z fazy S do 12 min w innych fazach. Przeniesienie tej sekwencji na inny mRNA powoduje, że jego stabilność staje się zależna od fazy cyklu komórkowego.

Bardzo dobrze zbadany, chociaż być może unikatowy, jest mechanizm regulujący stabilność mRNA dla β -tubuliny. Ulegający translacji mRNA dla tego białka jest degradowany w obecności β -tubuliny. Efekt ten jest zależny od czterech pierwszych aminokwasów N-końcowych białka β -tubuliny. mRNA sztucznie wytworzonych genów mających na N-końcu białka 4 N-końcowe aminokwasy β -tubuliny (Met—Arg—Glu—Ile) również ulegają degradacji w czasie translacji w obecności wolnej β -tubuliny. Przypuszcza się, że białko zawierające taką N-końcową sekwencję aktywuje nukleazy i jednocześnie wyznacza jako obiekt degradacji mRNA, na którym białko jest syntetyzowane.

8.19. Regulacja stabilności białek

W badaniach nad stabilnością białek poczyniono olbrzymie postępy w ciągu ostatnich lat. Wydaje się, że istotną rolę odgrywa aminokwas obecny na N-końcu w dojrzałym białku. Oczywiście, pierwszym aminokwasem jest zawsze metionina, ale liczne mechanizmy posttranslacyjne zmieniają ten koniec. Można doprowadzić do powstawania *in vivo* danego białka o różnych N-końcach. U drożdży obecność argininy na N-końcu powoduje, że okres półtrwania białka wynosi 2 min, natomiast obecność waliny daje białko o okresie półtrwania mierzonym już w godzinach. N-koniec białka może być dodatkowo modyfikowany — istnieje enzym, który przenosi argininę z arginylo-tRNA na N-koniec białek. Znane są także deamidazy specyficzne dla N-końcowej glutaminy i asparaginy.

Degradacja białek jest procesem aktywnym, bierze w nim udział małe, niesłychanie silne konserwowane wśród *Eukaryota*, 76-aminokwasowe białko — zwane ubikwitiną. Nie tylko sekwencja, ale i sam układ genów kodujących

ubikwitynę jest zachowany. Spotykane są dwa rodzaje genów kodujących poliubikwitynę: po pierwsze 6 kolejno powtórzonych sekwencji kodujących ubikwitynę, po drugie geny w formie fuzji — dwa geny są połączone, każdy z innym genem kodującym białko wchodzące w skład rybosomu.

Przyłączenie ubikwityny w wyniku kilku etapów przenoszenia tego białka przez odpowiednie enzymy powoduje degradację białka, do którego jest ona przyłączona. Proces ten jest zależny od ATP. Konieczne jest przyłączenie nie jednej ubikwityny, ale całego kompleksu, tzn. do lizyny białka przyłączana jest ubikwityna, do niej następną itp. Za ostateczną degradację odpowiedzialna jest duża struktura, zwana proteosomem.

Ubikwityna jest bardzo istotna dla prawidłowego funkcjonowania komórki; drożdże pozbawione genu poliubikwitynowego są wrażliwe na stresy (temperaturę itp.), co wynika z niezdolności do degradowania białek o nieprawidłowej strukturze, powstających np. w wyniku szoku cieplnego.

8.20. Białka towarzyszące

Przez wiele lat uważano, że białka przyjmują swoją prawidłową strukturę przestrzenną w sposób spontaniczny. Obecnie wiadomo, że proces ten może być wspomagany przez spotykane w całym świecie ożywionym białka, zwane białkami towarzyszącymi (ang. chaperone — przyzwoitka). Są one obecne u bakterii, w cytoplazmie, jądrze, chloroplastach i mitochondriach. Potrzebne są do tworzenia prawidłowej struktury oktamerów histonowych, do przenoszenia białek przez błony mitochondrialne i do przywracania im właściwej konformacji wewnątrz mitochondriów. Są one także konieczne do powstawania karboksylazy rybulozobisfosforanu. Enzym ten składa się z dużych podjednostek kodowanych w genomie chloroplastu i małych kodowanych w jądrze, a ulegających translacji w cytoplazmie. W chloroplastach obecne jest specjalne białko powodujące powstanie właściwej konformacji tego enzymu. Wiele z białek towarzyszących należy do tzw. grupy białek szoku cieplnego, tzn. ich synteza jest indukowana przez podwyższoną temperaturę.

9. MUTAGENEZA, REPERACJA I REKOMBINACJA DNA

U *E. coli* częstość samorzutnie powstających zmian w sekwencji nukleotydów w DNA wynosi około 1×10^{-9} w przeliczeniu na jedną parę nukleotydów i jeden cykl replikacyjny (czyli pojedyncze miejsce w DNA *E. coli* mutuje raz na 10^9 cykli replikacyjnych). Ten zaskakująco wysoki poziom wierności replikacji DNA nie wynika z bezbłędności polimerazy DNA III przeprowadzającej replikację. Enzym ten włącza błędne nukleotydy do nowo syntetyzowanych łańcuchów DNA z częstością około 5 rzędów wielkości wyższą. Obserwowany wysoki stopień stałości DNA, a więc i informacji genetycznej przekazywanej do komórek potomnych, a przez gamety do potomnych organizmów wielokomórkowych, jest wynikiem funkcjonowania w czasie replikacji DNA licznych, enzymatycznych układów korektorskich, a także mechanizmów reparycyjnych działających w okresach międzypodziałowych.

Mutacje w DNA mogą powstawać nie tylko w wyniku błędów w procesie replikacji, ale także na skutek działania różnych czynników chemicznych lub fizycznych powstających zarówno w wyniku przemian metabolicznych zachodzących w komórkach, jak i docierających z zewnątrz komórek.

Powstające w wyniku działania tych procesów zmiany w strukturze DNA mogą wywoływać różnego typu mutacje bądź też zaburzać replikację DNA i powodować śmierć komórek. Uszkodzenia DNA mogą być tak liczne, że bez ich natychmiastowej reperacji organizmy nie mogłyby egzystować. W różnych organizmach prokariotycznych i eukariotycznych występują setki odrębnych genów i kodowanych przez nie białek reperujących uszkodzenia w DNA. Ich działalność prowadzi do utrzymania względnej stałości sekwencji nukleotydowych cząsteczek DNA (tab. 9.1).

Z drugiej jednak strony pewien poziom powstawania i utrwalania się mutacji był i jest koniecznym warunkiem utrzymywania się zmienności dziedzicznej organizmów jako podstawowego motoru ewolucji. Nad ustaleniem optymalnego kompromisu między tymi przeciwstawnymi procesami czuwają

Tabela 9.1. Niektóre geny i ich produkty białkowe biorące udział w reperacji DNA u *E. coli*

Symbol genu	Efekt mutacji <i>in vivo</i>	Produkt genu	Funkcja
<i>uvrA</i> <i>uvrB</i> <i>uvrC</i> <i>uvrD</i>	zwiększona wrażliwość na UV	podjednostka endonukleazy o aktywności ATPazy podjednostak endonukleazy UV podjednostka endonukleazy UV helikaza DNA II	rozpoznawanie dimerów pirymidynowych nacinanie DNA po obu stronach dimeru nacinanie DNA po obu stronach dimeru rozwijanie heliksu wyciętego fragmentu DNA
<i>phr</i>	brak fotoreaktywacji po napromienianiu UV, efekt mutagenny	fotoliza DNA	zależna od światła monomeryzacja dimerów
<i>mutH</i> <i>mutL</i> <i>mutS</i> <i>mutU</i> (<i>uvrD</i>)	efekt mutatorowy (zwiększona częstość mutacji)	zespół enzymów rozpoznających i wycinających niewłaściwie włączoną zasadę do DNA helikaza II	wycinanie z łańcucha DNA niewłaściwie włączonej zasady rozwijanie heliksu wyciętego fragmentu DNA
<i>recA</i> <i>recB</i> <i>recC</i> <i>recD</i>	niezdolność do rekombinacji DNA obniżony poziom rekombinacji	białko RecA endonukleaza nacinająca DNA przy sekwencji chi (GCTGGTGG)	rekombinacja homologiczna DNA, indukcja reakcji SOS wspomaganie procesu łączenia białka RecA z wolnymi końcami DNA i jednoniciowymi odcinkami DNA
<i>umuC</i> <i>umuD</i>	zwiększona wrażliwość na UV i mniejsza liczba mutantów	? ?	umożliwianie obciążonej błędami replikacji DNA w systemie SOS
<i>ung</i> <i>tag</i>	efekt mutatorowy i zwiększona wrażliwość na niektóre mutageny chemiczne	glikozydaza uracylo-DNA 3-metyloadeninoglikozydaza	wycinanie niewłaściwych zasad z DNA i wytwarzanie miejsc AP
<i>nth</i>	zwiększona wrażliwość na pewne mutageny chemiczne	endonukleaza II AP	nacinanie DNA przy miejscach AP

różne układy enzymatyczne współdziałające z DNA. Między cząsteczkami DNA zachodzi proces wymiany odcinków o przynajmniej częściowo homologicznej sekwencji nukleotydowej, czyli tak zwany proces rekombinacji genetycznej. Rekombinacja genetyczna występuje zarówno między cząsteczkami DNA wirusów, bakterii, jak i między chromosomami organizmów eukariotycznych. Rekombinacja między chromosomami w czasie mejozy jest podstawowym mechanizmem prowadzącym do różnorodności genetycznej wytwarzanych gamet rozmnażających się płciowo.

Procesy rekombinacyjne odgrywają również istotną rolę w czasie reperacji uszkodzeń w DNA, szczególnie gdy liczba zmian i uszkodzeń w DNA jest tak duża, że różne systemy reperacyjne działające w komórkach nie są w stanie ich zreperować. Wtedy jedynym sposobem uratowania i przekazania informacji genetycznej staje się rekombinacja z nie uszkodzonym fragmentem drugiej homologicznej cząsteczki DNA.

Niektóre z tych procesów zostaną przedstawione na przykładzie organizmów prokariotycznych, a przede wszystkim *E. coli*. Analogiczne mechanizmy występują u organizmów eukariotycznych, jak: grzyby, *D. melanogaster* czy ssaki, chociaż zwykle są one znacznie mniej poznane, zwłaszcza na poziomie molekularnym.

Wreszcie istotną rolę w wytwarzaniu dużych zmian w strukturze DNA mogą odgrywać stosunkowo niedawno poznane i obecnie intensywnie badane ruchome elementy genetyczne, czyli transpozony. Zmieniając swoje położenie w DNA w wyniku procesu, zwanego transpozycją, mogą powodować istotne zmiany w strukturze genomów różnych organizmów.

9.1. Mutageneza i reperacja DNA

Wszelkie zmiany strukturalne w DNA, jak na przykład powstawanie, w wyniku błędów w replikacji, niekomplementarnych par zasad, czy powstawanie pod wpływem promieniowania UV dimerów pirymidynowych i innych uszkodzeń DNA stanowią jedynie zmiany premutacyjne, które, jeżeli nie zostaną usunięte w procesach reperacji, mogą doprowadzić do zmian mutacyjnych po następnych cyklach replikacyjnych DNA. Mutacjami utrwalonymi, dziedzicznie przekazywanymi, będą jedynie zmiany w DNA mającym inną niż wyjściowa sekwencję par nukleotydowych G—C bądź A—T — normalnych składników heliksu DNA.

Zmiany mutacyjne w DNA mogą mieć bardzo różny charakter. Najprostszą zmianą jest zamiana w heliksie jednej pary zasad w drugą. Takie mutacje nazywamy punktowymi. Mutacje punktowe mogą z częstością zbliżoną do mutacji wyjściowej mutować wstecznie, czyli rewertować do wyjściowego, nie zmutowanego układu nukleotydów w DNA.

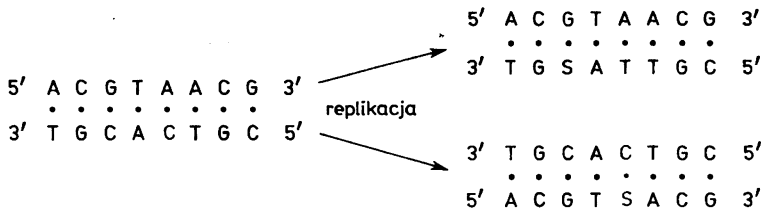
Inne zmiany mutacyjne w DNA mogą polegać na przykład na wypadnięciu (delecji) pary zasad lub odwrotnie na wstawieniu dodatkowej pary zasad, czyli

insercji. Tego typu mutacje będą rewertować znacznie rzadziej niż zmiany pojedynczych par zasad.

Mutacje w składzie nukleotydowym DNA mogą mieć bardzo różne efekty fenotypowe. Mutacje punktowe mogą powodować zamianę jednego kodonu w drugi, który wyznacza inny aminokwas. Pojedyncza substytucja aminokwasowa w białku kodowanym przez gen, w którym zaszła mutacja punktowa, może całkowicie znosić aktywność enzymatyczną białka lub tylko ją modyfikować, zależnie od rodzaju substytucji aminokwasowej i jej położenia w peptydzie. Mutacja zamieniająca jeden kodon na drugi synonimowy kodon wyznaczający ten sam aminokwas nie będzie miała oczywiście żadnego wpływu na właściwości białka. Mutacje, polegające na wstawieniu bądź wypadnięciu nukleotydów, mogą powodować bardzo drastyczne zmiany w kodowanych przez tak zmutowane geny białkach, w wyniku zmiany fazy odczytu w trakcie translacji. Oczywiście duże zmiany w sekwencji nukleotydowej DNA, jak na przykład długie delecje obejmujące liczne pary nukleotydów całkowicie eliminują ekspresję różnych genów.

9.2. Mutageneza samorzutna (spontaniczna)

Jest to proces powstawania mutacji, zwykle punktowych, wynikający ze zmiany jednej zasady bez udziału zewnętrznych czynników fizycznych bądź chemicznych. Mutacje spontaniczne są najczęściej wynikiem błędów popełnianych w czasie replikacji DNA, bądź też w wyniku samorzutnych modyfikacji chemicznych zachodzących w zasadach występujących w DNA. Jeśli w czasie replikacji DNA polimeraza DNA III włączy do nowo syntetyzowanego łańcucha DNA nukleotyd z niekomplementarną zasadą do zasady występującej w łańcuchu matrycowym, to powstaje para zasad niewłaściwie połączonych (na przykład w nowo syntetyzowanym łańcuchu na przeciw G w matrycy występuje A). Jeżeli para taka nie zostanie skorygowana przed następnym cyklem replikacyjnym, to jedna z pochodnych cząsteczek DNA będzie miała po replikacji parę G—C jak w typie standardowym, a druga z pochodnych cząsteczek DNA parę A—T. Powstanie wtedy mutacja punktowa typu tranzycji, gdzie jedna puryna została zastąpiona przez drugą purynę i odpowiednio jedna pirymidyna — przez drugą pirymidynę (rys. 9.1).



Rys. 9.1. Powstawanie mutacji w wyniku niewłaściwie włączonej zasady w trakcie replikacji DNA. Włączona mylnie zasada C (czerwona) naprzeciw A w łańcuchu matrycowym powoduje powstanie mutacji punktowej typu transwersji (AT → GC)

Jeżeli zamiast puryny zostanie mylnie włączona pirymidyna lub zamiast pirymidyny — puryna, to powstaną mutacje punktowe typu transwersji, jak na przykład $G-C \rightarrow T-A$ czy $G-C \rightarrow C-G$. Średnia częstość mutacji spontanicznych w jednym cyklu replikacji w przeliczeniu na jedną parę nukleotydów wynosi około 10^{-9} . Jednak częstość mutacji różnych par zasad w tym samym genie zawiera się w dość szerokich granicach. Niektóre miejsca w genie mutują z częstością wielokrotnie wyższą niż pozostałe. Są to tak zwane gorące miejsca.

9.3. Polimeraza DNA III *E. coli* w trakcie replikacji dokonuje korekty mylnie włączonych zasad

W czasie replikacji DNA u *E. coli* poziom błędnie włączanych nukleotydów do nowo syntetyzowanego łańcucha wynosi 10^{-4} na jedną parę nukleotydów. Polimeraza DNA III nie jest w stanie rozróżnić zmian tautomerycznych zachodzących w zasadach. Liczba błędnie włączanych zasad w czasie replikacji byłaby wielokrotnie wyższa, gdyby błędnie włączane zasady nie były natychmiast w trakcie replikacji wycinane. Taką zdolność korektorską polimeraza DNA III zawdzięcza aktywności podjednostki *E*. Podjednostka ta ma właściwości egzonukleazy działającej w kierunku $3' \rightarrow 5'$. Jeżeli podjednostka α polimerazy DNA III włącza niewłaściwą zasadę, to enzym zatrzymuje się na replikowanej nici DNA, podjednostka *E* wycina mylnie włączoną zasadę, a następnie podjednostka α ponownie włącza w to miejsce już właściwą zasadę. Dzięki tym korektorskim właściwościom polimerazy DNA III, olbrzymia większość niewłaściwie włączonych zasad zostaje w czasie replikacji skorygowana.

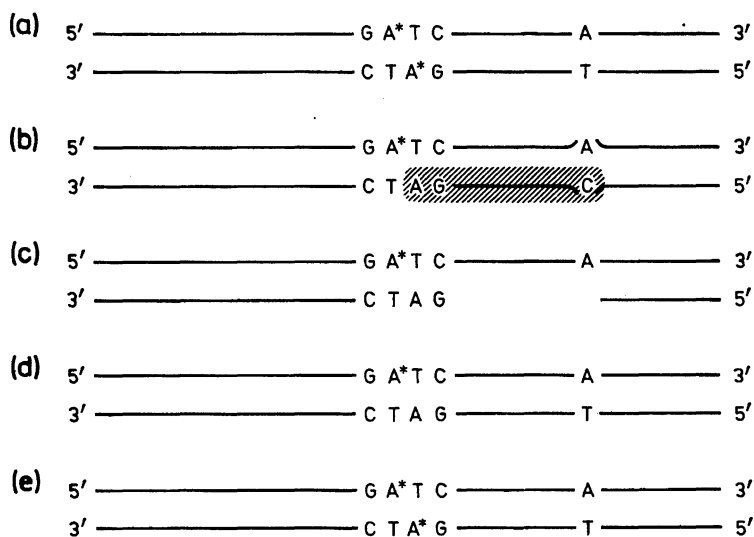
Podjednostka *E* polimerazy DNA III w *E. coli* jest kodowaną przez gen *mutD*. Mutacje w tym genie, powodujące utratę właściwości egzonukleolitycznych podjednostki *E*, wywołują blisko 1000-krotne podwyższenie poziomu mutacji spontanicznych. Mutacje tego typu określa się jako mutatorowe. Mutacje wielu genów kodujących białka, które biorą udział w różnych mechanizmach usuwania błędów i uszkodzeń w DNA wykazują również efekty mutatorowe, podwyższające poziom powstających mutacji. Są też znane mutacje niektórych z tych genów, które obniżają poziom mutacji spontanicznych (mutacje antymutatorowe), co wskazywałoby, że enzymy kodowane przez geny typu dzikiego nie są maksymalnie efektywne. Można zakładać, że pewien niewielki poziom powstających mutacji ze względów ewolucyjnych jest selektywnie korzystny.

Mimo właściwości korektorskich polimerazy DNA III nie wszystkie niewłaściwie sparowane zasady zostają usunięte w trakcie replikacji DNA.

9.4. Poreplikacyjna naprawa przez wycinanie niewłaściwie sparowanych zasad

Jeśli w czasie replikacji DNA włączone zasady nie zostaną usunięte w wyniku egzonukleolitycznej działalności polimerazy DNA III, to w powstającym nowo syntetyzowanym heliksie DNA będą występować pary niekom-

plementarnych zasad. Pojawiają się one z częstością około 1×10^{-8} replikowanych zasad. Mogą one być źródłem przyszłych mutacji punktowych, o ile nie zostaną rozpoznane i usunięte przez odpowiednie enzymy reperujące. W genomie *E. coli* występuje wiele genów, jak na przykład *mutH*, *mutU* czy *mutS* kodujących białka, tworzące kompleks enzymatyczny rozpoznający w DNA niewłaściwie sparowane zasady. Kompleks ten rozpoznaje zapewne zmiany konformacyjne heliksu DNA, wynikające z obecności niewłaściwie sparowanych zasad. U *E. coli* występują trzy odrębne zespoły enzymatyczne wycinające niewłaściwie włączoną w czasie replikacji zasadę. Jeden rozpoznaje wszelkie niewłaściwie sparowane zasady i wycina z nowo syntetyzowanej nici odcinek o długości do 1000 i więcej nukleotydów. Drugi — rozpoznaje określone niewłaściwie sparowane zasady, jak na przykład G—A i wycina je wraz z kilku sąsiadującymi nukleotydami. Wreszcie trzeci system reperacji przez wycinanie rozpoznaje niewłaściwie sparowane zasady G—T, powstające w wyniku spontanicznej deaminacji 5-metylocytozyny wraz z nielicznymi sąsiednimi nukleotydami. Powstające w DNA luki w nowo syntetyzowanym łańcuchu są następnie uzupełniane przez polimerazę DNA, która włączając właściwy nukleotyd likwiduje błąd replikacyjny. W ostatnim etapie procesu naprawy ligaza DNA łączy kowalentnie nowo syntetyzowany fragment DNA z resztą łańcucha DNA (rys. 9.2).



Rys. 9.2. Reperacja niewłaściwie włączonej zasady przez jej wycięcie i resyntezę brakującego odcinka. (a) DNA przed rekombinacją. (b) DNA w trakcie replikacji z jeszcze nie zmetylowaną adeniną w sekwencji CTAG i z mylnie włączonym nukleotydem (C zamiast T) w nowo syntetyzowanym łańcuchu DNA. Kompleks enzymatyczny złożony z białek kodowanych przez geny *mutH*, *mutL*, *mutS* i *uvrD* rozpoznaje nie zmetylowaną sekwencję CTAG i niewłaściwie sparowaną zasadę. (c) W wyniku nacięć i usunięcia fragmentu łańcucha DNA powstaje w nowo syntetyzowanym łańcuchu DNA luka. (d) W wyniku syntezy reperacyjnej przeprowadzanej przez polimerazę DNA I luka zostaje uzupełniona i zamiast mylnie włączonej zasady C zostaje włączona poprawnie zasada T. (e) Metylaza metyluje adeninę w sekwencji CTAG nowo syntetyzowanego łańcucha DNA

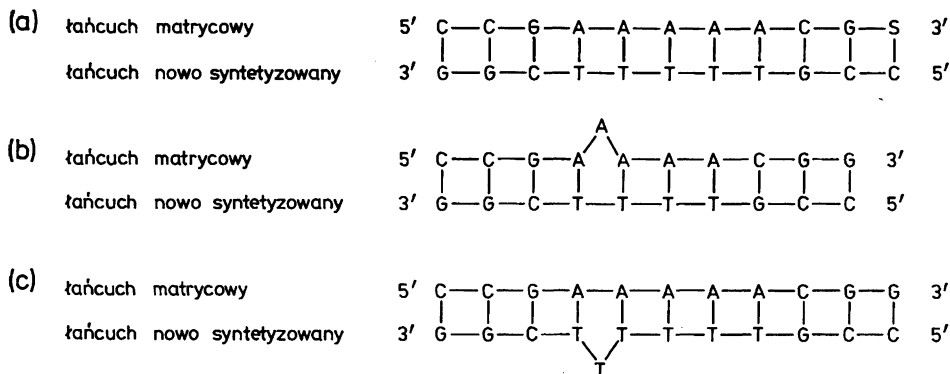
Aby nastąpiła właściwa naprawa DNA, kompleks enzymatyczny musi rozpoznać niewłaściwie włączoną zasadę, czyli odróżnić nowo syntetyzowany łańcuch od łańcucha matrycowego. Takie rozpoznanie jest możliwe jedynie w pierwszych sekundach czy minutach po replikacji DNA. W DNA *E. coli* występuje około 1000 czteronukleotydowych sekwencji $\frac{\text{GATC}}{\text{CTAG}}$. Adenina

w tych sekwencjach jest metylowana w pozycji 6 przez specyficzną metylazę kodowaną przez gen *dam*. Bezpośrednio po replikacji adenina jest już zmetylowana w łańcuchu matrycowym, natomiast w łańcuchu nowo syntetyzowanym jest jeszcze nie zmetylowana. Zespół reperacyjny rozpoznaje nie zmetylowany łańcuch DNA i nacina go w dwóch miejscach: z jednej strony w obrębie zmetylowanej sekwencji GATC (bądź CATG), a z drugiej strony — w sąsiedztwie niewłaściwie włączonej zasady. Następnie gen *mutU* (synonim *uvrD*), kodujący helikazę II powoduje rozwinięcie i usunięcie odcinka łańcucha DNA, a powstającą jednoniciową lukę dosyntetyzuje polimeraza (rys. 9.2). W ten sposób zostaje odtworzona właściwa para zasad. Jeżeli po paru minutach adeniny w łańcuchu nowo syntetyzowanym w czteronukleotydowych sekwencjach zostaną zmetylowane, to rozpoznanie niewłaściwie włączonej w czasie replikacji zasady staje się niemożliwe. Gdyby system reperujący usuwał losowo jedną z dwóch niewłaściwie sparowanych zasad, to naprawa zachodziłaby jedynie w 50% przypadków, natomiast w pozostałych przypadkach następowaloby utrwalenie mutacji na skutek wprowadzenia do łańcucha matrycowego zasady komplementarnej do mylnie włączonej w czasie replikacji DNA zasady. W wyniku opóźnienia procesu metylacji nowo syntetyzowanego DNA przez metylazę *dam* większość niewłaściwie sparowanych zasad zostaje usunięta. Oczywiście mutacje w genach *mutH*, *mutL* i *mutS*, powodujące brak i obniżenie aktywności kodowanych przez nie enzymów, mają właściwości mutatorowe i podwyższają poziom spontanicznej mutagenezy.

Niewłaściwie sparowane zasady w DNA tworzą się także w procesie rekombinacji DNA w tak zwanych heterodupleksach powstających z powiązania dwóch łańcuchów pochodzących z odrębnych cząsteczek DNA. Są one usuwane przez omawiany tu mechanizm wycinania i resyntezy. W tym wypadku jednak oba łańcuchy DNA są zmetylowane i replikacja odbywa się losowo w obu kierunkach.

9.5. W czasie replikacji DNA mogą powstawać deleccje bądź addycje nukleotydów

W miejscach, gdzie w DNA występują ciągi identycznych zasad, na przykład AAAAA, w czasie replikacji zachodzi tak zwany poślizg polimerazy DNA III. Na skutek wypełnienia się jednego czy więcej nukleotydów w łańcuchu matrycowym bądź nowo syntetyzowanym (rys. 9.3) powstają deleccje bądź addycje pojedynczych nukleotydów. Mutacje te nie mogą być usunięte przez

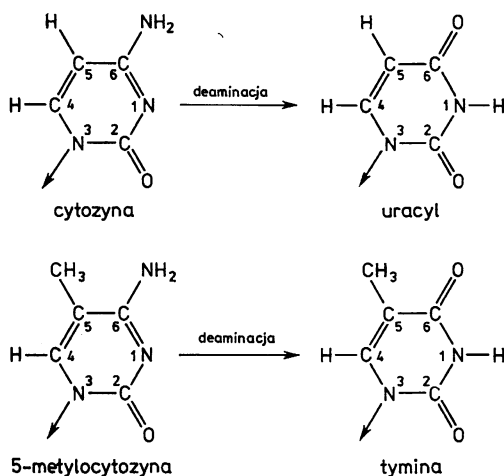


Rys. 9.3. Powstawanie w czasie replikacji DNA delekcji bądź addycji pojedynczych nukleotydów. (a) Odcinek DNA z 5 kolejnymi parami nukleotydów AT normalnie zreplikowany. (b) W wyniku wypełnienia się nukleotydu A w łańcuchu matrycowym w nowo syntetyzowanym łańcuchu DNA zachodzi delekcja jednego nukleotydu T. (c) W wyniku wypełnienia się nukleotydu T w łańcuchu nowo syntetyzowanym powstaje addycja jednego nukleotydu T

korekcyjne działanie polimerazy DNA i wywołują zmiany ramki odczytu w czasie translacji, powodując z reguły utratę aktywności kodowanego enzymu.

9.6. Modyfikacje zasad w DNA mogą być źródłem mutacji samorzutnych

W DNA mogą zachodzić samorzutnie (bez udziału mutagenów) różne modyfikacje chemiczne zasad purynowych bądź pirymidynowych. Na przykład cytozyna może podlegać deaminacji i powstaje wtedy cząsteczka uracylu. Cząsteczki cytozyny mogą być także w DNA metylowane w pozycji 5 i powstaje wtedy 5-metylocytozyna. 5-metylocytozyna w łańcuchu matrycowym w czasie replikacji DNA powoduje włączenie guaniny w nowo syntetyzowanym łańcuchu i nie stanowi źródła mutacji. 5-metylocytozyna podlega samorzutnej deaminacji i powstaje z niej cząsteczka tyminy (rys. 9.4). W wypadku deaminacji cytozyny powstający uracyl jest zasadą obcą dla DNA. W komórkach *E. coli* występuje specyficzna glikozylaza uracylowa DNA, która wycina z DNA uracyl hydrolizując wiązanie N-glikozydowe między deoksyrybozą a uracylem. Powstaje wtedy w DNA „dziura”, zwana miejscem AP (apurynowym bądź apirymidynowym). Miejsca AP w DNA są rozpoznawane przez specyficzne endonukleazy, które przecinają łańcuch DNA obok miejsca AP i powodują jego wycięcie wraz z kilku sąsiednimi nukleotydami. Powstająca luka w łańcuchu DNA zostaje następnie wypełniona przez polimerazę DNA I przy użyciu jako matrycy drugiego nieuszkodzonego łańcucha. Ponieważ proces reperacji przez wycinanie i resyntezę jest w zasadzie bezbłędny, deaminacja cytozyny nie zwiększa istotnie poziomu mutacji spontanicznych.



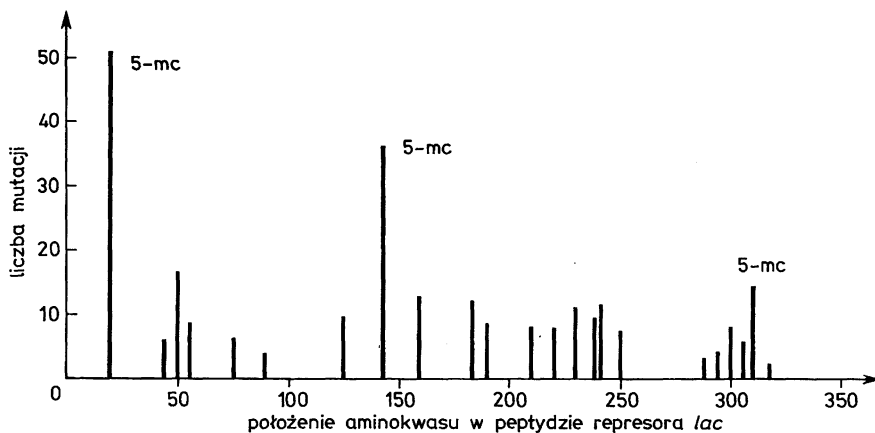
Rys. 9.4. Występowanie w DNA 5-metylocytozyny zamiast cytozyny powoduje powstawanie gorących miejsc mutacji. Samorzutna deaminacja cytozyny powoduje powstawanie uracylu, który wycinany jest z DNA przez specyficzną uracylo-DNA-glikozydazę. Powstające miejsce apurynowe (AP) jest następnie reperowane w zasadzie bezbłędnie przez wycinanie i syntezę brakującego odcinka DNA. Samorzutna deaminacja 5-metylocytozyny prowadzi do powstania tyminy, która jako naturalny składnik DNA nie jest wycinana i wobec tego przy następnej replikacji DNA powoduje powstanie tranzycji typu GC \rightarrow AT

Jeśli jednak deaminacji podlega 5-metylocytozyna, to powstaje cząsteczka tyminy. Tymina jest normalnym składnikiem DNA i nie jest rozpoznawana przez układy reperujące DNA. Po następnej replikacji DNA zamiast pierwotnej pary GC powstanie para AT, a więc zajdzie tranzycja typu GC \rightarrow AT (rys. 9.4).

9.7. Gorące miejsca mutacji w genach

Dla kilku dokładnie zbadanych genów wykazano, że większość samorzutnych mutacji powstaje w kilku charakterystycznych miejscach dla danego genu, zwanych gorącymi miejscami (ang. hot spots). Na przykład w genie *r^{II}* faga *T4* gorące miejsca na mapie genu odpowiadają miejscom w DNA genu, gdzie występują obok siebie cztery adeniny.

W takich miejscach powstają często addycje bądź delecje pojedynczych nukleotydów. Ponieważ takie mutacje są niereperowalne, częstość ich pojawiania się jest znacznie wyższa od mutacji innego typu. Drugim przykładem może być występowanie w genie *lacI* kodującym represor operonu laktozowego *E. coli* trzech miejsc, w których z dużą częstością występują mutacje punktowe typu tranzycji GC \rightarrow AT (rys. 9.5). Gorące miejsca występowania tych tranzycji odpowiadają dokładnie miejscom położenia w DNA genu *lacI* trzech zasad 5-metylocytozynowych, które, jak mówiliśmy, samorzutnie na drodze deaminacji mogą przechodzić w tyminę.



Rys. 9.5. Rozmieszczenie gorących miejsc tranżycji GC₃ → AT w genie *lacI* kodującym białko represora operonu laktozowego *E. coli*. Trzy wyraźne gorące miejsca mutacji GC → AT, powodujące zmiany w składzie aminokwasowym represora operonu laktozowego *E. coli*, odpowiadają dokładnie położeniu w genie *lacI* trzech 5-metylocytozyn (5-mc)

9.8. Mutacje indukowane

W wyniku wysokiej efektywności procesów reperacyjnych większość spontanicznie zachodzących zmian w DNA w czasie i po replikacji DNA jest usuwana i poziom mutacji spontanicznych jest bardzo niski.

Częstość powstawania mutacji można jednak bardzo istotnie zwiększyć działając na komórki, czy całe organizmy, zewnętrznymi czynnikami fizycznymi bądź chemicznymi wywołującymi liczne i różnorodne uszkodzenia w DNA. Takie czynniki nazywamy mutagenicznymi lub po prostu mutagenami. Pionierskimi pracami nad mutagenizacją były badania H.I. Mullera (1927 r.) nad wpływem promieniowania X na *D. melanogaster* i Ch. Auerbach (1942 r.) nad mutagenicznymi efektami iperytu.

Prowadzone od tego czasu intensywne badania nad indukowaniem mutacji wykazały, że wiele różnych czynników fizycznych oraz tysiące różnych związków chemicznych działają mutagenicznie na wszelkie organizmy, począwszy od bakterii, a kończąc na człowieku. Najaktywniejszymi mutagenami fizycznymi są: promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 260 nm oraz różne promieniowania jonizujące, jak promieniowanie X czy γ , powstające w czasie rozpadu pierwiastków radioaktywnych. Czynniki chemiczne mogą modyfikować różne składniki DNA, działając na DNA bezpośrednio lub też w wyniku przekształceń metabolicznych w komórce. W zależności od stosowanego mutagenu uszkodzenia w DNA mogą polegać na pęknięciu pojedynczego łańcucha lub obu łańcuchów w podwójnym heliksie DNA, usunięciu zasady z nukleotydu, dołączeniu nowych grup chemicznych do zasad purynowych bądź pirymidynowych, wytwarzaniu wiązań kowalencyjnych między dwoma zasadami wy-

stępującymi w jednym łańcuchu lub między zasadami z dwóch różnych łańcuchów heliksu DNA.

Jeżeli indukowane przez mutageny zmiany w strukturze DNA nie zostaną w komórkach zreperowane, to wywołują zaburzenia w replikacji DNA i w rezultacie — efekt letalny. W komórkach wszystkich organizmów istnieją liczne i różnorodne sposoby usuwania tych uszkodzeń, o ile nie powstają one ze zbyt wielką częstością. Niektóre procesy reperacyjne nie są dokładne, co powoduje znaczne zwiększenie poziomu mutacji wśród komórek przeżywających. Procesy reperacyjne zostały na poziomie molekularnym najlepiej poznane u *E. coli* i niektórych fagów bakteryjnych, gdzie wyizolowano, sklonowano i zsekwencjonowano liczne geny, których produkty białkowe biorą udział w procesach usuwania różnych typów uszkodzeń indukowanych przez różne rodzaje mutagenów. Niektóre z tych procesów reperacyjnych udało się powtórzyć *in vitro*, używając oczyszczonych enzymów reperacyjnych. Przykładem takiego procesu jest reparacja uszkodzeń DNA, wywołana przez promieniowanie UV o długości fali 260 nm. Głównym uszkodzeniem DNA w wyniku działania UV jest powstawanie fotodimerów pirymidyn, na przykład dimerów tymidynowych czy też dimerów tyminy z cytozyną. W wyniku tych fotochemicznych procesów powstają w łańcuchu DNA pary sąsiadujących pirymidyn, powiązane wiązaniami kowalencyjnymi. Dimery pirymidynowe w procesie replikacji zatrzymują włączanie nukleotydów przez polimerazę DNA III do nowo syntetyzowanego łańcucha DNA, co powoduje fragmentację DNA i efekt letalny. Znane są dwa podstawowe procesy reparacji uszkodzeń wywołanych przez promieniowanie UV.

Pierwszy z nich to fotoreaktywacja dokonywana przez enzym fotoliazę, która pod wpływem światła widzialnego z udziałem flawoproteinowych chromoforów (np. FADH₂) przeprowadza rozłączenie fotodimerów z powrotem na monomery i usuwa pierwotne uszkodzenie DNA.

Drugim procesem prowadzącym do usuwania dimerów z DNA jest naprawa przez wycinanie. W tym, nie wymagającym światła widzialnego, procesie reperacyjnym zaangażowane są cztery białka enzymatyczne kodowane przez geny: *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*. Zostały one wykryte i nazwane *uvr* (geny oporności na promieniowanie UV), ponieważ mutacje w tych genach powodują istotne obniżenia oporności komórek *E. coli* na letalne efekty promieniowania UV. Geny te zostały sklonowane, a ich produkty białkowe — w pełni poznane. Białka te tworzą układ reperacyjny, zwany endonukleazą UV albo też endonukleazą UVRABCD. W układzie tym białko kodowane przez *uvrA* rozpoznaje w łańcuchu DNA deformację strukturalną wywołaną obecnością dimeru. Białka kodowane przez geny *uvrB* i *uvrC* przecinają łańcuch DNA w pobliżu dimeru w odległości 7 nukleotydów od strony 5' i ok. 5 nukleotydów od strony 3'. Białko kodowane przez gen *uvrD* jest helikazą, która powoduje rozkręcenie odciętego 12-nukleotydowego odcinka DNA i jego odłączenie od łańcucha DNA.

W ten sposób dimer zostaje wycięty wraz z sąsiednimi nukleotydami i powstaje luka w jednym z łańcuchów heliksu DNA.

Następnym etapem reperacji przez wycinanie jest synteza brakującego odcinka nici DNA od końca 5' przez polimerazę DNA I, a po wypełnieniu luki na końcu 3' — ligacja z udziałem ligazy DNA I. Układ reperacyjny UVRABCD jest specyficzny w stosunku do dimerów pirymidynowych powstających pod wpływem promieniowania UV i oczywiście prowadzi do pełnej i bezbłędnej reperacji o ile drugi łańcuch DNA, leżący naprzeciw powstającej luki, jest nie uszkodzony i może funkcjonować jako matryca dla polimerazy DNA I.

Systemy reperacji dimerów pirymidynowych przez fotoreaktywację i wycinanie usuwają dimery z DNA w zasadzie bezbłędnie i stanowią podstawową ochronę wszelkich organizmów przed mutagenicznym bądź letalnym wpływem promieniowania UV występującym w promieniowaniu słonecznym. Choroba ta jest wywołana mutacjami w kilku genach kodujących białka biorące udział w wycinaniu dimerów. U ludzi znana jest choroba dziedziczna, zwana *xeroderma pigmentosum*, polegająca na nadwrażliwości komórek na promieniowanie UV. U osób chorych w komórkach skóry, do których dociera promieniowanie UV dochodzi do uszkodzeń DNA. Prowadzi to do obumierania komórek, a także zwiększonej zapadalności na raka skóry. Wynika to z obniżonej zdolności do wycinania dimerów pirymidynowych z DNA.

Nie zreperowane uszkodzenia DNA w komórkach skóry powodują, oprócz efektów letalnych, także różnego typu mutacje genowe i chromosomalne, prowadzące także do powstawania komórek nowotworowych i raka skóry.

9.9. Mutageny chemiczne wywołują różnego typu uszkodzenia DNA

Znanych jest obecnie tysiące związków chemicznych powodujących rozmaite zmiany w strukturze składników DNA i indukujących mutacje. Silnymi mutagenami są różne związki alkilujące, na przykład powszechnie stosowany w indukowanej mutageniezie metanosulfonian metylowy (MMS) czy metanosulfonian etylowy (EMS). Związki te działają na puryny bądź pirymidyny, dołączając do różnych pozycji w pierścieniach grupy alkilowe. Najczęściej alkilacji podlega guanina. Zmodyfikowane zasady mogą być wycinane przez odpowiednie endonukleazy albo podlegać wycinaniu przez specyficzne glikozylazy DNA, co prowadzi do powstawania miejsc apurynowych bądź apirymidynowych, zwanych AP. Miejsca AP rozpoznawane są następnie przez endonukleazy AP i reperowane przez wycinanie i resyntezę.

Innym typem mutagenów chemicznych są analogi zasad, na przykład bromouracyl (BrU) czy 2-aminopuryna (n^2 Pur). Jeśli zostaną one wbudowane do nukleotydów, to w procesie replikacji włączane są do nowo syntetyzowanego łańcucha DNA, bromouracyl na miejsce tyminy, a 2-aminopuryna na miejsce adeniny. Samo włączenie BrU do DNA nie jest mutageniczne ani letalne. Jednak bromouracyl często jest przekształcany w uracyl, który, jako

obcy składnik w DNA, jest następnie wycinany przez specyficzną glikozylazę uracylową DNA z wytwarzaniem miejsc AP.

Bardzo specyficzną grupę chemicznych mutagenów stanowią barwniki akrydynowe, na przykład proflawina czy akryflawina. Związki te są płaskimi cząsteczkami złożonymi z kilku pierścieni. Wnikają one między cząsteczki puryn i pirymidyn w heliksie DNA. Powodują wypchnięcie zasad w łańcuchu DNA i wywołują poślizg polimerazy DNA w czasie procesu replikacji. Indukują delecje bądź addycje nukleotydów, co prowadzi do mutacji typu zmiana ramki odczytu.

Omawiane przykładowo uszkodzenia w DNA, powstające pod wpływem fizycznych czy chemicznych mutagenów oraz procesy prowadzące do ich reperacji, są najlepiej zbadane w organizmach prokariotycznych. W organizmach eukariotycznych, począwszy od drożdży aż do człowieka włącznie, procesy reperacji uszkodzeń DNA są często identyczne lub zbliżone; są one jednak znacznie słabiej poznane.

W środowisku człowieka występują bardzo liczne związki naturalne o działaniu mutagenicznym, a także liczne związki mutageniczne powstające dzięki działalności przemysłowej. Wykrywanie związków mutagenicznych ma istotne znaczenie dla ochrony człowieka przed ich działaniem. Znaczenie tych prac zostało istotnie spotęgowane, gdy wykazano, że bardzo liczne chemiczne mutageny są także karcinogenami i mogą być czynnikiem indukującym powstawanie raka. Jak obecnie wiadomo, proces powstawania raka jest wynikiem wielu kolejnych mutacji w tej samej komórce, zmieniających komórkę normalną w komórkę nowotworową. Badanie różnych związków chemicznych pod kątem ich właściwości mutagenicznych i karcinogennych przeprowadza się za pomocą testów wykrywających różne rodzaje indukowanych mutacji. Często stosowany jest test Amesa wykrywający wpływ mutagenicznych związków chemicznych na komórki bakteryjne. W teście tym bada się częstość rewersji mutanta auktroficznego *Salmonella typhimurium* (niezdolnego do syntezy histydy) do prototrofii. Test jest bardzo czuły, gdyż umożliwia wykrywanie nawet pojedynczych rewertantów (zdolnych do wytwarzania kolonii na pożywce minimalnej) wśród milionów auktroficznych komórek bakteryjnych. Bakterie używane do testu zawierają także mutacje w genach wpływających na przepuszczalność błon bakteryjnych, które umożliwiają wnikania do wnętrza komórek testowanych związków chemicznych. Poza tym bakteryjne komórki zawierają plazmid niosący geny *umuC* i *umuD*, które powodują, iż większość zmian zachodzących w DNA prowadzi do powstawania mutacji. Wiele związków chemicznych wywiera efekty mutageniczne, a zwłaszcza karcinogenne, w organizmach zwierzęcych dopiero w wyniku zmian metabolicznych zachodzących w wątrobie. Związki takie są najpierw aktywowane w wyciągu z wątroby i dopiero następnie ich efekt mutageniczny jest badany na bakteriach. Testy mutageniczności i karcinogenności związków chemicznych przeprowadza się również na komórkach innych niż bakterie mikroorganizmów oraz na komórkach zwierzęcych i na całych organizmach.

9.10. Rekombinacja DNA

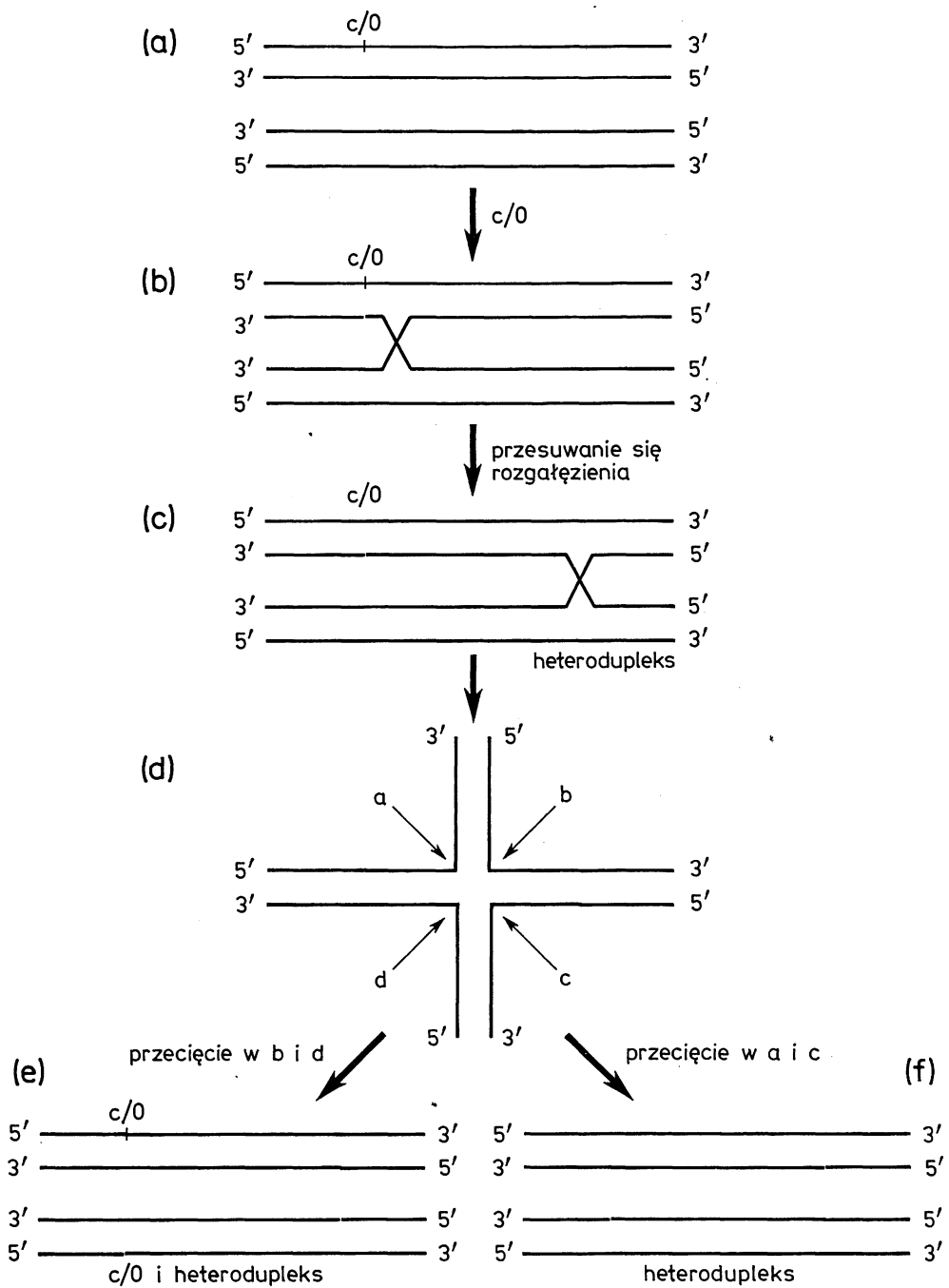
Rekombinacja, czyli zdolność do wymiany odcinków między homologicznymi cząsteczkami DNA jest jedną z podstawowych właściwości żywych organizmów. Rekombinacja spełnia dwie zasadnicze role. Jest podstawowym procesem wymiany genów między chromosomami, prowadzącym do zwiększenia różnorodności genetycznej komórek. Z drugiej zaś strony rekombinacja umożliwia przeżycie organizmów w sytuacjach, gdy na skutek licznych uszkodzeń w obu łańcuchach heliksu DNA ich reperacja przez wycinanie i resyntezę staje się niemożliwa ze względu na brak nie uszkodzonej matrycy. Wtedy rekombinacja z drugą, nie uszkodzoną cząsteczką DNA staje się jedyną możliwością przeżycia komórki.

Oprócz rekombinacji między cząsteczkami DNA o komplementarnych sekwencjach nukleotydowych, zwanej rekombinacją uprawnioną, znany jest także proces rekombinacji nieuprawnionej, gdy rekombinujące cząsteczki mają niekomplementarne sekwencje nukleotydowe. W rekombinacji nieuprawnionej biorą udział odrębne, specyficzne enzymy rozpoznające krótkie, sygnałne sekwencje w obu rekombinujących cząsteczkach.

9.11. Rekombinacja homologiczna (uprawniona) zachodzi między homologicznymi cząsteczkami DNA

Zjawisko crossing-over, czyli wzajemna wymiana odcinków między homologicznymi cząsteczkami DNA wirusów czy bakterii, a także między homologicznymi chromosomami organizmów eukariotycznych, występuje z reguły w mejozie, ale także, chociaż rzadziej, w komórkach somatycznych diploidalnych organizmów eukariotycznych. Efekty genetyczne crossing-over w mejozie u *D. melanogaster* zostały opisane już w latach 30. przez Th. Morgana i jego współpracowników. Morgan zakładał, że w czasie mejozy następuje pęknięcie i wymiana odcinków chromosomów homologicznych (crossing-over).

Tego rodzaju interpretacja była jednak czysto formalna; wyjaśniała wyniki doświadczeń genetycznych. Trzeba jednak pamiętać, że cząsteczki DNA w postaci podwójnych heliksów nie mają żadnych możliwości rozpoznawania komplementarnych sekwencji nukleotydowych. Crossing-over zaś zachodzi między homologicznymi cząsteczkami DNA, dokładnie między tymi samymi parami zasad w obu rekombinujących heliksach. Tak więc w celu wyjaśnienia molekularnych podstaw procesu rekombinacji trzeba założyć, że w rekombinujących cząsteczkach DNA muszą zachodzić pęknięcia łańcuchów DNA. Pośrednio świadczyła o tym obserwacja, że częstość rekombinacji między cząsteczkami DNA, na przykład fagów, jest znacznie zwiększona przez działanie mutagenów fizycznych bądź chemicznych, które indukują pęknięcia łańcuchów DNA czy też wytwarzanie luk w pojedynczych łańcuchach. Jednak



nawet tak uszkodzone cząsteczki DNA nie rekombinują samorzutnie między sobą. W procesie rekombinacji homologicznej biorą udział liczne układy enzymatyczne przeprowadzające wymianę odcinków między cząsteczkami DNA. Bliżej zostały one poznane głównie u *E. coli*, natomiast u organizmów eukariotycznych są one zapewne analogiczne, lecz bliżej nie znane.

9.12. Białko RecA u *E. coli* dopasowuje do siebie komplementarne jednoniciowe DNA pochodzące z odrębnych cząsteczek DNA

U bakterii, w zasadzie haploidalnych, rekombinacja zachodzi w trakcie koniugacji po wprowadzeniu DNA z jednej komórki do drugiej, a także w procesach transformacji i transdukcji. Poza tym w komórkach bakterii może także czasem występować więcej niż jeden chromosom bakteryjny. Enzymem przeprowadzającym rekombinację w komórkach *E. coli* jest białko kodowane przez gen *RecA*. Brak aktywności tego białka powoduje całkowitą niezdolność komórek *E. coli* do rekombinacji. Białko RecA ma właściwość wiązania się z jednoniciowym DNA w sposób niezależny od sekwencji nukleotydowej w ilości jeden polipeptyd na 5 nukleotydów. Kompleks DNA–białko RecA atakuje dwuniciowy heliks drugiej cząsteczki DNA w różnych losowych miejscach, powodując lokalne rozplecenia obu nici heliksu. Jeśli w którymś z zaatakowanych miejsc napotka sekwencję komplementarną, to inicjuje powstawanie mieszańcowego DNA przez łączenie zasad atakującej nici z komplementarnymi zasadami w atakowanym heliksie DNA. Tak więc białko RecA bierze czynny udział w odnajdywaniu komplementarnych sekwencji między rekombinującymi cząsteczkami DNA. Białko RecA ma również właściwości ATPazy; w momencie odnalezienia sekwencji komplementarnej powoduje dalsze rozkręcanie heliksu i wydłużanie powstającego mieszańcowego DNA.

Rys. 9.6. Rekombinacja między homologicznymi cząsteczkami DNA oznaczonymi kolorem czerwonym i czarnym. (a) Dwie homologiczne cząsteczki przed rekombinacją. (b) W wyniku rekombinacji przy udziale białka *recA* powstaje ich krzyżowe połączenie powiązane z wymianą odcinków koniugujących cząsteczek, określane jako *crossing-over* (c/o). (c) W wyniku procesu, zwanego przesuwaniem się rozgałęzienia, który również zachodzi przy udziale białka *RecA*, następuje wytwarzanie odcinków mieszańcowego DNA, zwanych heterodupleksami. (d) Jako produkt przejściowy rekombinacji powstaje figura krzyżowa łącząca obie rekombinujące cząsteczki, zwana figurą Hollidaya. Figura Hollidaya ulega następnie przecięciu w miejscu skrzyżowania przez specyficzne endonukleazy i powstające wolne końce łączą się w miejscach oznaczonych strzałkami a, b, c, d. (e) Jeżeli przecięcia i ponowne połączenia nastąpią w miejscach b oraz d, to powstaną dwie zrekombinowane cząsteczki DNA z wymianą odcinków w miejscu *crossing-over* oraz z sąsiadującym obszarem heterodupleksu. (f) Jeżeli przecięcia i ponowne połączenia nastąpią w miejscach a oraz c, to powstaną dwie cząsteczki DNA zawierające jedynie obszar heterodupleksu

Po odnalezieniu się, z udziałem białka RecA, miejsc komplementarnych między rekombinującymi cząsteczkami DNA powstaje przejściowy produkt wymiany nici między rekombinującymi, homologicznymi cząsteczkami DNA. W wyniku przecinania i ponownego łączenia się nici na krzyż powstaje figura krzyżowa (tzw. struktura Hollidaya). Miejsce skrzyżowania się nici przesuwają się (ang. branch migration), powstaje odcinek mieszańcowego DNA (heterodupleks) o długości kilku tysięcy par nukleotydów (rys. 9.6).

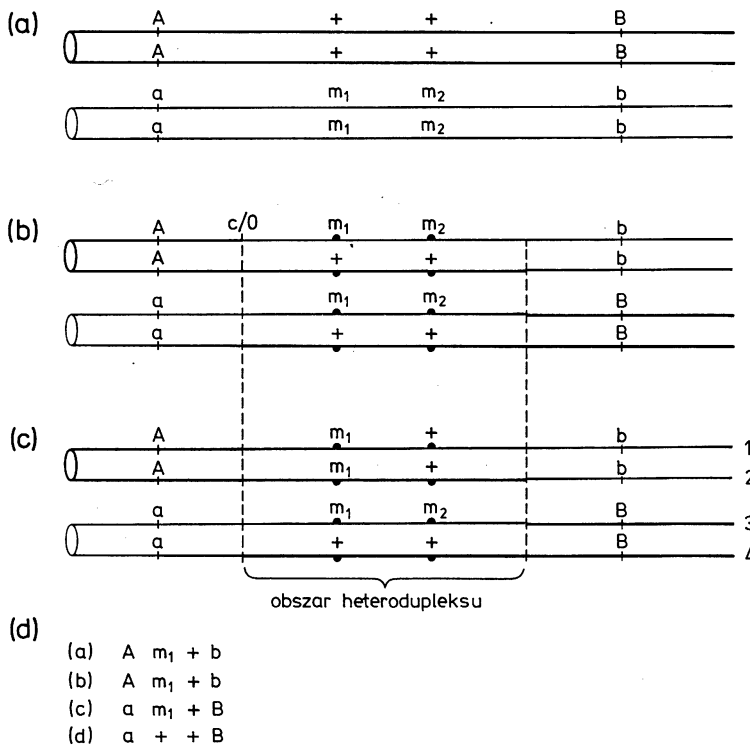
Figura Hollidaya zostaje następnie przecięta, co prowadzi do powstania dwóch oddzielnych zrekombinowanych cząsteczek DNA. W procesie tym biorą udział bliżej nie znane endonukleazy. W zależności, które z dwóch łańcuchów zostaną przecięte, mogą powstać cząsteczki nie zrekombinowane, zawierające jedynie odcinek mieszańcowego DNA (heterodupleks) bądź też nastąpi właściwy crossing-over i powstaną zrekombinowane cząsteczki z wymienionymi odcinkami DNA oraz z odcinkiem mieszańcowym DNA.

W procesie rekombinacji genetycznej, oprócz białka RecA, odgrywającego podstawową rolę w dopasowywaniu komplementarnych sekwencji między rekombinującymi cząsteczkami DNA, bierze udział wiele innych enzymów kodowanych przez odrębne geny. U *E. coli* geny *recB*, *recC* i *recD* kodują białka o właściwościach endonukleolitycznych, które rozpoznają w DNA sekwencje 8-nukleotydowe GCTGCTGG (jest ich ok. 1000 w genomie *E. coli*) i nacinają w tym miejscu jeden z łańcuchów DNA stwarzając obszar jednoniciowy, do którego może dołączyć się białko RecA. Mutacje w tych genach zmniejszają częstość rekombinacji niemal stokrotnie. Poza tym w procesie rekombinacji bierze udział wiele innych enzymów typu endonukleaz, a także polimeraza DNA I oraz ligaza DNA reperujące jednoniciowe odcinki w DNA, które powstają w wyniku wycinania odcinków łańcucha DNA przez kompleks RecBCD. Większość omawianych tu etapów procesu rekombinacji homologicznej u *E. coli* została ostatnio przeprowadzona w układach *in vitro*, a powstające w tych warunkach charakterystyczne struktury Hollidaya były uwidocznione na zdjęciach z mikroskopu elektrycznego.

9.13. Heterodupleksy powstające w procesie rekombinacji są przyczyną zjawiska konwersji genów

Jeśli w procesie rekombinacji biorą udział cząsteczki DNA różniące się jedną czy kilkoma mutacjami punktowymi w pobliżu miejsca crossing-over, to w powstającym odcinku mieszańcowego DNA heterodupleksu występować będą pary niewłaściwie sparowanych zasad, odpowiadające miejscom mutacji punktowych. Takie niekomplementarne pary zasad mogą być następnie reperowane przez losowe wycinanie jednej z dwóch niewłaściwie sparowanych zasad w opisanym wyżej procesie wycinania i resyntezy.

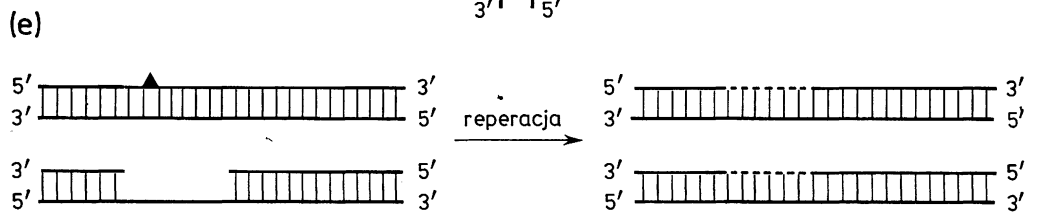
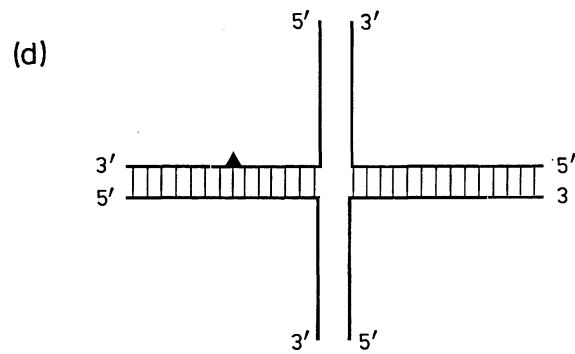
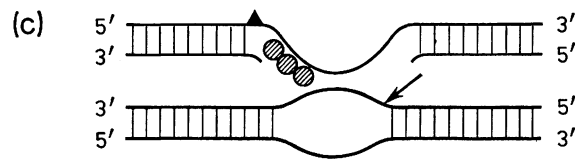
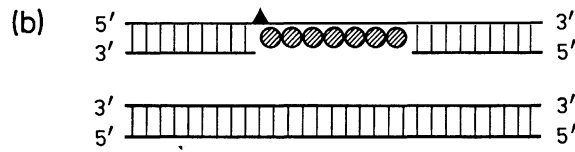
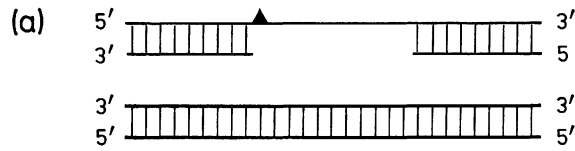
Proces ten można dokładnie prześledzić u niektórych grzybów z grupy workowców (*Ascomycetes*), na przykład u drożdży, u których w wyniku mejozy powstają cztery produkty (tetrady) w postaci spor w jednym worku (*ascus*). Jeżeli zanalizujemy skład genetyczny poszczególnych spor tetrady, to stwierdzimy, że segregacja alleli genów flankujących miejsce zajścia *crossing-over* jest z reguły symetryczna. To znaczy, że allele genów + (typu dzikiego) i *m* (typu



Rys. 9.7. Konwersja genów jest wynikiem reperacji niewłaściwie sparowanych zasad w heterodupleksie. (a) Dwie cząsteczki DNA oznaczone kolorem czarnym i czerwonym o markerach genetycznych A +^{*m*₁} + ^{*m*₂}B i a *m*₁ *m*₂ b. (b) W wyniku rekombinacji i *crossing-over* (c/o) markery zewnętrzne A i a oraz B i b ulegną rekombinacji. Markery + i *m*₁ oraz + i *m*₂ znajdują się w powstającym heterodupleksie i wobec tego w ich loci występować będą pary niewłaściwie połączonych zasad. (c) W wyniku naprawy niewłaściwie sparowanych zasad w heterodupleksie w locus *m*₁ zaszła konwersja + → *m*₁, a w drugim locus w kierunku odwrotnym *m*₂ → +. (d) Po drugim podziale mejotycznym w worku powstaną cztery spory o następujących genotypach:

spora 1 A *m*₁ + b
 spora 2 A *m*₁ + b
 spora 3 a *m*₁ + ^{*m*₂}B
 spora 4 a + + B

A więc leżące poza heterodupleksem markery A i a oraz B i b będą segregowały w stosunku normalnym 2:2, natomiast allele *m*₁ i +^{*m*₁} czy *m*₂ i +^{*m*₂} będą segregowały w stosunku 3*m*₁ : 1 +^{*m*₁} bądź 1*m*₂ : 3 +^{*m*₂}



zmutowanego) segregują w stosunku $2+ : 2m$. Jeśli jednak zanalizujemy segregację alleli leżących blisko siebie w obrębie wytworzonego heterodupleksu, to stwierdzimy, że mogą one segregować asymetrycznie, tworząc worki typu $3+ : 1m$ lub $1+ : 3m$. Zjawisko to zostało nazwane konwersją genów. Podczas crossing-over zjawisko konwersji genów zachodzi tylko na niewielkim odcinku DNA, w którym w wyniku koniugacji powstał heterodupleks. Allele genów, leżące poza obszarem heterodupleksu, segregują z reguły symetrycznie. Zjawisko konwersji genów jest w rzeczywistości wynikiem reparaacji niewłaściwie sparowanych zasad w obszarze heterodupleksu. Ponieważ obie nici DNA są już zmetylowane, wycinanie jednej zasady z niewłaściwie sparowanej pary zasad jest losowe i powoduje konwersję alleli w obu kierunkach, mniej więcej z jednakową częstością. To też konwersje typu $m \rightarrow +$ czy $+ \rightarrow m$ powodują w tetradach asymetryczne segregacje $3+ : 1m$ czy $1+ : 3m$ (rys. 9.7). Tak więc wzajemnej symetrycznej segregacji alleli leżących poza heterodupleksem towarzyszyć może zjawisko konwersji genów w wyniku procesów reparaacyjnych zachodzących w heterodupleksie. To wskazuje, że w procesie crossing-over u organizmów eukariotycznych mamy do czynienia z mechanizmami podobnymi do obserwowanych u *E. coli* z tym, że dotychczas ich podstawy molekularne nie są jeszcze w pełni wyjaśnione.

9.14. Udział rekombinacji w procesach reparaacji DNA

Jeśli powstające po napromieniowaniu UV fotodimery pirymidynowe są bardzo liczne, to omawiane poprzednio mechanizmy: naprawa przez fotoreaktywację czy też wycinanie i reparaacja luk powstających w DNA, nie są w stanie usunąć wszystkich uszkodzeń. Jeżeli uszkodzony DNA wchodzi w następny cykl replikacyjny, polimeraza DNA III dochodząc do miejsca, w którym w łańcuchu matrycowym znajduje się fotodimer, przerywa replikację i rozpo-

Rys. 9.8. Postreplikacyjna naprawa przez rekombinację. (a) W cząsteczce oznaczonej kolorem czerwonym na skutek obecności nie zreperowanego dimeru pirymidynowego w czasie replikacji powstaje luka w nowo syntetyzowanej nici. Druga homologiczna oznaczona kolorem czarnym cząsteczka jest nie uszkodzona i normalnie zreplikowana. (b) Znajdujący się naprzeciw powstałej luki jednoniciowy DNA łączy się z białkiem RecA. (c) Powiązane z jednoniciowym DNA białko RecA atakuje homologiczną cząsteczkę, powodując lokalne rozplecenie heliksu i wytworzenie heterodupleksu. Jednocześnie nukleazy powodują nacięcie nici docelowej (czarnej). Jeżeli obie homologiczne nici mają wolne końce, to następuje rekombinacja typu crossing-over i wytwarzanie heterodupleksu w wyniku przesuwania rozgałęzienia przy udziale białka RecA. (d) Powstaje figura krzyżowa Hollidaya, w której naprzeciw dimeru pirymidynowego w nici oznaczonej kolorem czerwonym jest nie uszkodzony odcinek nici oznaczonej kolorem czarnym. Również luka w drugiej nici czerwonej będzie połączona z odcinkiem nici oznaczonej kolorem czarnym. (e) Powstające po przecięciu figury Hollidaya dwie zrekombinowane cząsteczki DNA mogą już być zreperowane przez wycięcie dimeru i syntezę brakującego odcinka w drugiej nici przeprowadzaną przez polimerazę DNA I przy wykorzystaniu matrycy z drugiej nici homologicznej

czyną ją dalej (na przykład od miejsca startu następnego fragmentu Okazaki) pozostawiając lukę w nowo syntetyzowanym łańcuchu DNA. W wyniku nieciągłości replikacji DNA zostaje pofragmentowany, co prowadzi ostatecznie do śmierci komórki. W tej sytuacji jedynym wyjściem prowadzącym do zreperowania uszkodzonej cząstki DNA jest rekombinacja z drugim nie uszkodzonym heliksem DNA (rys. 9.8). W komórkach mutantów *E. coli Reca⁻*, *UVR ABCD⁻* niezdolnych do rekombinacji i reperacji przez wycinanie dimerów po napromieniowaniu UV, replikacja DNA prowadzi do powstawania fragmentów DNA o długościach odpowiadających odległościom między dimerami wytworzonymi w DNA. W takich mutantach obecność dwóch–trzech dimerów w cząsteczce DNA jest już letalna, podczas gdy w szczepie dzikim komórka potrafi usunąć około 50 dimerów pirymidynowych. Również podwójne pęknięcia w obu łańcuchach heliksu wywoływane promieniowaniem jonizującym czy niektórymi mutagenami chemicznymi są reperowane podczas rekombinacji z drugim nie uszkodzonym homologicznym dupleksem DNA. Powstające na końcach podwójnego pęknięcia odcinki jednoniciowe po wejściu w kontakt z białkiem RecA mogą następnie atakować drugą homologiczną cząsteczkę DNA i w wyniku dwóch crossing-over restytuować dwa normalne dupлексы DNA, po wypełnieniu powstających luk przez polimerazę DNA I i ligację przez DNA ligazę.

9.15. Mutageniczny system SOS naprawy DNA u *E. coli*

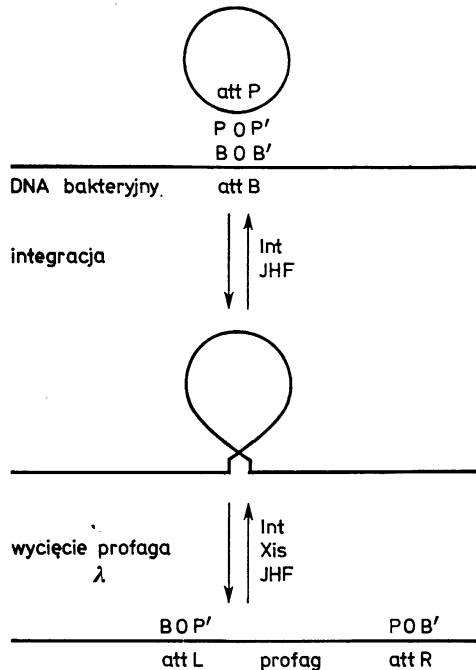
Dotychczas omawiane procesy reperacji uszkodzeń w DNA były przeprowadzane przez enzymy produkowane konstytutywnie w komórkach *E. coli*. Ich aktywność w komórkach utrzymuje się na określonym poziomie i mogą one zreperować tylko ograniczoną liczbę uszkodzeń w DNA w okresie międzypodziałowym komórek. Jeśli jednak pod wpływem mutagenu powstaną bardzo liczne uszkodzenia DNA tak, iż systemy reperacyjne nie są w stanie ich w pełni eliminować, to w DNA powstają liczne pęknięcia i następuje fragmentacja cząsteczek DNA. W tej krytycznej sytuacji następuje indukcja systemu, zwanego SOS. Indukcja dotyczy kilkunastu różnych genów biorących udział w rekombinacji i reperacji DNA. Wśród indukowanych genów jest też gen *recA*. U *E. coli* występuje gen *LexA* kodujący białko represorowe, które hamuje nie tylko produkcję samego represora LexA, ale także białka RecA i kilkunastu innych białek związanych z rekombinacją i reperacją DNA, wiążąc się z określoną sekwencją sygnałową w obszarach promotorowych genów kodujących te białka. Indukcja wynika z inaktywacji represora LexA na skutek proteolitycznego przecięcia tego polipeptydu. Przecięcia dokonuje kompleks białka RecA z jednoniciowymi fragmentami DNA, powstający w momencie zahamowania replikacji DNA i jego zaczynającej się degradacji. W wyniku proteolizy represora następuje derepresja genu *RecA* i gwałtowny wzrost ilości białka

RecA w komórce. Jednocześnie indukcji podlega ekspresja innych genów reprimowanych przez represor LexA, jak na przykład *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD* oraz innych genów o bliżej nieznanym funkcjach, jak *umuC*, *umuD*. Być może geny *umuC* i *umuD* kodują białka, które nadają polimerazie DNA nowe właściwości losowego włączania zasad do nowo syntetyzowanego łańcucha DNA, gdy w łańcuchu matrycowym występuje luka czy na przykład dimery pirymidynowe. Reakcja SOS zwiększa istotnie przeżywalność komórek po działaniu mutagenu w wyniku wzmożonej rekombinacji, a także wypełniania luk występujących w DNA mimo braku nie uszkodzonej matrycy. Oczywiście taki proces reperacji DNA powoduje istotny wzrost częstości mutacji w wyniku losowego włączania zasad i kontynuacji syntezy DNA mimo braku właściwej matrycy. Do tej pory system reperacji SOS został opisany jedynie u bakterii.

9.16. Rekombinacja może zachodzić także między niehomologicznymi cząsteczkami DNA

Rekombinacja ogólna, czyli homologiczna, może zachodzić w dowolnym miejscu między dwiema cząsteczkami DNA o homologicznych sekwencjach nukleotydowych. Szczególnym przypadkiem rekombinacji jest tzw. rekombinacja zlokalizowana, w której biorą udział cząsteczki o różnych sekwencjach nukleotydowych, mające jedynie niewielkie odcinki homologiczne, między którymi zachodzi rekombinacja. Jednym z dobrze poznanych przykładów takiej rekombinacji jest integracja DNA faga λ w postaci profaga do chromosomu *E. coli*. Bakterie zawierające profaga zwane są lizogenicznymi. W bakteriach lizogenicznych istniejący w ich genomie profag λ może zostać w procesie odwrotnym do jego integracji wycięty z chromosomu i jako niezależny fag może rozpoczynać cykl lityczny (rys. 9.9).

Rekombinacja zachodzi między specyficznymi miejscami przyczepu, zwanymi *attB* w DNA bakterii i *attP* w DNA faga. Miejsca *attB* i *attP* mają wspólną, homologiczną 15-nukleotydową sekwencję, zwaną *O*, która jest oflankowana po obu stronach sekwencjami *B* i *B*¹ u bakterii i *P* oraz *P*¹ u faga. W procesie integracji kolistej cząsteczki faga do chromosomu bakteryjnego biorą udział dwa enzymy. Jeden, zwany integrazą, jest kodowany przez fagowy gen *int*, a drugi, zwany IHF, jest kodowany przez gen bakteryjny. Integraza fagowa wspomagana przez białko IHF wiążące się z obszarami flankującymi *B* i *P*, przecina sekwencje *O* faga i bakterii w dwóch miejscach, przesuniętych w stosunku do siebie o 7 nukleotydów. Powstające wolne końce DNA fagowego i bakteryjnego są następnie łączone ze sobą. W ten sposób klista cząsteczka DNA faga zostaje precyzyjnie zintegrowana w postaci liniowego profaga w miejscu *attB* chromosomu *E. coli*. Tak więc w odróżnieniu od rekombinacji ogólnej, rekombinacja zlokalizowana zachodzi w ściśle określonym obszarze DNA rozpoznawanym przez specyficzne enzymy. Wycinanie



Rys. 9.9. Włączanie (integracja) i wycinanie DNA faga lambda (λ) z DNA chromosomu *E. coli*. Kolistą cząsteczką faga ma miejsce przyczepu *attP* złożone z odcinków POP'. W DNA *E. coli* występuje analogiczne miejsce *attB* o strukturze BOB'. Oba miejsca przyczepu mają wspólną 15-nukleotydową sekwencję rdzeniową O. Enzymy Int i IHF przeprowadzają zlokalizowaną rekombinację wyniku dwóch przesuniętych nacięć w obszarach O fagowym i bakteryjnym. Po połączeniu krzyżowym wolnych końców naciętych nici zachodzi integracja DNA fagowego do DNA bakteryjnego w postaci liniowej struktury profaga λ . Przeciwny proces wycinania profaga λ z DNA bakterii przeprowadzają trzy enzymy Int, Xis i IHF

profaga z DNA *E. coli* odbywa się w analogiczny sposób, z tym, że oprócz dwóch enzymów biorących udział w integracji profaga bierze także udział enzym kodowany przez fagowy gen *xis*.

9.17. Ruchome elementy genetyczne, czyli transpozony

Genomy różnych organizmów wykazują znaczny stopień stałości, co umożliwia ustalenie map genetycznych obrazujących pozycje genów w chromosomach. Nawet odrębne, ale pokrewne gatunki, jak na przykład *E. coli* i *S. typhimurium* mają bardzo zbliżone układy liniowe genów utrzymujące się od czasu ich niezależnej ewolucji od wspólnego przodka. Istotne ewolucyjne zmiany w strukturze genomów wymagają długiego czasu. Wykryto jednak u wielu różnych organizmów występowanie elementów genetycznych zdolnych do zmiany miejsca położenia w genomie, które ogólnie nazywa się trans-

pozonami. Są to odcinki DNA złożone z setek czy tysięcy par nukleotydów, które ulegają przemieszczaniu się, czyli transpozycji, i mogą wywoływać duże zmiany w strukturze genomów, jak na przykład inwersje, delecje czy duplikacje dużych fragmentów DNA. Proces transpozycji związany z wycinaniem i integracją transpozonów jest wynikiem rekombinacji między niehomologicznymi sekwencjami występującymi w transpozonach i miejscach ich integracji

Tabela 9.2. Niektóre transpozony bakteryjne i organizmów eukariotycznych

Symbol elementu	Liczba par zasad	Liczba par zasad w sekwencjach terminalnych p — prostych, o — odwróconych	Gatunek, w którym występuje transpozon	Liczba par zasad w sekwencji docelowej	Uwagi
<i>IS1</i>	768	23a	<i>E. coli</i> , K12	9	koduje transpozazę
<i>IS2</i>	1327	41o	<i>E. coli</i> K12	5	koduje transpozazę
<i>Tn3</i>	4957	38o	<i>E. coli</i>	5	zawiera gen oporności na ampicylinę
<i>Tn5</i>	5700	IS50o (1531 par zasad)	<i>E. coli</i> , plazmid <i>R</i>	9	zawiera gen oporności na kanamycynę
<i>Tn9</i>	2500	IS1p	<i>E. coli</i> , plazmid <i>R</i>	9	zawiera gen oporności na chloramfenikol
<i>AC</i>	4563	11o	kukurydza	8	powoduje pękanie chromosomów jako niekompletny element D_1
<i>Tc1</i>	1610	54o	<i>Caenorhabditis elegans</i>	2(TA)	
<i>P</i>	2900	31o	<i>D. melanogaster</i>	8	wywołuje zaburzenia linii komórek płciowych
retrotranspozony					
<i>Ty</i>	5600	250p (δ)	drożdże	5	transpozycja przez mRNA i odwrotną transkrypcję na DNA
<i>copia</i>	5000	300p	<i>D. melanogaster</i>	4–5	transpozycja przez mRNA i odwrotną transkrypcję na DNA

w DNA. Taką rekombinację nazywa się rekombinacją nieuprawnioną. Jest ona sterowana przez specyficzne enzymy — transpozazy. W genomach różnych organizmów wykryto dziesiątki różnych rodzajów transpozonów, różniących się strukturą genetyczną (tab. 9.2). W komórkach transpozony jednego typu mogą występować w różnej liczbie kopii — od kilku do kilkunastu. Między homologicznymi sekwencjami tych samych transpozonów znajdujących się w genomie w różnych położeniach mogą zachodzić rekombinacje homologiczne typu crossing-over, prowadzące do znacznych zmian w strukturze genomu. Transpozony mogły odgrywać istotną rolę w różnicowaniu struktury genomów, jako jeden z czynników ewolucji nowych gatunków. Transpozony zostały wykryte po raz pierwszy metodami genetycznymi w kukurydzy przez Barbarę McClintok w latach 50. Dopiero jednak wykrycie transpozonów u bakterii w kilkanaście lat później doprowadziło do poznania zarówno ich struktury molekularnej, jak i przebiegu procesu transpozycji.

9.18. Transpozony bakteryjne

U bakterii występuje wiele transpozonów o stosunkowo prostej strukturze, nazwanych sekwencjami insercyjnymi — *IS*. Oznacza się je symbolami *IS1*, *IS2* itd. w zależności od kolejności ich wykrywania. Wspólną właściwością sekwencji *IS* jest występowanie na ich obu końcach powtórzonych identycznych lub prawie identycznych sekwencji o odwróconych polarnościach, zwanych terminalnymi odwróconymi powtórzeniami.

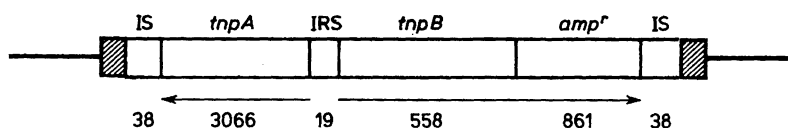
Na przykład, *IS2* złożona jest z 1327 par nukleotydów i na końcach ma terminalne, odwrócone powtórzenia, złożone z 41 par nukleotydów. Odcinek DNA leżący między terminalnymi powtórzeniami zawiera sekwencję kodującą polipeptyd transpozazy *IS2*, specyficznego enzymu przeprowadzającego transpozycję *IS2*. Transpozaza rozpoznaje obie terminalne sekwencje *IS2* oraz krótką sekwencję złożoną z 5 nukleotydów w chromosomie bakteryjnym. Następnie transpozaza nacina obie nici DNA na obu końcach *IS2* oraz w sekwencji docelowej, przy czym w tym wypadku nacięcia są w obu niciach DNA przesunięte o 5 par nukleotydów. Po połączeniu wolnych końców łańcuchów DNA z przesuniętymi nacięciami w sekwencji docelowej następuje transpozycja *IS2* do nowego miejsca w genomie. Z procesem transpozycji *IS2* jest powiązana zawsze duplikacja 5-nukleotydowej sekwencji docelowej. Po transpozycji *IS2* w jej nowym położeniu jest oflankowana rozpoznawaną sekwencją docelową, która przed insercją *IS2* występowała tylko w jednej kopii. Proces ten jest oczywiście wynikiem dosyntetyzowania brakujących 5-nukleotydowych sekwencji po obu stronach *IS2* przez polimerazę DNA. Jest to właściwość ogólna wszelkich transpozonów, iż przesunięte o kilka (5–7) nukleotydów nacięcia w rozpoznawanych przez transpozazę sekwencjach docelowych w DNA biorcy zostają w wyniku transpozycji zreplikowane i flankują transpozon włączony w nowym położeniu w DNA biorcy. Ruchome elementy

typu *IS* mogą być włączane w bardzo różne miejsca chromosomu *E. coli*, chociaż często występują „gorące miejsca”, w których są one włączane z dużą częstością. Na przykład *IS2* jest często włączana do operonu *gal* *E. coli* w pozycji promotoro-wo-operatorowej i powoduje występowanie fenotypu *gal*⁻, a więc mutanta niezdolnego do wzrostu na galaktozie. Mutanty wywołane insercją transpozonu są nietrwałe i rewertują z częstością znacznie wyższą niż mutacje punktowe, w wyniku częstego wycinania i transpozycji *IS2* w inne miejsca genomu.

9.19. Bardziej złożone bakteryjne transpozony typu *Tn*

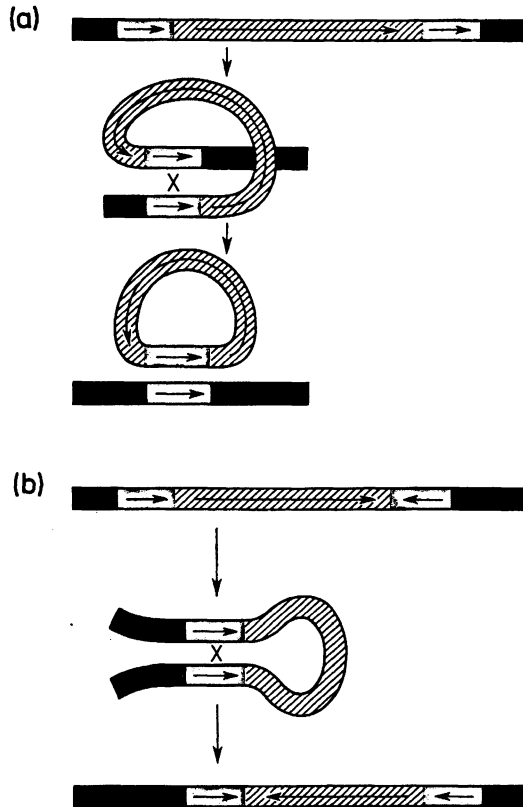
Transpozony typu *Tn* są dłuższe od *IS*; na końcach mają odwrócone całe jednostki *IS* lub własne specyficzne terminalne powtórzenia o tej samej lub odwrotnej polarności. W części środkowej między terminalnymi powtórzeniami występują geny kodujące enzymy, które przeprowadzają transpozycję, a także inne geny nie związane z transpozycją. Najlepiej zostały poznane transpozony *E. coli*, przenoszące geny oporności na różne antybiotyki, jak: penicylina, ampicylina, tetracyklina itp. Jednostki *Tn* występują często w plazmidach, które nadają bakteriom oporność na różne antybiotyki. W wyniku transpozycji mogą one być przenoszone także do chromosomów bakteryjnych.

Przykładem transpozonu o stosunkowo prostej budowie może być *Tn3*. Składa się on z obszaru centralnego o długości ok. 5000 par nukleotydów i ma na obu końcach powtórzone i odwrócone sekwencje terminalne złożone z 38



Rys. 9.10 Struktura transpozonu *Tn3*. Czerwonym kolorem jest oznaczony DNA bakterii. Pięcionukleotydowa sekwencja docelowa rozpoznawana przez transpozazę *Tn3* flankuje z obu stron włączony do DNA bakterii transpozon *Tn3*. Na obu końcach transpozonu *Tn3* znajdują się powtórzone i odwrócone sekwencje *IS* złożone z 38 par zasad. Wewnątrz transpozonu znajdują się trzy geny *tnpA*, *tnpB* i *amp^r* kodujące odpowiednio transpozazę, represor transpozazy z jednoczesną aktywnością resolwazy oraz β -laktamazę nadającą bakterii oporność na β -laktamowe antybiotyki, jak na przykład ampicylina. Strzałki oznaczają kierunek transkrypcji. Liczby oznaczają długość odcinków w parach nukleotydów. Wewnętrzny odcinek nie kodujący, zwany *IRS* (wewnętrzny odcinek resolucji), obejmuje 19 par zasad między genami *tnpA* i *tnpB*

par nukleotydów. W części centralnej występują trzy geny *tnpA*, *tnpB* i *ampR* (rys. 9.10). Gen *tnpA* koduje transpozazę, gen *tnpR* koduje białko o podwójnej funkcji represora transkrypcji genu *tnpA* oraz tak zwanej resolwazy, biorącej udział w procesie transpozycji i wreszcie gen *ampR* koduje β -laktamazę, nadającą bakterii oporność na ampicylinę. Transpozaza rozpoznaje odwrócone



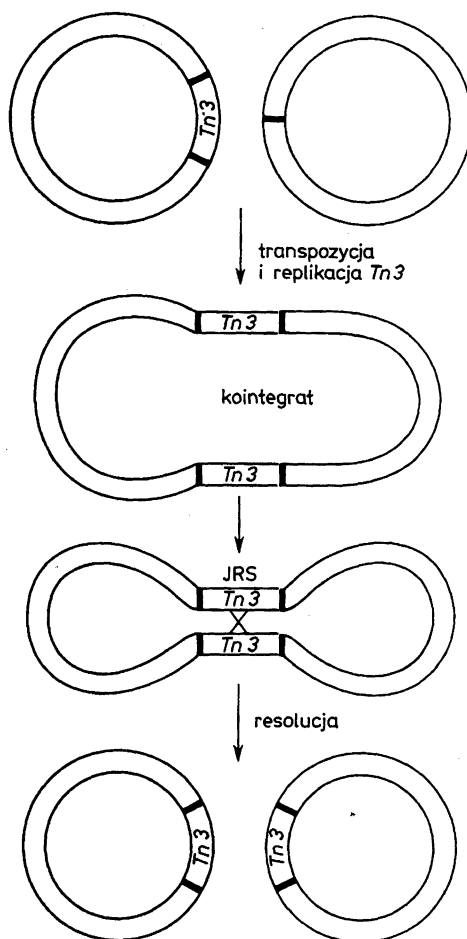
Rys. 9.11. Efekty rekombinacji homologicznej między transpozonomi. (a) Wzajemna homologiczna rekombinacja między prostymi powtórzeniami prowadzi do wycięcia (delecji) odcinka DNA leżącego między powtórzeniami. Wycięty odcinek tworzy strukturę kolistą z jednym powtórzeniem. (b) Rekombinacja wzajemna między dwoma homologicznymi sekwencjami o różnej orientacji powoduje odwrócenie (inwersję) odcinka DNA leżącego między nimi

sekwencje termiinalne *Tn3* oraz 5-nukleotydową sekwencję docelową w miejscu, w którym zachodzi transpozycja. W czasie transpozycji 5-nukleotydowa sekwencja zostaje nacięta oraz następnie zreplikowana i flankuje *Tn3* w jego nowym położeniu w genomie bakterii. Produkt genu *tnR*, jako represor transkrypcji, wiąże się z 19-nukleotydowym odcinkiem *res* leżącym między genami *tnpA* oraz *tnpR* i blokuje transkrypcję obu genów, których promotory znajdują się po prawej i lewej stronie obszaru *res*. W wyniku blokady obu promotorów poziom białek kodowanych przez oba geny jest niski, co ogranicza częstość transpozycji *Tn3*. Transpozycja *Tn3* w inne miejsce w tym samym chromosomie lub do odrębnej cząsteczki DNA (na przykład plazmidowej) zachodzi w analogiczny sposób, jak przy transpozycji *IS2*.

Transpozycja polega albo na wycięciu transpozozonu z jednej pozycji w DNA i integracji w nowym położeniu, w którym transpozaza rozpoznaje specyficzną 5-nukleotydową sekwencję docelową, albo też na zreplikowaniu całego transpozozonu i wtedy tylko jego nowa kopia zostaje włączona w nowym położeniu.

Będzie to wtedy transpozycja replikatywna, w której liczba kopii transpozonu w komórce wzrasta.

Między dwoma transpozonomi o tej samej sekwencji nukleotydu mogą zachodzić rekombinacje homologiczne typu crossing-over. Jeśli dwa transpozony są zintegrowane w tej samej cząsteczce DNA w jednakowej orientacji, to proces rekombinacji prowadzi do delekcji odcinka DNA oddzielającego dwa transpozony (rys. 9.11). W przypadku rekombinacji między transpozonomi włączonymi do chromosomu w odwrotnej orientacji dochodzi do inwersji obszaru DNA leżącego między dwoma transpozonomi. Jeśli transpozycja zachodzi między dwoma kolistymi transpozonomi, to następuje fuzja obu cząsteczek i wytworzenie tak zwanego kointegratu.



Rys. 9.12. Transpozycja *Tn3* między dwoma replikonami związana z replikacją całego transpozonu. W wyniku replikacyjnej transpozycji *Tn3* z jednego replikonu do drugiego powstaje, jako forma przejściowa, kointegrat z połączonych razem dwóch replikonów. Po rekombinacji zachodzącej w kointegracie między dwoma *Tn3* następuje ich rozdział z udziałem resolwazy kodowanej przez gen *tnpR*, rozpoznającej przesunięte miejsca nacięć w rejonie IRS

Zarówno konserwatywna, jak i replikatywna transpozycja mogą być inicjowane w podobny sposób. Pierwszym etapem jest spowodowanie przez transpozazę czterech jednoniciowych nacięć zarówno w DNA dawcy transpozonu, jak i w DNA biorcy (sekwencji docelowej transpozycji). Są to dwa nacięcia na obu końcach transpozonu oraz dwa nacięcia przesunięte o 5 czy 9 nukleotydów w miejscu docelowym transpozycji. Po krzyżowym połączeniu powstałych wolnych końców w DNA integracja jest zawsze związana z doreplikowaniem 5–9-nukleotydowych odcinków między przesuniętymi miejscami nacięć w sekwencji docelowej (w przypadku prostego wycięcia transpozonu) lub też replikacja obejmuje cały transpozon (w przypadku replikatywnej transpozycji).

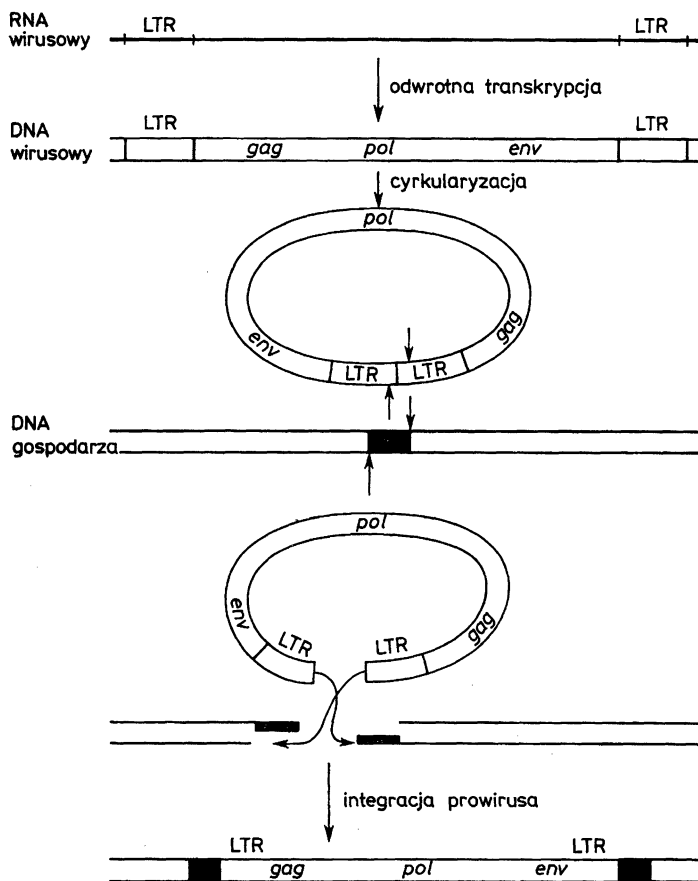
W przypadku replikatywnej transpozycji między dwoma kolistymi replikonami następuje wytworzenie kointegratu łączącego DNA obu replikonów (rys. 9.12). Kointegrat jest etapem przejściowym zachodzącej transpozycji. Po jego powstaniu zachodzi rozdzielenie połączonych replikonów w procesie zwanym resolucją. Proces ten polega na homologicznej rekombinacji między dwoma 19-nukleotydowymi sekwencjami *res*, występującymi w transpozonie *Tn3* między genami *tnpA* i *tnpR*. Rekombinacji dokonuje białko kodowane przez gen *tnpR*, które oprócz właściwości represorowych ma właściwości specyficznej endonukleazy przecinającej sekwencję *res*. W ten sposób połączone w kointegracie dwa replikony zostają rozdzielone i oba mają po jednej kopii transpozonu, bez wycięcia transpozonu z jego poprzedniego miejsca w cząsteczce DNA dawcy.

9.20. Niektóre transpozony mają właściwości zbliżone do retrowirusów

W organizmach eukariotycznych wykryto transpozony o strukturze i sposobie przemieszczania się podobnym do transpozonów bakteryjnych. Ponadto w organizmach eukariotycznych opisano odrębny typ transpozonów, nazywanych retrotranspozonami. Retrotranspozony, podobnie jak retrowirusy, przechodzą w cyklu transpozycji przez RNA, który następnie w wyniku działania odwrotnej transkryptazy jest przepisany na DNA. Mają one na obu końcach powtórzone sekwencje terminalne, które umożliwiają ich integrację w różnych miejscach DNA. Retrotranspozony mają niektóre geny zbliżone do genów retrowirusów, jak na przykład gen kodujący białka odwrotnej transkryptazy. Od retrowirusów różnią się przede wszystkim tym, że nigdy nie występują poza komórką jako infektywne cząstki wirusowe.

9.21. Integracja retrowirusów do chromosomów gospodarza

Genom retrowirusów składa się z łańcuchów RNA mających długie terminale powtórzenia (LTR). Po przeprowadzeniu za pomocą odwrotnej transkryptazy zostaje on włączony do chromosomu gospodarza jako liniowy



Rys. 9.13. Integracja DNA retrowirusowa do DNA gospodarza. Genom wirusa w postaci cząsteczki RNA z dwoma długimi, terminalnymi powtórzeniami (LTR) zostaje najpierw przeprowadzony w dwuniciową cząsteczkę DNA w wyniku działania odwrotnej transkryptazy kodowanej przez wirusowy gen *pol*. Wirusowa cząsteczka DNA zostaje następnie przeprowadzona w formę kołistą przez połączenie obszarów LTR. W kolejnym etapie procesu integracji enzym, zwany integrazą, kodowany również przez wirusowy gen *pol* dokonuje przesuniętych nacięć w rejonach LTR DNA wirusowego i w miejscu integracji z DNA gospodarza. Wolne końce DNA wirusowego i gospodarza zostają ze sobą połączone, co prowadzi do włączenia liniowego prowirusa do DNA gospodarza. W trakcie integracji 5-nukleotydomowa sekwencja w DNA gospodarza zostaje zreplikowana i flankuje DNA włączonego prowirusa

prowirus. Prowirus zawiera trzy podstawowe geny: *gag* — kodujący białkową część tworząc nukleoproteinowy rdzeń wirusa, *pol* — kodujący białko, które ma właściwości odwrotnej transkryptazy, a także właściwości proteazy, RNazy oraz integrazy i wreszcie trzeci gen *env* — kodujący białka okrywy wirusa (rys. 9.13). Integracja prowirusa jest zawsze związana z duplikacją 5–6-nukleotydomowej sekwencji docelowej w DNA gospodarza, flankującej prowirusa włączonego do DNA. DNA prowirusa jest następnie transkrybowany z promotorów występujących w LTR. Powstający RNA służy jako matryca w syntezie

białek wirusowych bądź też wchodzi w skład potomnych cząstek wirusa. Retrowirusy w postaci prowirusów występują w DNA ssaków często w wielu kopiach w różnych pozycjach genomu. Prowirusy mogą być wycinane z DNA gospodarza, podobnie jak w przypadku transpozonów bakteryjnych. Przy wycinaniu mogą utracić część własnego DNA i włączyć odcinek DNA gospodarza, który znajdował się w pobliżu miejsca ich integracji.

9.22. Retrotranspozony *Ty* u drożdży mają wiele wspólnych właściwości z retrowirusami

U drożdży występuje kilka pokrewnych typów retrotranspozonów oznaczonych symbolem *Ty*. Są to elementy o długości ok. 5600 par nukleotydów, mające na obu końcach proste, terminalne powtórzenia o długości 250 par zasad, oznaczone jako δ . W części centralnej *Ty* znajdują się sekwencje homologiczne do retrowirusowych genów *gag* i *pol*, brak zaś homologa wirusowego genu *env*. Powstające po transkrypcji *Ty* liczne cząsteczki mRNA wytwarzają w komórkach drożdży cząstki nukleoproteinowe podobne do wirusów (VLP). Zawierają transkrypty RNA powiązane z białkowymi produktami genu *gag*. Białko kodowane przez gen *pol* retrotranspozonu *Ty*, podobnie jak u retrowirusów, ma właściwości odwrotnej transkryptazy, proteazy, integrazy i RNazy. Powstające w wyniku działania odwrotnej transkryptazy dwuniciowe łańcuchy DNA są następnie integrowane do chromosomów drożdży z jednoczesną duplikacją 5-nukleotydowej sekwencji docelowej. Mechanizmy integracji elementów *Ty* są zbliżone do opisanych dla transpozonów bakteryjnych, z tą jednak różnicą, że replikacja retrotranspozonów odbywa się z udziałem odwrotnej transkrypcji mRNA. Efekty fenotypowe insercji *Ty* są takie same, jak transpozonów bakteryjnych. Wycinanie retrotranspozonów *Ty* z DNA drożdży odbywa się najczęściej przez homologiczną rekombinację między terminalnymi powtórzeniami δ . Najczęściej wycięcie jest niekompletne i w miejscu retrotranspozonu *Ty* pozostaje pojedyncza kopia δ . Takich pojedynczych kopii δ może być w pojedynczym genomie drożdży do kilkuset i są one świadkami dawnych miejsc integracji elementów *Ty*. Nie jest jasne, jakie jest filogenetyczne powiązanie między retrowirusami a retrotranspozonami.

Analogiczne do *Ty* retrotranspozony zostały wykryte w wielu innych organizmach eukariotycznych, jak na przykład elementy *copia* u *D. melanogaster*, elementy *TAP* u gryzoni czy element *cial* u roślin. Wszystkie te elementy mają geny częściowo homologiczne z genami *pol* i *gag* retrowirusów.

9.23. Wykorzystanie transpozonów w genetyce molekularnej

Z transpozonów można wycinać znajdujące się w nich geny i wprowadzać w zamian dowolne inne geny. Jeżeli pozostaną terminalne powtórzenia, to będą

one rozpoznawane przez specyficzne dla danego transpozonu transpozazy, które będą je integrować w różne miejsca genomu komórki. Jeśli z transpozonu zostały wycięte geny kodujące transpozazę czy inne enzymy biorące udział w integracji transpozonów, to takie jednostki tracą zdolność do integracji. Jeśli jednak w komórce będą się znajdować inne kopie nie zmodyfikowanych transpozonów, to produkowane przez nie enzymy będą uczynniać nieaktywny transpozon. Transpozony z wprowadzonymi do nich genami wykorzystuje się obecnie do otrzymywania organizmów transgenicznych, gdyż mają one zdolność aktywnej integracji do genomu gospodarza. U *D. melanogaster* w celu otrzymania osobników transgenicznych używa się jako wektora transpozonu *P*.

Różne rodzaje transpozonów są także obecnie wykorzystywane do wykrywania i lokalizacji genów w chromosomach. Jeżeli mutacja w nie zidentyfikowanym genie jest wynikiem insercji transpozonu w obrębie czy w pobliżu badanego genu, to jego identyfikacja przez hybrydyzację z radiaktywną sondą transpozonową jest stosunkowo prosta. Sondę taką można wykorzystać albo do przeszukiwania banku genowego, albo też jak u *D. melanogaster* i u kręgowców do hybrydyzacji *in situ* z całym chromosomami.

10. GENY A RÓŻNICOWANIE SIĘ I ROZWÓJ

Jednym z podstawowych problemów biologii jest wyjaśnienie mechanizmów, które powodują, że z pojedynczej zapłodnionej komórki jajowej powstaje skomplikowany organizm, złożony z wyspecjalizowanych narządów i tkanek, uporządkowanych i funkcjonujących według odziedziczonego planu. Zagadnienie to, od dawna stanowiące przedmiot badań embriologii, przez długi czas nie podlegało analizie genetycznej, toteż genetyka rozwoju jest wciąż jeszcze najmniej poznanym działem nauki o dziedziczności. Dopiero ostatnie lata przyniosły zasadniczy postęp w tej dziedzinie, dzięki rewelacyjnym odkryciom dokonywanym podczas badań nad genami kierującymi rozwojem muszki owocowej. Badania te otworzyły zupełnie nowe możliwości analizy genetycznej rozwoju dzięki bezpośredniej identyfikacji konserwatywnych ewolucyjnie genów, wpływających na kształtowanie postaci osobnika. Niniejszy rozdział poświęcony jest omówieniu wybranych przykładów tych osiągnięć genetyki rozwoju zwierząt. Najpierw jednak przedstawione zostaną podstawowe zagadnienia z zakresu różnicowania się komórek i ich losów w rozwoju osobniczym.

10.1. Zjawisko różnicowania się (dyferencjacji)

Zapłodniona komórka jajowa jest totipotencjalna, co oznacza, że ma ona nieograniczone — w ramach właściwych dla danego gatunku — możliwości rozwojowe, gdyż daje początek wszystkim komórkom organizmu. Dopiero w trakcie kolejnych podziałów zygoty wyodrębniają się grupy komórek, z których powstaną tkanki o specyficznych właściwościach: nabłonkowe, nerwowe, mięśniowe itp., czemu towarzyszy stopniowe zmniejszenie ich dalszych możliwości rozwojowych. Zjawisko to nosi nazwę różnicowania się (dyferencjacji) komórek. Komórki zróżnicowane mają najczęściej charakterystyczną strukturę, kształty i sposób funkcjonowania; zwykle syntetyzują specyfi-

czne dla siebie białka strukturalne lub wydzielnicze, a także białka enzymatyczne, warunkujące specyficzny dla danego typu różnicowania ciąg przemian metabolicznych. Różnicowanie można więc obserwować na różnych poziomach organizacji, jako: biochemiczne, cytologiczne, morfologiczne czy fizjologiczne, ale u podstaw wszystkich tych procesów leżą zmiany w stanie aktywności odpowiednich genów. Zmiany te decydują o skierowaniu komórek na określoną drogę rozwojową, a więc o ich determinacji rozwojowej, czasem na długo przedtem zanim ujawnią się fenotypowo.

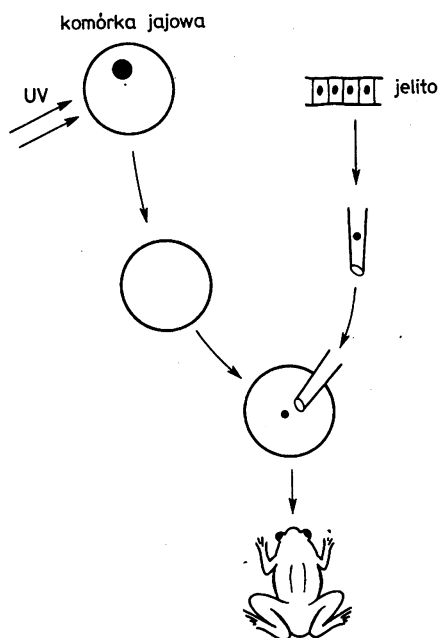
Zróżnicowanie komórek zwierzęcych jest zwykle nieodwracalne — komórki potomne albo zachowują ten sam poziom zróżnicowania, co komórki wyjściowe, albo ulegają jeszcze dalej posuniętej specjalizacji i tylko w wyjątkowych warunkach (np. w wyniku uszkodzeń tkanki lub w hodowli *in vitro*) może dojść do ich częściowego odróżnicowania.

10.1.1. Komórki zróżnicowane zawierają (na ogół) pełen zestaw informacji genetycznej

Nieodwracalność różnic między typami komórek zwierzęcych może sugerować, że różnicowanie jest związane z selektywną eliminacją genów nie ulegających ekspresji w danej tkance. Wydawało się, że taki pogląd potwierdzają obserwacje tzw. diminucji chromatyny, polegającej na eliminacji fragmentów chromosomów w dzielących się komórkach zarodka, z wyjątkiem tych komórek, które tworzą linię płciową. Jednak zjawisko to, opisane po raz pierwszy przeszło sto lat temu (w 1887 r.) przez T. Boveriego u glisty, zostało potem stwierdzone tylko u kilku jeszcze gatunków zwierząt spośród skorupiaków i muchówek). Ponadto okazało się, że eliminowane fragmenty chromosomów są zbudowane przede wszystkim z bloków heterochromatynowych, których DNA nie ulega transkrypcji, a więc przypuszczalnie nie niesie informacji genetycznej. Tylko u pewnych muchówek (z rodziny *Cecidomyiidae*) eliminowane są w linii somatycznej całe chromosomy, których obecność jest konieczna w linii płciowej do normalnego przebiegu gametogenezy. Zjawisko eliminacji chromatyny występuje także w trakcie rozwoju makronukleusa u orzęsków.

Jeżeli pominiemy te raczej wyjątkowe przypadki, u większości badanych gatunków można wykazać nie tylko obecność wszystkich chromosomów w poszczególnych tkankach, ale także taki sam wzór ich prążkowania, co wskazuje na brak większych różnic.

Stopniowo gromadziły się dowody świadczące, iż komórki zróżnicowane nie tracą informacji genetycznej. Chyba najbardziej przekonujące były doświadczenia J.B. Gurдона nad rozwojem żab z komórek jajowych, w których niszczone własne jądro, a na jego miejsce wprowadzano jądro wyizolowane z komórki w pełni zróżnicowanej (rys. 10.1). Okazało się, iż np. jądro z komórki jelita kijanki po wprowadzeniu do bezjądrzastej komórki jajowej może pokierować pełnym rozwojem osobnika, aż do osiągnięcia postaci dorosłej. Powodzenie tych doświadczeń zmniejszało się jednak w miarę zaawansowania



Rys. 10.1. Klonowanie u żab. Po zniszczeniu jądra komórki jajowej promieniami UV i wprowadzeniu jądra z jelita kijanki nastąpił normalny rozwój osobnika

rozwoju osobnika, z którego tkanek pobierano jądro, np. jądra z komórek skóry dorosłej żaby po wprowadzeniu do oocytu doprowadzały rozwój w najlepszym razie do stadium nie pobierającej pokarmu kijanki.

Wciąż nie wiadomo, czy ograniczenia te wynikają z nieodwracalnego zablokowania informacji genetycznej z wiekiem (być może nawet utraty jakichś ważnych sekwencji DNA), czy też z przeszkód natury technicznej. Niewątpliwie jednak opisane wyniki uzasadniają wniosek, iż zróżnicowana komórka nie traci zestawu genów potrzebnych do wytworzenia różnych tkanek, mimo iż w normalnych warunkach geny te nie ulegałyby nigdy ekspresji w tej komórce. Jednak u zwierząt wyższych do pomyślnego przebiegu takich doświadczeń konieczne jest, jak się wydaje, środowisko cytoplazmatyczne komórki jajowej, gdyż nie udało się doprowadzić do rozwoju osobnika z żadnej zróżnicowanej komórki somatycznej. Jest to natomiast możliwe u roślin, u których stosunkowo łatwo dochodzi do odróżnicowania tkanek *in vitro*, po czym z pojedynczej komórki somatycznej można wyhodować nową roślinę.

Za zachowaniem pełnej informacji genetycznej w zróżnicowanych tkankach przemawiają również wyniki uzyskane po zastosowaniu technik molekularnych, gdyż ani hybrydyzacja kwasów nukleinowych ani rozkład długości fragmentów ciętych enzymami restrykcyjnymi nie wykazują na ogół różnic między próbkami DNA, wyizolowanymi z rozmaitych tkanek tego samego osobnika. Podobnie, obce fragmenty DNA wprowadzone do jądra zapłodnionej komórki jajowej i włączone w jej chromosomy, można potem wykryć we wszystkich badanych tkankach.

10.1.2. W niektórych tylko przypadkach różnicowanie jest związane z ilościowymi zmianami materiału genetycznego

W niektórych tkankach bardzo aktywnych metabolicznie następuje zwielokrotnienie zawartości DNA. Może ono polegać na zwielokrotnieniu liczby chromosomów, jak w wątrobie ssaków, gdzie oprócz diploidalnych występują komórki tetra- i oktoploidalne, powstałe na skutek niewystępowania cytokinezy po podziale jądra. W innych tkankach, np. w komórkach gruczołów ślinowych u muchówek, w wyniku endomitozy powstają chromosomy politeniczne, które wobec zwielokrotnionej liczby genów umożliwiają wyprodukowanie w krótkim czasie wielkiej ilości wydzieliny białkowej potrzebnej do przepoczwarczenia. Może się dziać przeciwnie — w erytrocytach ssaków dochodzi do całkowitej eliminacji jądra, a synteza globin odbywa się na matrycach zdeponowanego w cytoplazmie mRNA; dzięki temu przystosowaniu rozmiary erytrocytów są niewielkie, a transport tlenu — sprawniejszy.

Zdarzają się też przypadki selektywnego powielania lub utraty pewnych tylko odcinków DNA. I tak, w komórkach foliularnych jajnika *Drosophila*, geny kodujące białko chorionu (zewnętrznej osłony jaja) ulegają wybiórczej amplifikacji, gdyż zawierające te geny odcinki DNA przechodzą przez dodatkowe cykle replikacji. Dzięki temu w ciągu kilku zaledwie godzin syntetyzowane są olbrzymie ilości białek chorionu potrzebne do produkcji oocytów. Z kolei w rosnących oocytach płazów, a także niektórych owadów, mięczaków, skorupiaków i szkarłupni zachodzi wielokrotna amplifikacja genów kodujących rRNA. Najpierw zostaje skopiowany i wycięty odcinek DNA kodujący 28S, 18S i 5,8S rRNA wraz z przerywnikami. Kopia ta następnie odłącza się od chromosomu, ulega cyrkularyzacji i wielokrotnie się replikuje. Powstają dodatkowe jąderka, gdzie produkowane są ogromne ilości rRNA, potrzebnego potem po zapłodnieniu jaja do syntezy białek w okresie bruzdkowania. Szacuje się, że 75% całej zawartości DNA w oocycie żaby stanowią właśnie te amplifikowane pozachromosomowe kopie kodujące rRNA.

Natomiast w chromosomach olbrzymich w śliniankach muchówek zachodzi proces odwrotny do wybiórczej amplifikacji, gdyż pewne odcinki, np. w okolicy centromerów, nie ulegają replikacji podczas politenizacji reszty chromosomu. O diminucji chromatyny była już mowa (p. s. 281). Wreszcie, w niektórych specjalnych przypadkach różnicowanie się może być związane z wycinaniem pewnych fragmentów DNA, jak to się dzieje w komórkach układu immunologicznego.

Są to jednak wszystkie sytuacje raczej wyjątkowe. Na ogół zróżnicowanie komórek nie wynika ze zmian zawartości materiału genetycznego, lecz z selektywnej ekspresji genów.

10.1.3. Wzorzec ekspresji genów zmienia się w czasie rozwoju i jest specyficzny tkankowo

Na selektywną aktywność genów w trakcie rozwoju i różnicowania komórek wskazywały od dawna obserwacje chromosomów politenicznych w śliniakach muchówek. W chromosomach tych daje się zauważyć rozdęcia niektórych prążków, tzw. puffy, które są miejscem silnej despiralizacji chromatyny i bardzo aktywnej syntezy RNA, co świadczy o aktywności transkrypcyjnej zlokalizowanych tam genów. W okresie poprzedzającym przepoczwarczenie lub pod wpływem podawania hormonu steroidowego — ekdysonu, puffy te pojawiają się w określonej kolejności w pewnych prążkach, po czym zanikają, a w innych miejscach powstają nowe; w ślad za tym następuje synteza coraz to nowych frakcji białek wydzielniczych.

Nowsze badania, polegające m.in. na blokowaniu transkrypcji lub translacji oraz na identyfikowaniu w komórkach specyficznych transkryptów RNA i specyficznych białek, pozwalają bezpośrednio analizować zmieniającą się w miarę rozwoju ekspresję genów w różnych tkankach.

U większości zwierząt (wyjątek stanowią ssaki — p. s. 286), we wczesnym okresie bruzdkowania komórki dzielą się bardzo szybko (np. u płaza *Xenopus* co 30 min); geny zygoty są jeszcze nieczynne transkrypcyjnie, a synteza białek odbywa się na matrycach mRNA zsyntetyzowanych jeszcze w organizmie matki i zdeponowanych w cytoplazmie komórki jajowej. Ponieważ zawartość jaja jest rozmieszczona nierównomiernie, w czasie bruzdkowania do poszczególnych blastomerów trafia cytoplazma o różnym składzie, m.in. z różnymi cząsteczkami mRNA. W rezultacie synteza białek przebiega od początku w sposób zróżnicowany, mimo iż wszystkie komórki otrzymują taką samą informację genetyczną zawartą w jądrze. Co więcej, wśród zdeponowanych lub nowo zsyntetyzowanych białek znajdują się cząsteczki specyficznych induktorów lub represorów, uruchamiających potem wybiórczą aktywność własnych genów zarodka w poszczególnych komórkach. Aktywacja nadrzędnych genów regulatorowych decyduje z kolei o uruchamianiu następnych. W ten sposób niewielkie początkowo różnice między komórkami lawinowo narastają w miarę rozwoju zarodka. Poszczególne geny są włączane w różnych stadiach, w zależności od rodzaju tkanki. Ekspresja ta może być regulowana na rozmaitych poziomach, począwszy od aktywacji struktury chromatyny, poprzez transkrypcję, alternatywną obróbkę pierwotnych transkryptów RNA, regulację dotyczącą czasu i tempa translacji, aż do modyfikacji potranslacyjnej łańcuchów polipeptydowych. Jednak zasadnicza regulacja odbywa się na poziomie transkrypcji.

10.1.4. Stan aktywności chromatyny przenosi się na komórki potomne i jest jednym z elementów pamięci komórkowej

Podstawowym warunkiem transkrypcji jest aktywny stan chromatyny, gdyż wtedy dopiero mogą zostać przyłączone czynniki transkrypcyjne, polimerazy RNA itd. Na ogół stale aktywna jest chromatyna mieszcząca geny warunkujące

podstawowe funkcje komórki (ang. housekeeping), które kodują białka niezbędne w każdej typowej komórce (np. histony, elementy cytoszkieletu, enzymy metabolizmu podstawowego itp.) i są czynne, przynajmniej okresowo, w większości tkanek. Natomiast chromatyna, mieszcząca geny kodujące białka specjalistyczne, przechodzi w stan aktywny tylko w tych tkankach, w których geny te będą potem ulegać ekspresji (np. kodujące insulinę — w trzustce, globiny — w erytroblastach itp.). W pozostałych tkankach te fragmenty chromatyny nie bywają nigdy uaktywniane, a zawarte w nich geny mogą zostać trwale zablokowane, co u kręgowców wiąże się z metylacją sekwencji CpG (ang. CpG islands) w rejonie promotorów. W skrajnych przypadkach unieczynnienie może dotyczyć całego chromosomu, jak to się dzieje z chromosomem X u samic ssaków (p. s. 313).

Zróznicowany stan aktywności chromatyny, dziedziczony przez komórki potomne, jest jednym z czynników decydujących o determinacji rozwojowej danej linii komórkowej. Jest to pewnego rodzaju „pamięć” komórkowa związana ze strukturą chromatyny. Innym elementem pamięci mogą być zdeponowane w cytoplazmie czynniki indukujące lub hamujące aktywność specyficznych genów, przekazywane komórkom potomnym w danej linii.

10.1.5. Determinację rozwojową blastomerów wyznacza polarność składników jaja oraz (lub) oddziaływania międzykomórkowe

Jak już wspomniano, przyczyną powstawania pierwszych różnic między blastomerami jest u większości zwierząt nierównomierny rozkład zawartości jaja. Komórka jajowa jest najczęściej spolaryzowana, gdyż materiały zapasowe zgrupowane są zwykle na jednym biegunie, a rozmieszczenie innych składników też nie jest homogeniczne. W niektórych grupach, jak: nicienie, pierścienice, mięczaki, żachwy i większość stawonogów (m.in. u *Drosophila*, p. s. 296) o tzw. rozwoju mozaikowym, sposób rozmieszczenia składników jaja ma decydujące znaczenie dla determinacji rozwojowej poszczególnych blastomerów. Na przykład u żachwy *Styela*, przeszczepiając określone części jaja (które da się rozpoznać po specyficznej pigmentacji), można z góry przewidzieć, jakie powstaną z nich struktury. Jednak nawet u takich gatunków daje się wykryć pewne zmiany wynikające ze wzajemnych oddziaływań komórkowych.

W innych grupach, jak jeżowce i kręgowce, rozwój ma charakter regulacyjny, a różnice między biegunami komórki jajowej wpływają tylko na początkowe fazy zróżnicowania, po czym decydującą rolę zaczynają odgrywać oddziaływania wzajemne między komórkami. Na przykład wytworzenie mezodermy wymaga współdziałania komórek ekto- i endodermy, z kolei komórki mezodermy indukują potem w ektodermie powstanie tkanki nerwowej itd. Oddziaływania te noszą nazwę indukcji. Prowadzone są intensywne badania nad identyfikacją czynników wywołujących specyficzne indukcje, zwanych

morfogenami. Wydaje się, że niektóre z nich mogą należeć do grupy czynników wzrostowych, np. indukcję mezodermalną można zastąpić stosując czynnik wzrostu fibroblastów — FGF (ang. — fibroblast growth factor). Innym poznanym morfogenem jest kwas retinowy, którego gradient stężenia odgrywa rolę w procesie formowania się kończyny ptaków i ssaków.

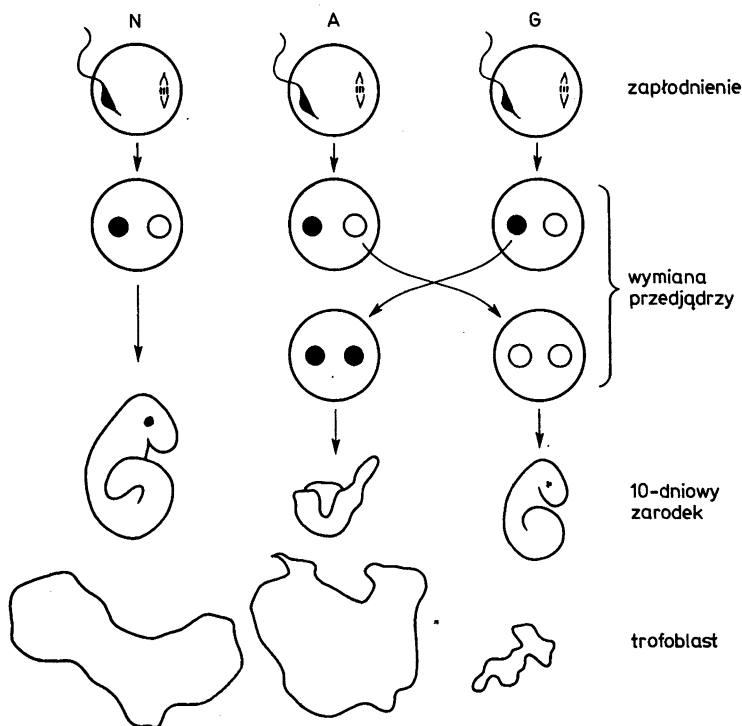
Regulacja rozwoju ssaków przebiega nieco odmiennie niż innych zwierząt. Specyficzny sposób odżywiania zarodka przez łożysko doprowadził w tej grupie do daleko idących przystosowań: komórki jajowe są niewielkie, pozbawione żółtka, nie wykazują polarności, a tempo podziałów jest powolne (podobne jak w komórkach somatycznych); już od stadium 2 blastomerów rozpoczyna się transkrypcja własnych genów zarodka. Początkowo aż do stadium 8-komórkowego blastomery są totipotencjalne, gdyż — jak to wykazał doświadczalnie A.K. Tarkowski — po rozdzieleniu każdy z nich może się rozwinąć w normalnego osobnika. Jednakże w stadium 8-komórkowym każdy blastomer wykazuje już polarność, gdyż tylko od wewnętrznej strony kontaktuje się z sąsiednimi blastomerami tworząc ścisłe połączenia, natomiast druga strona, skierowana na zewnątrz i pokryta kosmkami, jest wystawiona na działanie otaczającego środowiska. Polarność tę można uwidocznic barwiąc elementy cytoszkieletu. Kolejny podział oddzieli już komórki zewnętrzne, z których powstanie trofoblast, a następnie tkanki pozazarodkowe (niektóre błony płodowe, łożysko) od komórek wewnętrznych, które utworzą węzeł zarodkowy, a następnie wezmą udział w formowaniu właściwego zarodka. Od tego etapu rozwoju rozkład składników zarówno dopływających ze środowiska macicy, jak i wytwarzanych przez sam zarodek, staje się nierównomierny. Wydaje się, że u ssaków dopiero kontakty między blastomerami decydują o powstaniu różnic pomiędzy komórkami, a ich wzajemne oddziaływanie odgrywają potem zasadniczą rolę w ukierunkowaniu dalszego rozwoju. Jednak i u ssaków nie da się wykluczyć występowania jakiegoś początkowego zróżnicowania struktury oocyty, które zwiększałoby potem prawdopodobieństwo określonych blastomerów do zajmowania w zarodku pozycji centralnej. Zróżnicowanie to jednak nie mogłoby mieć znaczenia decydującego, ze względu na wysokie zdolności regulacyjne zarodka.

10.1.6. Rozwój ssaków wymaga obecności genomu przekazanego przez matkę i ojca

Partenogeneza, czyli rozwój niezaplodnionego jaja bez udziału plemnika, jest szeroko rozpowszechniona w świecie zwierząt. Zjawisko to, zachodzące spontanicznie lub wywoływane sztucznie, prowadzi zwykle do normalnego rozwoju osobniczego. Jednakże u ssaków nie udało się uzyskać normalnych osobników urodzonych w wyniku partenogenezy: wprawdzie łatwo pobudzić jajo do podziałów i rozwoju działając różnymi czynnikami, jak: szok elektryczny, termiczny lub chemiczny, jednak zarodki takie nie przeżywają dłużej niż do połowy okresu płodowego. Przyczynę tych niepowodzeń wyjaśniły badania,

polegające na mikrochirurgicznej wymianie przedjądrzy w zapłodnionym jajku myszy.

Po wnikięciu plemnika do komórki jajowej, jego jądro przekształca się w przedjądrze męskie, a jednocześnie z chromosomów jaja powstaje przedjądrze żeńskie, przy czym przez pewien czas oba przedjądrza można od siebie odróżnić. W tym stadium usuwano mikropipetką jedno z przedjądrzy, a na to miejsce wprowadzano przedjądrze męskie lub żeńskie, uzyskane od innej zygoty (rys. 10.2). Tak operowane zarodki przenoszono do macicy zastępczych matek i analizowano ich rozwój. Wyniki tych doświadczeń były jednoznaczne: tylko zarodki zawierające zarówno przedjądrze żeńskie, jak i męskie rozwijały się normalnie, pozostałe zamierały zwykle po kilku podziałach. Jeżeli jednak udało im się przeżyć nieco dłużej, to wykazywały charakterystyczne różnice: zarodki gynogenetyczne, czyli powstałe z obu przedjądrzy żeńskich, charakteryzowały się niedorozwojem struktur pozazarodkowych (trofoblastu), co prawdopodobnie wtórnie powoduje śmierć płodu z powodu niedożywienia; natomiast zarodki androgenetyczne, czyli otrzymane z jaj o obu przedjądrzach męskich, miały dobrze rozwinięty trofoblast, ale upośledzone struktury włás-

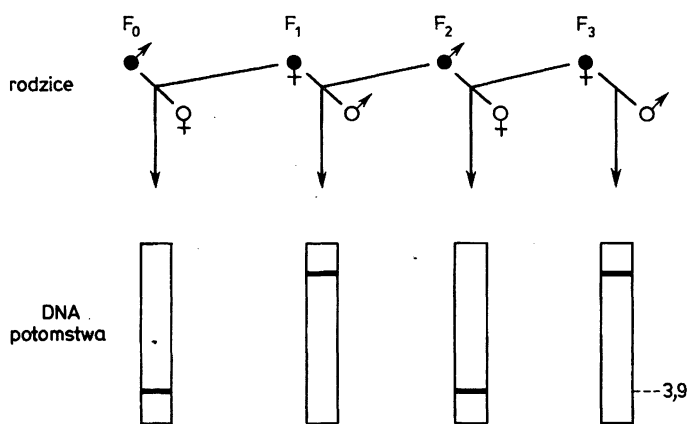


Rys. 10.2. Schemat doświadczenia polegającego na wymianie przedjądrzy w zapłodnionych komórkach jajowych myszy. Przedjądrza żeńskie — białe, męskie — czarne. W porównaniu z rozwojem normalnym (N) w rozwoju gynogenetycznym (G) — dwa przedjądrza żeńskie — występuje redukcja trofoblastu, w rozwoju androgenetycznym zaś (A) — dwa przedjądrza męskie — upośledzony jest sam zarodek (częściowo wg Howlett i wsp., 1989 — zmodyf.)

ciwego zarodka (rys. 10.2). Wyniki te świadczyły wyraźnie o tym, że do normalnego rozwoju zarodka ssaka konieczna jest obecność zarówno genomu żeńskiego, jak i męskiego, z czego z kolei wynika, że genomy rodzicielskie nie są równoważnościowe, lecz muszą być w jakiś sposób naznaczone czy napiętnowane. Zjawisko to określa się jako imprinting genomu rodzicielskiego.

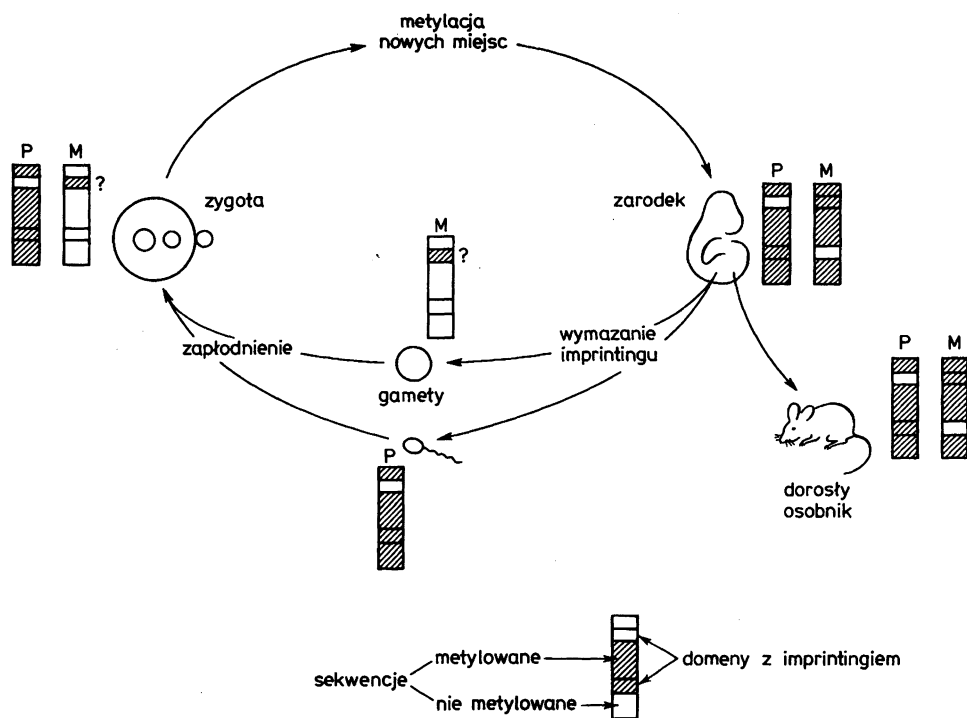
Do podobnych wniosków prowadziły badania potomstwa heterozygotycznych nosicieli pewnych translokacji chromosomowych u myszy. Wskutek nieprawidłowego rozchodzenia się chromosomów w mejozie otrzymywano osobniki, u których pewne odcinki obu homologicznych chromosomów pochodziły tylko od jednego lub tylko od drugiego z rodziców. Osobniki takie były fenotypowo nienormalne, mimo iż miały dwa kompletne garnitury chromosomowe. Badania te wykazały, że do normalnego rozwoju niezbędne jest posiadanie pewnych konkretnych odcinków chromosomowych pochodzenia matczynego (znajdujących się np. w chromosomach 7 i 17) oraz innych odcinków pochodzenia ojcowskiego (np. w chromosomach 6 i 8). Takie efekty, odnoszące się do fragmentów sześciu par chromosomów, sugerują, że około jedna ósma genomu myszy może podlegać zróżnicowanemu imprintingowi rodzicielskiemu: geny zawarte w jednych fragmentach są nieaktywne, jeżeli pochodzą od matki, w innych — jeżeli pochodzą od ojca.

Nie wiadomo jeszcze, na czym polega modyfikacja chromatyny powodująca imprinting. Aby sprawdzić hipotezę, że ma to związek z metylacją DNA, posłużono się myszami transgenicznymi otrzymanymi z takich zygot, do których wprowadzono mikrochirurgicznie obce geny. Jeżeli geny te włączyły się do genomu, to były potem normalnie dziedziczone i służyły jako markery do analizy metylacji sąsiadujących z nimi odcinków chromosomowych. Zastosowanie trawienia enzymem restrykcyjnym HpaII, który rozpoznaje nie metylo-



Rys. 10.3. Metylacja wprowadzonego genu w kolejnych pokoleniach myszy transgenicznych zmienia się zależnie od tego, czy został on przekazany przez ojca czy przez matkę (osobniki transgeniczne zaznaczone czarnymi symbolami). Na elektroforegramie DNA trawionego enzymem restrykcyjnym HpaII sekwencja genu przekazywana przez ojca jest nie metylowana i występuje w innej frakcji (3,9) niż sekwencja metylowana przekazywana przez matkę (wg Howlett i wsp., 1989 — zmodyf.)

waną sekwencję CCGG (natomiast nie rozpoznaje jej, gdy środkowa cytozyna zawiera grupę metylową), umożliwiło wykazanie, że sekwencje obcego genu były u zarodków metylowane lub nie, zależnie od tego, czy zostały przekazane przez ojca czy przez matkę (rys. 10.3). Wydaje się więc, że imprinting ma związek ze zróżnicowaną metylacją, a zatem inaktywacją odcinków DNA, jednak nie wiadomo, czy metylacja ta stanowi pierwotną przyczynę imprintingu, czy jest tylko zjawiskiem towarzyszącym.



Rys. 10.4. Schemat imprintingu genomowego u myszy. W różnych stadiach rozwoju myszy pokazano stan metylacji pary chromosomów homologicznych (P — przekazany przez ojca, M — przez matkę), zawierających dwie domeny podlegające zróżnicowanemu imprintingowi zależnie od płci (wg Howlett i wsp., 1989 — zmodyf.)

Na podstawie dotychczasowych danych wydaje się prawdopodobny model (rys. 10.4) zakładający, że różnice w genomach rodzicielskich powstają w czasie gametogenezy jako specyficzne dla linii płciowej modyfikacje DNA w pewnych określonych odcinkach chromosomów. Imprinting ten jest przekazywany przez gamety do zygoty, gdzie utrzymuje się przez cały okres rozwoju zarodkowego, a prawdopodobnie nawet do końca życia, ale tylko w komórkach somatycznych. Natomiast w komórkach linii płciowej imprinting odziedziczony po rodzicach zostaje w którymś momencie wymazany a wprowadzony nowy, którego specyfika zależy od płci.

10.1.7. Ujawnienie się niektórych chorób człowieka może być wywołane imprintingiem genomu rodzicielskiego

Wprawdzie występowanie imprintingu genomu wykazano doświadczalnie tylko u myszy, ale analiza niektórych zaburzeń genetycznych u człowieka sugeruje, że zjawisko to może odgrywać rolę w ujawnianiu się chorób wywołanych tymi zaburzeniami. Przykład stanowi zespół chorobowy Pradel–Williego, choroba charakteryzująca się opóźnieniem umysłowym, skrajną otyłością, niskim wzrostem oraz nieproporcjonalnie małymi stopami i dłońmi. Analiza genetyczna pacjentów i ich rodzin wykazała, że chorzy otrzymali obie kopie chromosomu 15 od matki, a żadnej od ojca (podobnie jak w opisanym poprzednio przypadku myszy z translokacjami).

Imprinting genomu rodzicielskiego może mieć także wpływ na ujawnianie się pewnych nowotworów wieku dziecięcego, jak embrionalny nowotwór mięśni (*rhabdomyosarcoma*), nowotwór Wilmsa atakujący nerki lub pewna forma raka kości (*osteosarcoma*). Wiadomo, że w genomie człowieka występują tzw. antyonkogeny, czyli geny pełniące funkcję supresorów nowotworów. Jednym z takich antyonkogenów jest gen *Rd* w 11 chromosomie. Nowotwór może wystąpić dopiero wtedy, jeżeli obie kopie genu *Rd* zostaną unieczynnione, co wymaga dwu niezależnych mutacji, a więc zdarza się rzadko. Natomiast jeżeli jedna kopia genu *Rd* jest już odziedziczona w formie niefunkcjonalnej, to wystarczy potem tylko jedna mutacja somatyczna, żeby mógł powstać nowotwór. Ponieważ stwierdzono, że w komórkach omawianych nowotworów pierwsza inaktywacja najczęściej dotyczy genu *Rd* przekazanego przez ojca, istnieje poważne podejrzenie, że jest to spowodowane imprintingiem tego genu w organizmie ojcowskim. Imprinting jest też przypuszczalnie odpowiedzialny za wczesne, w wieku dziecięcym, ujawnienie się choroby Huntingtona, która normalnie występuje dopiero w wieku średnim.

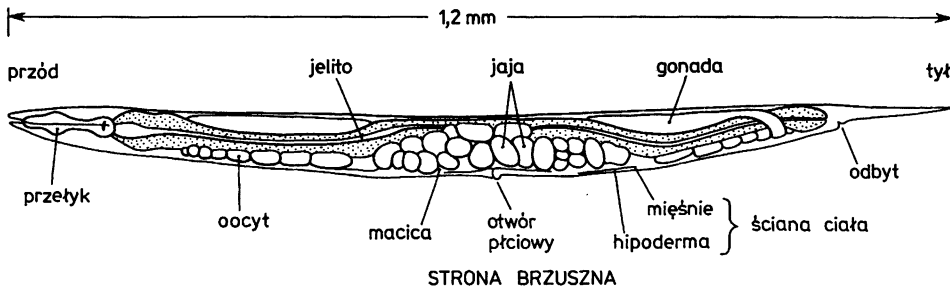
10.2. Genetyczna kontrola morfogenezy

Ponieważ kształtowanie postaci osobnika, czyli morfogeneza, odbywa się według wzorów odziedziczonych po rodzicach, muszą istnieć odpowiedzialne za to geny. Klasyczna metoda badania roli genów polega na analizie zmian spowodowanych mutacjami. Po czym więc można poznać geny kontrolujące morfogenezę? Ich mutacje powinny zaburzać plan budowy osobnika, powodując na przykład, że prawidłowo zróżnicowane komórki lub narządy pojawiają się w nietypowym miejscu, liczbie czy stadium rozwoju, albo też nie wykształcą się wcale. Rzeczywiście tego typu mutanty udało się zidentyfikować u gatunków o ściśle zdeterminowanym rozwoju mozaikowym, od którego odstępstwa łatwo daje się interpretować. Klasycznym obiektem tych badań jest małutka nician — *Caenorhabditis elegans* oraz muszka — *Drosophila melanogaster*. Identyfikacja genów wyznaczających rozwój *D. melanogaster* doprowadziła do odkrycia

konserwatywnej ewolucyjnie rodziny genów regulatorowych, biorących udział w kierowaniu rozwojem różnych organizmów zwierzęcych, zarówno bezkręgowców, jak i kręgowców.

10.2.1. Losy linii komórkowych u nicienia *Caenorhabditis elegans* są wyznaczone przez geny kontrolujące rozwój

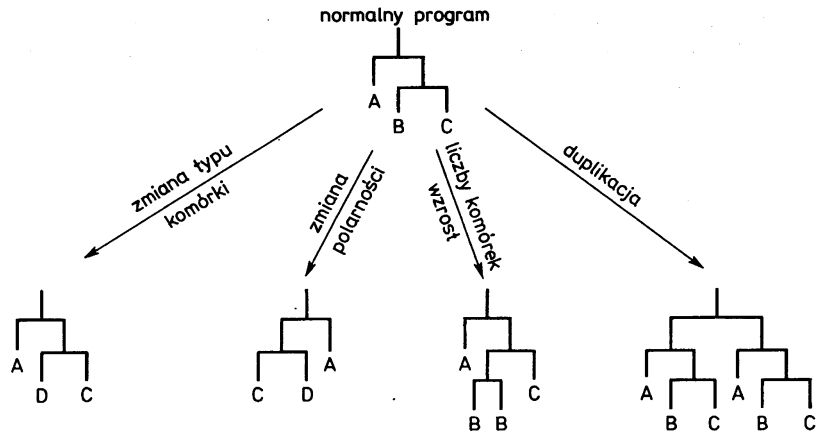
C. elegans, nicieniec o długości zaledwie 1,2 mm, ma prostą budowę dwubocznie symetryczną, o wyróżnionym przednim i tylnym końcu (rys. 10.5). Ciało składa się z 1000 komórek somatycznych, zorganizowanych w typowe tkanki, oraz 1000–2000 komórek płciowych. Występują osobniki dwu płci: nieliczne samce oraz przeważające w populacji samice hermafrodytyczne, które produkują oprócz jaj pewną liczbę plemników i mogą się rozmnażać przez samozapłodnienie, co pozwala otrzymać homozygoty cenne dla badań genetycznych.



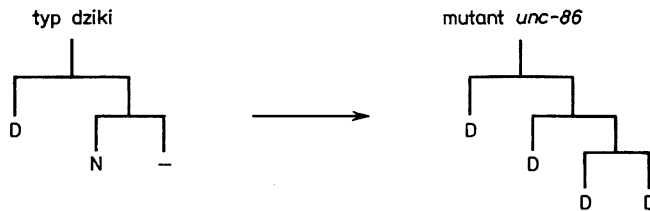
Rys. 10.5. Budowa nicienia *Caenorhabditis elegans*

Rozwój trwa tylko 3 dni. Już po pierwszych podziałach zapłodnionej komórki jajowej powstaje 6 komórek, które dadzą początek sześciu głównym liniom komórkowym. W wyniku dalszych szybkich podziałów powstaje zarodek, który po osiągnięciu 558 komórek opuszcza osłonę jajową, a następnie przechodzi przez 4 stadia larwalne, przegrodzone wylinkami. Przezroczyste ciało umożliwia śledzenie podziałów i migracji komórek, toteż cały rozwój został dokładnie opisany. Jest on niemal niezmienny, tak że można przewidzieć los każdej komórki.

Cały genom zawierający około 3000 genów (w 6 parach chromosomów) został sklonowany. Zawartość DNA w haploidalnym genomie wynosi 80×10^6 par zasad (38 × mniej niż u człowieka). Wśród 800 genów zidentyfikowanych dzięki mutacjom, znajdują się geny kontrolujące rozwój. Ich mutacje powodują zmiany determinacji losów komórek w poszczególnych liniach (rys. 10.6), np. komórka różnicuje się w innym kierunku niż normalnie lub też komórka potomna, która powinna zróżnicować się definitywnie i zaprzestać dalszych podziałów, zachowuje się jak komórka wyjściowa. Na przykład u mutantu *unc-86* powstaje w ten sposób wiele neuronów dopaminergicznych zamiast tylko jednego występującego normalnie (rys. 10.7).



Rys. 10.6. Cztery typy zmian w liniach komórkowych wywołanych modyfikacjami programu podziałów. A, B, C, D przedstawiają różne typy komórek, powstałe z jednej wyjściowej (z Wilkinsa, 1986 — zmodyf.)



Rys. 10.7. Zmiana programu podziałów komórkowych u mutantu *unc-86 C. elegans*, prowadząca do powstania zamiast jednego neuronu (N) kilku neuronów dopaminergicznych (D). Kreska oznacza zaprogramowaną śmierć komórki (z Wilkinsa, 1986 — zmodyf.)

Inne mutacje, tzw. heterochroniczne, powodują, że pewne zestawy komórek zachowują się w sposób charakterystyczny dla innego stadium. Na przykład rola genu *lin-14* polega na utrzymywaniu komórek w stanie typowym dla formy niedojrzałej, a normalny rozwój wymaga stopniowej redukcji poziomu białka kodowanego przez gen *lin-14*, w miarę jak zwierzę dojrzewa. U mutantów o zwiększonej aktywności tego genu, po kolejnych wylinkach następują stadia takie same jak poprzednio, wskutek czego ciało okrywa wciąż niedojrzała kutykula. Natomiast mutanty z niefunkcyjnym genem *lin-14* dojrzewają przedwcześnie, opuszczając wiele stadiów rozwojowych, co powoduje, że osobnik dorosły ma mało komórek.

Analiza mutacji rozwojowych wskazuje, że istnieją geny decydujące o programie podziałów komórkowych, tzn. o tym, czy i w jaki sposób komórka ma się podzielić. Można wyróżnić dwa zasadnicze typy podziałów:

a) symetryczny (proliferaacja), w którym komórki potomne są takie same jak wyjściowa;

b) niesymetryczny, powodujący powstawanie różnic między komórkami potomnymi i nowych typów komórkowych. Pokazane na rysunku 10.6 modele odnoszą się właśnie do modyfikacji podziałów niesymetrycznych i przedstawiają zmiany programu genetycznego wywołane mutacjami genów sterujących podziałami. Kombinacja takich prostych zapisów genetycznych, działających w różnych tkankach, może doprowadzić do powstania skomplikowanych programów rozwojowych, składających się z sekwencji podziałów symetrycznych i niesymetrycznych.

Scharakteryzowanie genów i ich produktów, decydujących o wyborze drogi rozwojowej komórek *C. elegans*, będzie miało zasadnicze znaczenie ze względu na analogię z innymi zwierzętami. Na przykład wśród tkanek ssaków można wyróżnić takie, jak komórki nerwowe, mięśnia sercowego i soczewki oka, które po osiągnięciu końcowego zróżnicowania zaprzestają już dalszych podziałów do końca życia zwierzęcia. W innych tkankach komórki zróżnicowane proliferują także w wieku dorosłym przez podziały symetryczne (np. hepatocyty w wątrobie). Są wreszcie i takie tkanki, w których w toku kolejnych podziałów niesymetrycznych wyodrębniają się pokolenia komórek krańcowo zróżnicowanych, a jednocześnie stale utrzymuje się rezerwuar komórek pluripotencjalnych, tzw. komórek pnia (ang. stem cells), o wielostronnych wciąż możliwościach rozwojowych. Przykładem są komórki pnia w szpiku kostnym, które sukcesywnie dają początek różnym typom zróżnicowanych komórek krwi, jak erytrocyty, limfocyty itd. Badania nad nicieniem mogą się więc przyczynić do zrozumienia mechanizmów genetycznych rządzących wyborem dróg rozwojowych przez komórki w warunkach prawidłowych i patologicznych, np. w przypadku nowotworów.

10.2.2 Geny kierujące rozwojem *Drosophila*

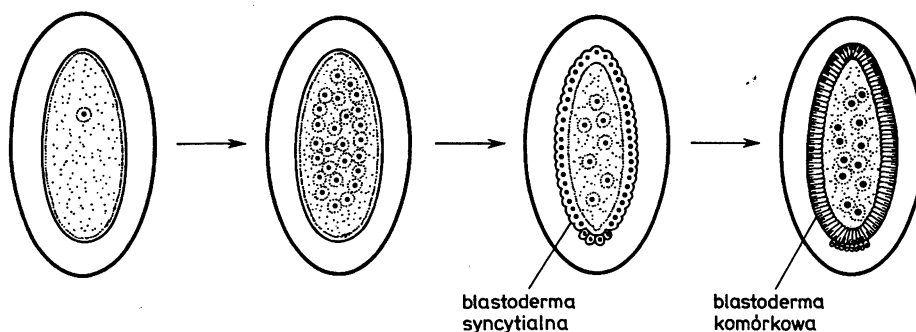
Muszka owocowa — *D. melanogaster*, która odegrała tak istotną rolę w badaniach genetyki klasycznej, okazała się również bardzo dogodnym obiektem do analizy genów kontrolujących rozwój i decydujących o kształtowaniu postaci. Punktem wyjścia było odkrycie specjalnego typu mutacji, tzw. homeotycznych, które zaburzają plan budowy organizmu i powodują, że struktura typowa dla jednej okolicy ciała wykształca się w zupełnie innym miejscu. I tak, mutacja *Antennapedia* (*Antp*) powoduje, że zamiast czułka na głowie wyrasta odnóże, a mutacja *bithorax* (*bx*) wywołuje zamianę części segmentu odwłokowego na tułowiowy, wskutek czego zamiast przermianek wyrasta druga para skrzydeł.

Stopniowo poznawano także inne mutacje rozwojowe, które zaburzały symetrię ciała, redukowały liczbę segmentów lub sposób ich wykształcenia itp. Analiza tych mutacji pozwoliła zidentyfikować około 100 tego typu genów, w tym około 20 wpływających na wyznaczenie symetrii grzbieto-brzuszej i około 50 genów wyznaczających pozycję na osi przednio-tylnej. Zajmiemy się tutaj tylko tymi ostatnimi, ponieważ zostały one najlepiej poznane; wiele z nich

już sklonowano i zidentyfikowano kodowane przez nie białka. Co więcej, zbadano też wzory ekspresji tych genów w kolejnych stadiach rozwojowych u form dzikich i mutantów, lokalizując na przekrojach histologicznych przez ciało zarodka transkrypty mRNA, metodą hybrydyzacji *in situ* (stosując znakowane radioaktywnie sondy cDNA odpowiednich genów lub antysensowne nici RNA) albo też wykrywając za pomocą specyficznych przeciwciał rozmieszczenie kodowanych przez te geny białek. Dzięki połączeniu badań genetycznych i molekularnych zaczyna się już wyłaniać obraz działania tych genów w rozwoju.

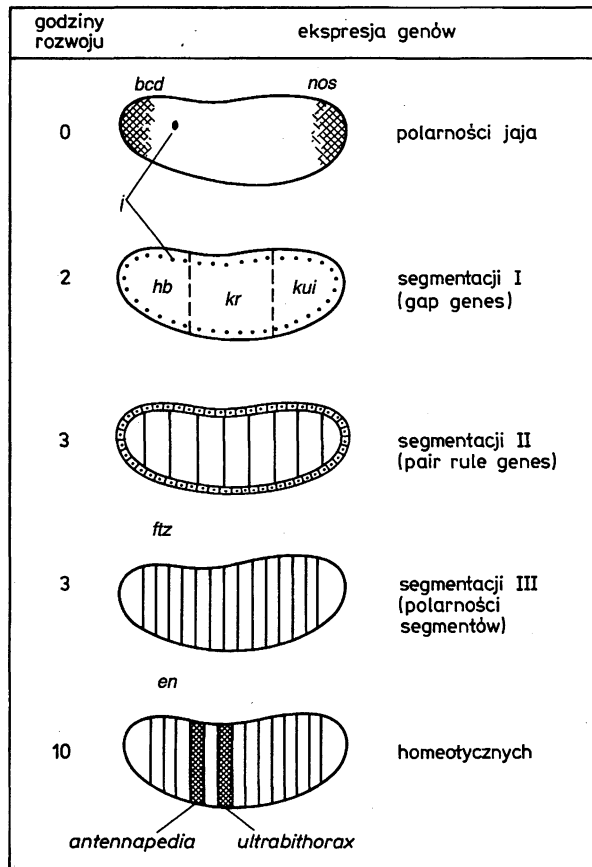
10.2.3. Ukształtowaniem postaci *Drosophila* wzdłuż osi przednio-tylnej zawładuje hierarchiczny układ genów regulatorowych

Rozwój muszki owocowej przebiega bardzo szybko. Po zapłodnieniu jądra zygoty dzielą się co ok. 10 min, po czym jądra potomne otoczone cytoplazmą wędrują ku obwodowi jaja (rys. 10.8), tworząc po 2,5 h od zapłodnienia syncytialną blastodermę, która następnie, po utworzeniu błon komórkowych, przekształca się w jednowarstwową blastodermę komórkową, w środku wypełnioną żółtkiem. W 3,5 h po zapłodnieniu rozpoczyna się gastrulacja i ruchy komórkowe doprowadzające do powstania larwy, która po 20 h wylęga się z jaja, a następnie przechodzi przez 3 stadia larwalne. Po 5 dniach powstaje poczwarka, a po 9 dniach — postać dorosła. Plan budowy osobnika zostaje zdeterminowany już pierwszego dnia rozwoju, w stadium blastodermy, gdyż wtedy uaktywniają się geny wyznaczające pozycję i organizację przyszłych segmentów ciała.



Rys. 10.8. Bruzdkowanie komórki jajowej *D. melanogaster* (wg Wilkinsa, 1986 — zmodyf.)

Analiza ekspresji u form dzikich i mutantów wykazała, że geny te występują w 5 grupach, tworzących hierarchiczny układ regulacyjny (rys. 10.9), w którym geny wyższej kategorii decydują o aktywności genów podrzędnych (ale nie na odwrót), natomiast geny w obrębie tej samej grupy mogą nawzajem wpływać



Rys. 10.9. Hierarchia genów regulatorowych uruchamianych w pierwszych godzinach (0h–10h) rozwoju zarodka *D. melanogaster*. Zaznaczono rozkład transkryptów RNA lub białek kodowanych przez niektóre geny; j — jądro (częściowo wg Biggin i Tjian, 1989 — zmodyf.)

na swoją aktywność. Nadrzędną pozycję zajmują geny polarności jaja, które decydują o orientacji przedniej i tylnej części ciała, następne 3 kategorie stanowią geny segmentacji, które wyznaczają podział ciała na segmenty, na dole hierarchii zaś występuje kategoria genów homeotycznych, które decydują o prawidłowym zróżnicowaniu każdego segmentu, zgodnie z jego pozycją wzdłuż osi przednio-tylnej (niektóre zaburzenia funkcji tych właśnie genów objawiają się jako mutacje homeotyczne, stąd nazwa). Jak się okazało, geny te (a przynajmniej większość z nich) kodują białka typu regulatorowego, których struktura wskazuje, że mogą się wiązać ze specyficznymi sekwencjami DNA i jako czynniki transkrypcyjne wpływać na aktywność innych, albo także i własnych, genów. W niektórych przypadkach wykazano aktywność tych białek w układach transkrypcyjnych *in vitro*, a także *in vivo*.

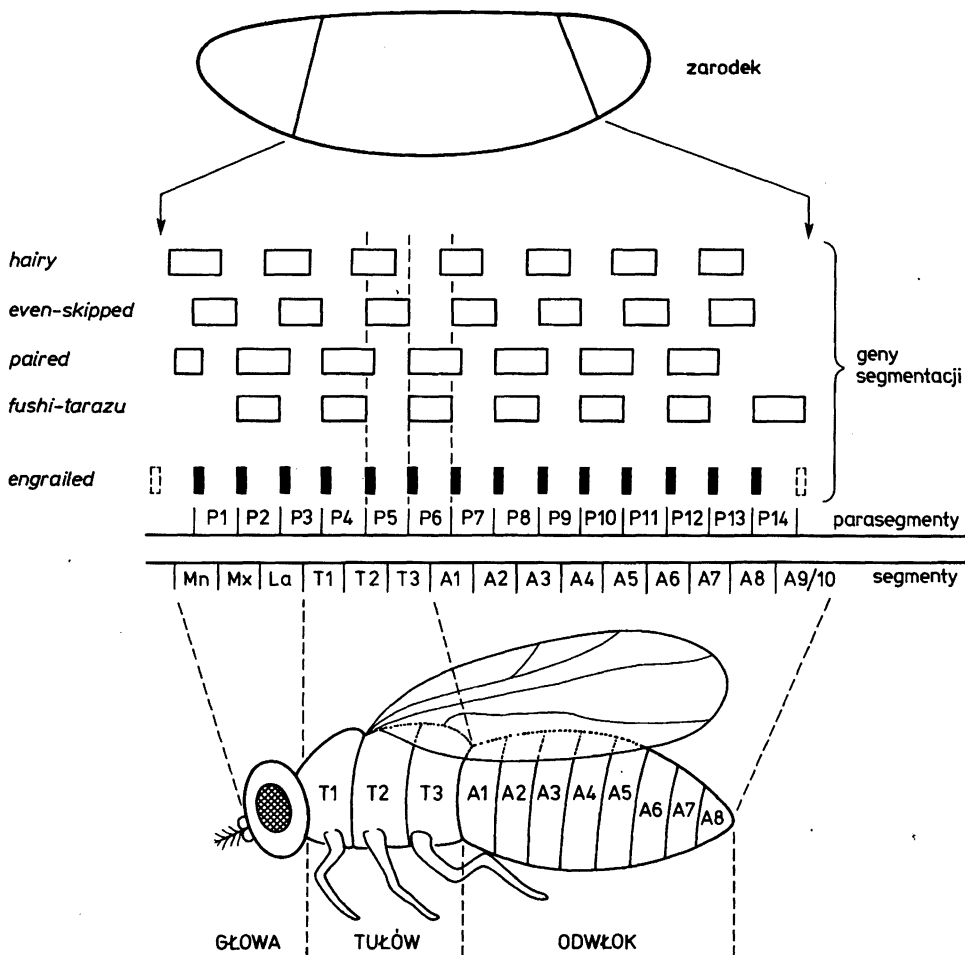
10.2.4. Geny polarności jaja wyznaczają przedni i tylny biegun zarodka

Geny polarności jaja (ang. egg polarity genes) powodują tzw. efekt maceczny, gdyż ich produkty zostają zdeponowane w oocycie jeszcze pod kontrolą genotypu osobnika macecznego. Do zilustrowania działania genów tej kategorii posłuży gen *bicoid* (*bcd*) wyznaczający przedni koniec ciała (rys. 10.9): zarodki mutantów są pozbawione głowy i struktur tułowiowych, ale można temu zapobiec przeszczepiając cytoplazmę z przedniej części jaj typu dzikiego. Jak wykazano metodą hybrydyzacji *in situ*, cząsteczki mRNA genu *bicoid* są syntetyzowane w organizmie matki, w komórkach odżywczych jajnika, skąd przechodzą do oocyty, gdzie od razu zostają zakotwiczone (prawdopodobnie przez elementy cytoszkieletu), wyznaczając w ten sposób przednią część jaja. Zaraz po zapłodnieniu na matrycach mRNA zostaje zsyntetyzowane białko genu *bicoid*, które rozprzestrzenia się, sięgając do połowy długości jaja, i tworzy gradient stężenia, malejący ku tyłowi. Produkt genu *bicoid* zachowuje się jak typowy morfogen, tzn. substancja wywołująca specyficzną indukcję, gdyż cytoplazma zawierająca białko tego genu po wprowadzeniu w dowolną okolicę mutantu *bicoid* indukuje w miejscu iniekcji powstanie struktur charakterystycznych dla przedniej części ciała.

W tym samym czasie translacji ulegają też transkrypty innych genów polarności, wyznaczających tylny koniec jaja i niezbędnych do uformowania potem segmentów odwłokowych. Z tej grupy najważniejszą rolę odgrywa gen *nanos* (*nos*). Syncytialna blastoderma w stadium, w którym powstaje, zawiera już przynajmniej dwa przeciwstawne gradienty produktów kodowanych przez geny polarności jaja: *bicoid* i *nanos*. Dostarczają one wstępnych sygnałów pozycyjnych, które wpływają następnie na aktywność niżej położonych w hierarchii genów segmentacji i zawężają ich ekspresję do konkretnych regionów. Niektóre z tych zależności udało się już sprecyzować: białko genu *bicoid*, tworzące gradient w przedniej części jaja, jest czynnikiem transkrypcyjnym, który wiąże się specyficznie z sekwencją regulatorową promotora genu segmentacji *hunchback* (*hb*) (rys. 10.9), aktywując jego transkrypcję, co wykazano w układzie transkrypcyjnym *in vitro*. Natomiast rola białka genu *nanos*, tworzącego gradient w tylnej części jaja, polega na destabilizacji w tym regionie macecznych transkryptów genu *hunchback* zdeponowanych w oocycie jeszcze w jajniku matki. Dzięki gradientowi morfogenu *nanos*, transkrypty te, które są represorami uniemożliwiającymi wykształcenie struktur odwłokowych, zostaną ograniczone tylko do przedniej części jaja.

10.2.5. Geny segmentacji wyznaczają granice 14 parasegmentów

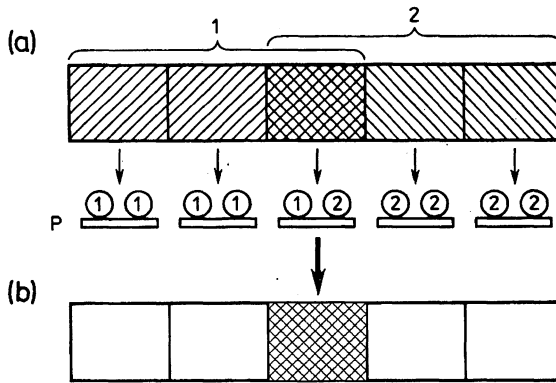
Geny segmentacji, uaktywniające się w zarodku, dzielą się na 3 kategorie. Pierwszą w szeregu hierarchicznym stanowią 3 geny, których transkrypcja przypada jeszcze na okres syncytialnej blastodermy. Ich mutacje powodują



Rys. 10.10. Zróżnicowana ekspresja genów segmentacji II grupy, a następnie genu *engrailed*, prowadzi do podziału zarodka *D. melanogaster* na 14 parasegmentów, z których powstaną później definitywne segmenty (por. rys. 10.9) (wg Alberts i wsp., 1989 — zmodyf.)

brak wielkich partii ciała (ang. gap genes) i wczesną letalność. Do tej grupy należy wspomniany poprzednio gen *hunchback*, uaktywniany za pośrednictwem genu *bicoid* w przedniej części ciała, oraz gen *knirps* (*kni*) aktywny w tylnej części, gdyż tylko tam nie jest reprimowany przez maticzne transkrypty *hunchback*. Ekspresja trzeciego genu, *Krüppel* (*Kr*), zachodzi tylko w środkowej części, gdyż zarówno w przedniej, jak i w tylnej części jego transkrypcja jest hamowana przez zlokalizowane tam białka odpowiednich genów polarności jaja. Dzięki wzajemnym skomplikowanym i słabo jeszcze poznanym oddziaływaniom, geny tej grupy są odpowiedzialne za wyznaczenie dużych stref ciała (rys. 10.9), w obrębie których będą działały geny segmentacji niższej rangi.

Do drugiej kategorii genów segmentacji należy 8 genów o bardziej lokalnym działaniu, wyznaczających regiony tzw. parasegmentów (są to zaczątki segmen-



Rys. 10.11. Model powstawania nowego wzoru ekspresji. (a) Dwa białka regulatorowe (1, 2), rozmieszczone dyfuzyjnie w 5 komórkach, łączą się z promotorem (p). (b) Synergistyczne działanie białek 1 i 2 uruchamia ekspresję genu tylko w środkowej komórce (wg Biggin i Tjian, 1989 — zmodyf.).

tacji przesunięte o pół szerokości w stosunku do definitywnych segmentów, jak ukazano na rys. 10.10). Ekspresja tych genów zbiega się w czasie z celularyzacją, polegającą na przekształceniu blastodermi syncytialnej w komórkową. Mutacje tych genów powodują brak co drugiego parasegmentu, np. mutanty genu *fushi tarazu* (po japońsku: mało segmentów, *ftz*) nie mają parasegmentów nieparzystych, natomiast mutantom *even-skipped* (*eve*) brak parasegmentów parzystych (stąd ang. nazwa całej tej kategorii genów pair-rule genes). Analiza ekspresji tych genów wykazała, że każdy z nich jest aktywny tylko w tych partiach ciała, których brakuje u odpowiednich mutantów, jednak początkowe rozmieszczenie mRNA tylko w przybliżeniu odpowiada definitywnej lokalizacji, która ustala się dopiero pod wpływem działania zsyntetyzowanych białek, regulujących nawzajem ekspresję własnych genów. Rysunek 10.11 pokazuje, w jaki sposób dyfuzyjne rozprzestrzenianie się cząsteczek regulatorowych może doprowadzić do powstania ostrych granic między strefami. Geny tej kategorii wywierają efekt lokalny tylko na te komórki, w których nastąpiła transkrypcja. Wspólne działanie genów pierwszej i drugiej kategorii doprowadza do podziału blastodermi zarodka na strefy odpowiadające przyszłym 14 parasegmentom.

Trzecią kategorię genów segmentacji stanowi 10 genów polarności segmentów (ang. segment polarity genes), które wyznaczają określoną część każdego segmentu, np. mRNA genu *engrailed* (*en*) wykrywalny jest w formie 14 prążków (każdy o szerokości jednej komórki), zlokalizowanych w przedniej ćwiartce poszczególnych parasegmentów (rys. 10.10), natomiast mRNA genu *wingless* (*wg*) — w ćwiartce tylnej. U mutantów ta część każdego parasegmentu zbudowana jest nietypowo, jako lustrzane odbicie części pozostałej. Dopiero aktywność genów polarności segmentów doprowadza do wytworzenia ostrych granic między parasegmentami (rys. 10.9).

Kolejna ekspresja przytoczonych do tej pory kategorii genów stwarza więc coraz dokładniejszą mozaikę sygnałów pozycyjnych, wyposażając każdą komórkę w zestaw informacji precyzujących jej lokalizację w zarodku. Wprawdzie wzór ekspresji genów polarności jaja oraz dwóch pierwszych grup genów

segmentacji jest przemijający i zanika po gastrulacji, ale w komórkach pozostaje trwały ślad: jest nim trwała aktywacja odpowiednich genów polarności segmentów i genów homeotycznych.

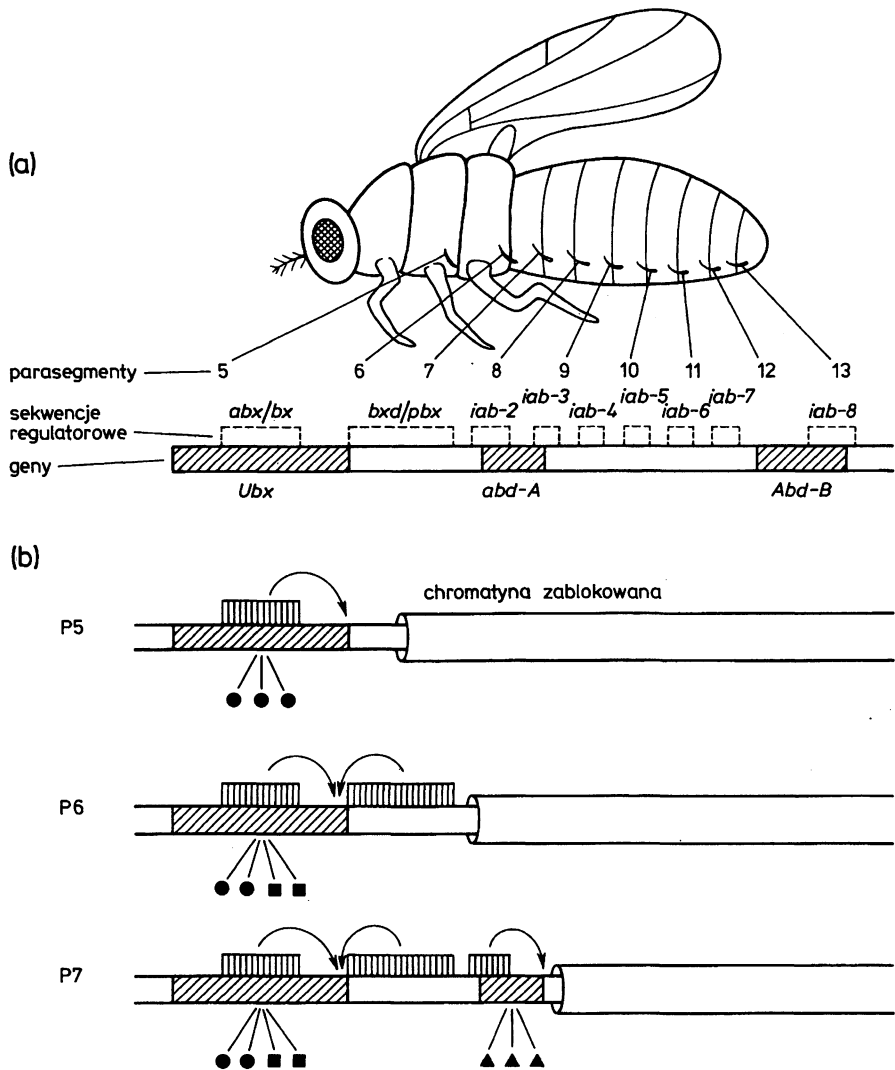
10.2.6. Geny homeotyczne kompleksu *Antennapedia* i *bithorax* decydują o zróżnicowaniu parasegmentów na głowowe, tułowiowe i odwłokowe

Główne geny homeotyczne (ang. homeotic genes lub homeotic selector genes) występują w prawym ramieniu trzeciego chromosomu w postaci dwu kompleksów genów sprzężonych, z których kompleks *Antennapedia* (*ANT-C*) wyznacza różnice między segmentem głowowym a trzema segmentami tułowia, natomiast kompleks *bithorax* (*BX-C*) — różnice między segmentami tułowia a odwłoka. Na przykład larwy z całkowitą delecją kompleksu *BX-C* mają głowę i przednią część tułowia normalne, ale począwszy od parasegmentu P-4 (p. rys. 10.10), wszystkie następne są jednakowe, zbudowane tak samo jak P-4.

Oba kompleksy zostały sklonowane i zbadano ich ekspresję. Rozpoczyna się ona bezpośrednio przed celularyzacją blastodermy i początkowo jest dość rozległa, tworząc zachodzące na siebie strefy. Ekspresją tą kieruje skomplikowana kombinacja białek kodowanych zarówno przez geny polarności jaja, jak i przez geny segmentacji. W miarę jak przybywa tych białek wskutek aktywowania kolejnych grup genów segmentacji, ekspresja genów homeotycznych staje się coraz bardziej precyzyjna.

Regulacja ekspresji genów w obu kompleksach jest bardzo złożona, na co wskazuje niezwykle długi ciąg sekwencji regulatorowych, np. w kompleksie *BX-C* sekwencje kodujące białka mają długość tylko 20 000 nukleotydów, natomiast sekwencje regulatorowe — aż 300 000. Ponadto kompleks ten, składający się tylko z trzech jednostek transkrypcji, decyduje o wykształceniu aż 9 parasegmentów. Pierwotne transkrypty są poddawane obróbce w różny sposób w zależności od czasu i miejsca, w którym następuje transkrypcja. A co najbardziej zadziwiające, poszczególne geny obu kompleksów są ułożone w chromosomie w takiej samej kolejności jak parasegmenty, których specjalizację wyznaczają (rys. 10.12).

Mechanizm tych zależności można sobie wyobrazić następująco. W kompleksie *BX-C* znajdują się trzy geny (*Ubx*, *abd-A* i *Abd-B*, p. rys. 10.12) i 9 regionów regulatorowych (enhancerów), również ułożonych w takiej samej kolejności (od *abx/bx* do *iab-8*), jak regulowane przez nie parasegmenty. Przymuszcza się początkowo chromatyna tego kompleksu jest skondensowana (lub w jakiś inny sposób zablokowana) we wszystkich komórkach. Stopniowo w komórkach kolejnych parasegmentów (od przodu ku tyłowi) coraz to dalsze odcinki chromatyny przechodzą w stan aktywny, udostępniając kolejne regiony regulatorowe; i tak w parasegmencie 5 odsłonięty będzie odcinek *abx/bx*, w parasegmencie 6 — odcinek *bxd/pbx*, a w parasegmencie 7 — odcinek *iab-2*. Przyłączające się do tych odcinków regulatorowych odpowiednie czynniki transkrypcyjne umożliwiają rozpoczęcie transkrypcji coraz dalej położonych



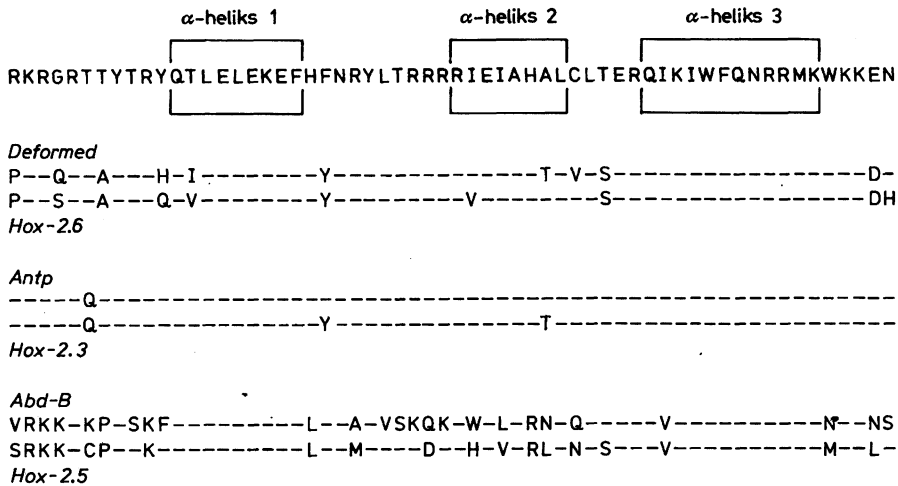
Rys. 10.12. Organizacja kompleksu *bithorax* (*BX-C*) u *D. melanogaster*. (a) O specyficznym różnicowaniu się poszczególnych parasegmentów decydują regiony regulatorowe (*abx/bx* — *iab-8*) kierujące ekspresją trzech genów (*Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*). (b) W komórkach następujących po sobie parasegmentów (P5–P7) odsłaniają się coraz dalsze odcinki chromaty, udostępniając kolejne regiony regulatorowe; przyłączające się do nich czynniki transkrypcyjne uruchamiają transkrypcję i wpływają na sposób obróbki RNA, wskutek czego zmienia się repertuar produkowanych białek (wg Alberts i wsp., 1989 — zmodyf.)

genów. Jednocześnie czynniki te muszą mieć wpływ na alternatywne sposoby obróbki pierwotnego transkryptu, wskutek czego na matrycy trzech tylko genów powstaje wiele różnych cząsteczek mRNA i białek. Między poszczególnymi genami homeotycznymi zachodzi interakcja, gdyż produkt kolejno uruchamianego genu powoduje represję genu poprzedniego.

Opisany powyżej mechanizm powoduje, że repertuar zsyntetyzowanych białek regulatorowych zmienia się w komórkach kolejnych parasegmentów i wywołuje w pamięci komórkowej trwały ślad, zachowany nie tylko w komórkach larwy, ale także w komórkach tarcz imaginalnych stanowiących zawiązki, z których powstaje w czasie przeobrażenia ciało dorosłego owada. W doświadczeniach transplantacyjnych wykazano bowiem, że tarcze te rozwijają się autonomicznie, zgodnie z własnym pochodzeniem, bez względu na to, w jakie miejsce zostaną wszczepione. Analiza mutantów wskazuje, że jednym z elementów tej pamięci jest stała aktywność genu *Ultrabithorax*, utrzymywana przez produkt własnego genu na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego.

10.2.7. Wiele genów kierujących rozwojem zawiera sekwencję, zwaną homeoboksem, kodującą białko o charakterze czynnika transkrypcyjnego

Klonowanie genów homeotycznych kompleksu *ANT-C* i *BX-C* wykazało, że wszystkie one zawierają sekwencję długości 180 nukleotydów o bardzo wysokim stopniu homologii. Sekwencja ta, odkryta w roku 1984 i nazwana homeoboksem (ang. homeobox), została potem znaleziona również w genach polarności jaja i w wielu genach segmentacji, a także w niektórych genach wyznaczających oś grzbieto-brzuszną. Homeoboks koduje domenę białkową, zwaną homeodomeną, o długości 60 aminokwasów, złożoną z trzech fragmentów α -helikalnych (rys. 10.13), tworzących strukturę typu „heliks–skręt–he-



Rys. 10.13. Sekwencje aminokwasów (oznaczenia jednoliterowe, p. tab. 5.1(b)) homeodomeny w odpowiadających sobie genach u *D. melanogaster* (*Deformed*, *Antp*, *Abd-B*) i myszy (*Hox-2.6*, *Hox-2.3*, *Hox-2.5*). Kreski oznaczają aminokwasy zgodne z sekwencją najwyższej zgodności (u góry). Zaznaczono fragmenty tworzące trzy α -heliksy, z których trzecia decyduje o specyficzności wiązania z DNA (wg *Scientific American*, July 1990)

liks” (ang. helix–turn–helix). Podobna struktura występuje w białkowym regulatorze transkrypcji w systemie MAT u drożdży, co od razu wskazywało na zdolność homeodomeny do wiązania się ze specyficznymi sekwencjami DNA. Obecnie wiadomo, że homeodomena gra rolę czynnika transkrypcyjnego, co w odniesieniu do niektórych genów już zostało wykazane eksperymentalnie *in vitro* lub *in vivo*. Badania rentgenograficzne doprowadziły do wyznaczenia dokładnej struktury homeodomeny genu *engrailed* oraz sposobu jej wiązania się z sekwencją TAATX w DNA.

Białka zawierające homeodomenę biorą udział w skomplikowanych oddziaływaniach, w różny sposób regulując powiązane ze sobą funkcjonalnie zespoły genów. Na przykład promotor genu *Ubx* ma wiele sekwencji regulatorowych, z których jedna jest rozpoznawana przez homeodomenę kodowaną przez gen *ftz*, druga przez homeodomenę genu *Abd B*, a trzecia przez homeodomenę genu *en*; dołączenie pierwszej z nich do promotora *Ubx* powoduje aktywację tego genu, natomiast dołączenie dwu pozostałych — jego represję. Jednocześnie w tych samych komórkach promotor genu *ftz*, również aktywowany przez białko genu *ftz*, nie jest wcale regulowany ani przez białko genu *Abd B* ani *en*. Jeżeli promotor ma wiele elementów rozpoznawanych przez homeodomeny i przyłącza różne z nich, to mogą one działać antagonistycznie lub synergistycznie. W ten sposób niewielka liczba białek regulatorowych, działając w różnych kombinacjach, może kontrolować w sposób specyficzny aktywność wielu genów.

Niektóre geny kierujące rozwojem *Drosophila*, ale nie zawierające homeoboksu, kodują inne domeny białkowe zdolne do specyficznego wiązania się z DNA. Na przykład w pierwszej kategorii genów segmentacji (ang. gap genes) wykryto obecność fragmentu kodującego domeny białkowe typu palców cynkowych (ang. zinc fingers), jakie występują np. w czynniku transkrypcyjnym TFIIIA u płaza *Xenopus*. Opisano również występującą w niektórych genach segmentacji sekwencję nazwaną *Pax* (ang. paired box), która prawdopodobnie także odgrywa rolę regulatorową, gdyż kodowana przez nią domena białkowa zawiera motyw łączący się z DNA.

Powyższe dane, a także fakt, że białka kodowane przez geny kierujące rozwojem *Drosophila* znajdują się na terenie jądra, nie pozostawiają wątpliwości, że mamy do czynienia z białkami regulatorowymi, wiążącymi się ze specyficznymi sekwencjami DNA i wpływającymi na transkrypcję odpowiednich genów. To tłumaczy zarówno hierarchiczne zależności między tymi genami, jak i autoregulację, jeżeli sekwencja regulatorowa danego genu jest rozpoznawana przez jego własny produkt.

Działanie genów kierujących ukształtowaniem ciała u *Drosophila* zostało tu przedstawione w sposób schematyczny i niezmiernie uproszczony, na kilku tylko przykładach. Chociaż postęp w wyjaśnianiu tych zjawisk jest w ostatnich latach bardzo szybki, jednak do poznania mechanizmów genetycznych kierujących rozwojem *Drosophila* wciąż jeszcze daleko.

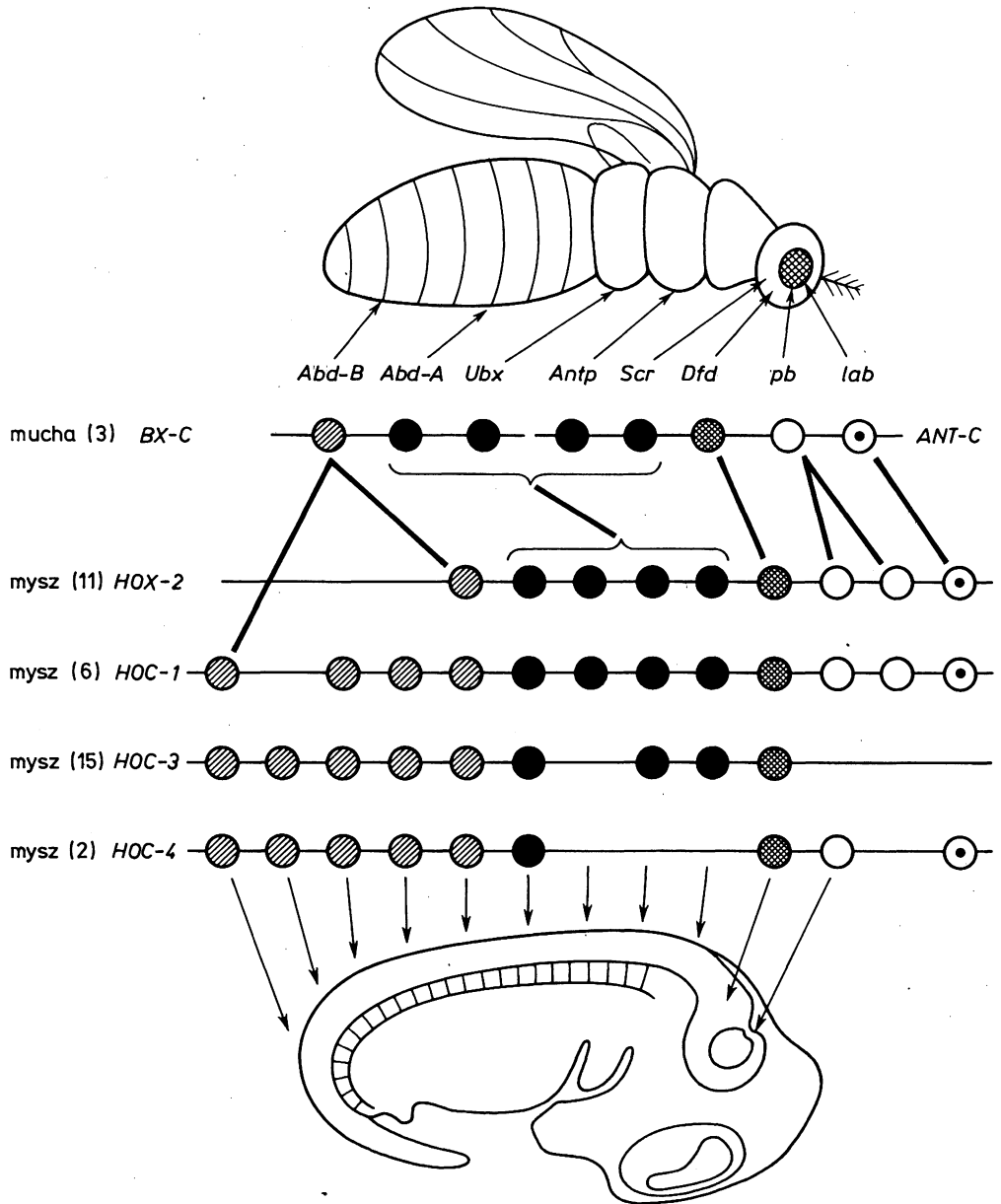
10.2.8. Sekwencja homeoboksu występuje w genach kierujących rozwojem u zwierząt bezkręgowych i kręgowców

Odkrycie sekwencji homeoboksu w genach kierujących rozwojem *Drosophila* od razu nasunęło przypuszczenie, że sekwencja ta może odgrywać rolę także u innych organizmów. Rzeczywistość przeszła jednak najśmielsze oczekiwania! Posługując się tą sekwencją jako sondą do hybrydyzacji DNA banków genomowych różnych zwierząt, stwierdzono obecność homeoboksu w genach wielu bardzo odległych od siebie ewolucyjnie grup, m.in. u nicienia — *C. elegans*, u pierścienic, jeżowców, prymitywnych strunowców i kręgowców (w tym u żaby, kury, myszy i człowieka). W wielu przypadkach wykazano, że ekspresja genów z homeoboksem występuje już we wczesnym okresie zarodkowym i ma specyficzną lokalizację, co wskazuje na ich udział w wyznaczaniu planu budowy organizmu.

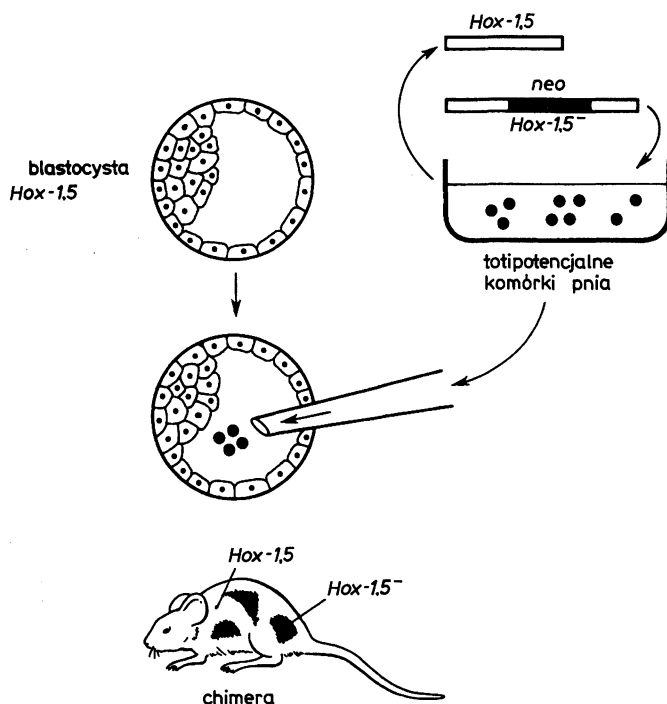
Geny zawierające homeoboks zostały dość dobrze zbadane u człowieka i u myszy, u których nazwano je genami *Hox*. U obu tych gatunków zidentyfikowano już około 30 różnych genów *Hox*, które występują w 4 grupach sprzężeń jako kompleksy *HOX* (rys. 10.14). Ułożenie genów w każdym z tych kompleksów wykazuje bardzo duże podobieństwo do połączonych kompleksów *ANT-C + BX-C* u *Drosophila*, tzn. najbardziej homologiczne w stosunku do siebie geny, tworzące tzw. podrodziny, występują w tej samej kolejności (rys. 10.14). A więc geny zajmujące tę samą pozycję w różnych kompleksach są bardziej do siebie podobne niż geny sąsiadujące w jednym kompleksie. Homologia tych genów dotyczy głównie sekwencji, która koduje homeodomenę, a zwłaszcza jej fragment składający się z 12 aminokwasów, biorących bezpośredni udział w wiązaniu homeodomeny z DNA (rys. 10.13).

Prawdopodobnie w linii prowadzącej do strunowców nastąpiła kilkakrotna duplikacja całego układu, który u bezkręgowców występuje w genomie pojedynczo. Co więcej, okazało się, że podobnie jak u *Drosophila* istnieje ścisły związek między kolejnością ułożenia genów w chromosomie a miejscem ich aktywności w osobniku! Geny usytuowane najbliżej końca 5' decydują o rozmieszczeniu narządów położonych najbardziej ku tyłowi. Zwłaszcza przednia (w kierunku od głowy do ogona) granica ekspresji poszczególnych genów *Hox* w układzie nerwowym oraz w odcinkach sklerotomu (zaczątki kręgow) zarodka myszy jest bardzo wyraźna i odpowiada kolejności tych genów w chromosomie (rys. 10.14). Na podstawie dotychczasowych danych można sprecyzować dwa wnioski ogólne dotyczące genów *Hox*:

- a) przednia granica ekspresji genu (na przednio-tylnej osi ciała) zależy od jego pozycji w kompleksie;
- b) geny wykazujące ekspresję w tym samym regionie pochodzą z tej samej podrodziny.



Rys. 10.14. Podobieństwo układu genów kierujących rozwojem u *D. melanogaster* (kompleks *BX-C* i *ANT-C*) oraz u myszy (4 kompleksy *HOX*, liczby w nawiasach oznaczają numer chromosomu). Pozycja genu w każdym kompleksie decyduje o miejscu jego ekspresji wzdłuż osi przednio-tylnej zwierzęcia. Odpowiadające sobie geny w poszczególnych kompleksach znaczone tym samym rodzajem cieniowania; strzałki wskazują miejsca ich ekspresji (u *D. melanogaster* na integumencie, u myszy w cewce nerwowej i zawiązkach kręgów) za (wg Duboule i wsp., 1990, zmienione; geny kompleksu *HOX-3* i *4* wg Krumlauf, 1992)



Rys. 10.15. Schemat wprowadzania genu *Hox-1.5^{-/-}* do myszy. W hodowli totipotencjalnych komórek pochodzących od myszy pigmentowanej wymieniono przez homologiczną rekombinację aktywny gen *Hox-1.5* na gen *Hox-1.5^{-/-}*, niefunkcjonalny wskutek włączonej w jego ciąg sekwencji kodującej neomycynę (*neo*). Komórki te, po wprowadzeniu do blastocysty o genotypie albinotycznym, wzięły udział w utworzeniu różnych tkanek i narządów chimery; ciemne partie sierści zawierają gen *Hox-1.5^{-/-}*

Geny *Hox* wykazują podobieństwo do genów homeotycznych u *Drosophila* nie tylko pod względem struktury; zachowały one także swoje pierwotne funkcje: po wprowadzeniu do organizmu *Drosophila* genu myszy odpowiadającego genowi *Antennapedia* i spowodowaniu jego nadmiernej ekspresji uzyskano muchy z odnóżami zamiast czułków, podobnie jak przy nadmiernej ekspresji własnego genu.

Chociaż wciąż jeszcze nie jest wyjaśniona funkcja tych genów u kręgowców, nie ulega wątpliwości, że grają one rolę w różnicowaniu się narządów osobnika. Dowiodły tego bezpośrednio badania nad działaniem genu *Hox-1.5* u myszy, w których wykorzystano wiele rozwiniętych ostatnio technik z zakresu inżynierii genetycznej. Przez homologiczną rekombinację w totipotencjalnych komórkach embrjonalnych myszy — tzw. komórkach pnia (ang. stem cells) hodowanych *in vitro* wymieniono normalny gen *Hox-1.5* na gen nieaktywny (*Hox-1.5^{-/-}*), którego ciągłość została przerwana przez wstawienie sekwencji powodującej oporność na neomycynę (umożliwiającej selekcję stransformowanych komórek). Komórki zawierające ten zmutowany gen wprowadzono do blastocyst myszy, uzyskując chimery (rys. 10.15), w których pewne tkanki

pochodzący od blastocysty, inne zaś od komórek ze zmutowanym genem. W niektórych przypadkach te ostatnie dały też początek komórkom linii płciowej, dzięki czemu uzyskano heterozygoty przekazujące gen zmutowany do gamet. Osobniki te były normalne, ale powstające w ich potomstwie homozygoty *Hox-1.5⁻/Hox-1.5⁻* ginęły zaraz po urodzeniu, wykazując niedorozwój narządów pochodzących z łuków i kieszonek skrzelowych (m.in. brak grasicy i przytarczycy, mała tarczyca, nienormalności chrząstek, a ponadto defekty sercowo-naczyniowe). Normalny gen *Hox-1.5* rozpoczyna ekspresję jako jeden z najwcześniej działających genów *Hox*, już w przed-somitowej mezodermie i ektodermie przedniej części ciała 7–8-dniowych zarodków myszy. Wprawdzie braki narządów u homozygotycznych mutantów nie były tak wielkie jakby to wynikało z wzoru ekspresji genu *Hox-1.5* u normalnych zarodków, jednak wyniki te wyraźnie wskazują, że gen ten jest niezbędny do życia i że bierze udział w kontroli powstawania określonych narządów. Ponadto wyniki te świadczą o tym, że homologiczne do genu *Hox-1.5* geny z tej samej podrodziny w pozostałych kompleksach *HOX* (p. rys. 10.14; białe kółka w kompleksach *Hox-1*, *Hox-2* i *Hox-4*) są jednak funkcjonalnie zróżnicowane, gdyż nie mogą go zastąpić u homozygotycznych mutantów.

Wykryto jeszcze inne bardzo interesujące zjawisko: pewne geny *Hox*, których ekspresja pojawia się najpierw w narządach osiowych (system nerwowy, zawiązki kręgow), wykazują potem ekspresję również w narządach obwodowych, np. kończynach, i to także w sposób uporządkowany, tzn. układowi przednio-tylnemu w narządach osiowych odpowiada układ proksymalno-dystalny w kończynach. Jest to zadziwiająca ekonomia, dzięki której ten sam system regulacyjny zostaje zastosowany wielokrotnie i w podobny sposób w różnych etapach rozwoju.

Należy wreszcie podkreślić wielkie znaczenie metodologiczne odkrycia sekwencji homeoboksu. Ponieważ u ssaków nie pojawiają się mutanty homeotyczne (albo są letalne, albo ich występowaniu zapobiegają duże zdolności regulacyjne), nie można było metodami klasycznymi wyszukać genów kierujących rozwojem. Na ich ślad naprowadziła dopiero sekwencja homeoboksu zidentyfikowana najpierw dzięki mutantom homeotycznym u *Drosophila*. Był to przełom, który zapoczątkował szybki postęp genetyki rozwoju.

10.2.9. Sekwencje homeoboksu tworzą konserwatywną ewolucyjnie rodzinę

Geny zawierające sekwencję homeoboksu tworzą dużą rodzinę genów kierujących rozwojem i rozpowszechnionych w różnych grupach zwierząt. Okazało się, że rodzina ta ma jeszcze szerszy zasięg. W roku 1991 zidentyfikowano bowiem białko zawierające homeodomenę, kodowane przez gen *Knotted-1* (*Kn1*) u kukurydzy! Wydaje się, że gen ten reguluje procesy roz-

wojowe, ponieważ jego mutacje powodują nieprawidłowy rozwój użytkowania liści i powstawania na nich wybrzuszeń lub węzłów (stąd nazwa genu). Homeodomena kodowana przez gen *Kn1* wykazuje największe podobieństwo (ok. 35% homologii) do homeodomeny kodowanej przez jeden z genów człowieka oraz do białka genu *MAT Pi* u drożdży.

Te podobieństwa sugerują, że prototyp sekwencji homeoboksu wywodzi się od przodka żyjącego przed rozdzieleniem się królestw roślin, zwierząt i grzybów, czyli jeszcze przed ewolucją organizmów wielokomórkowych. Ponieważ we wszystkich przypadkach chodzi o geny wyznaczające dalsze losy komórek, można stąd wysnuć wniosek, że rozwój wielokomórkowca jest regulowany za pomocą modyfikacji mechanizmów, które decydują o losach komórek, także u jednokomórkowców. Jednak tylko u zwierząt geny z sekwencją homeoboksu występują w formie kompleksu genów sprzężonych, których kolejność ułożenia w chromosomie koreluje z wzorem ich ekspresji komórkowej wzdłuż osi przednio-tylnej organizmu (p. rys. 10.14).

Hierarchiczny układ genów o wysokim stopniu homologii (p. rys. 10.13), zawierających homeoboks i kierujących rozwojem *Drosophila*, pozwala sądzić, że geny te powstawały w ewolucji przez kolejne duplikacje. Przypuszczenie, że w filogenezie jako pierwsze wykształciły się geny polarności jaja, które wyznaczyły przedni i tylny biegun prymitywnych organizmów, wydaje się logiczne. Następnie powstanie genów segmentacji umożliwiło podział ciała na jednakowe odcinki (jak u pierścienic), a dopiero ewolucja genów homeotycznych doprowadziła do zróżnicowania ciała na głowę, tułów i odwłok. Hipotezę tę będzie można zweryfikować dopiero po dokładnym zbadaniu genów kierujących rozwojem w innych grupach. Natomiast ewolucji strunowców towarzyszyły (lub ją poprzedziły) kilkakrotne duplikacje już nie tylko pojedynczych genów, ale całego kompleksu *HOX*. Być może, iż dopiero zwielokrotniony repertuar informacji pozycyjnych i regulacyjnych umożliwił wykształcenie tak skomplikowanych organizmów jak kręgowce.

W tych rozważaniach wzięte były pod uwagę tylko geny z sekwencją homeoboksu. Trzeba pamiętać, że oprócz nich rolę regulatorową w rozwoju odgrywają także sekwencje kodujące domeny palców cynkowych oraz z pewnością wiele innych (p. s. 302).

10.3. Kontrola genetyczna determinacji płci u zwierząt

U wszystkich gatunków rozdzielнопłciowych wynik końcowy determinacji płci jest w zasadzie taki sam, tzn. w prawidłowych warunkach każdy osobnik zostaje zróżnicowany jako samica lub samiec, natomiast mechanizmy prowadzące do osiągnięcia tego stanu mogą być różne. Zasadnicze elementy genetycznej kontroli determinacji płci i różnicowania się płciowego osobnika można przedstawić w trzech etapach. Pierwszy etap stanowi sygnał wywoławczy, który działa jak „przełącznik” nastawiający rozwój organizmu według typu żeńs-

kiego lub męskiego. Sygnałem tym może być czynnik środowiskowy (np. u żółwi jest nim temperatura otoczenia) lub genetyczny, jak obecność pewnych chromosomów (genów) albo wzajemne stosunki między nimi, np. stosunek liczby chromosomów X do liczby autosomów u *Drosophila*, u ssaków zaś obecność chromosomu Y. Etap drugi to uruchomienie tzw. kaskady genów regulatorowych biorących udział w determinacji płci, z których każdy aktywuje lub hamuje działalność następnego z serii. I dopiero ostatni z nich oddziałuje na geny odpowiedzialne bezpośrednio za zróżnicowanie się narządów i struktur płciowych, co stanowi etap trzeci.

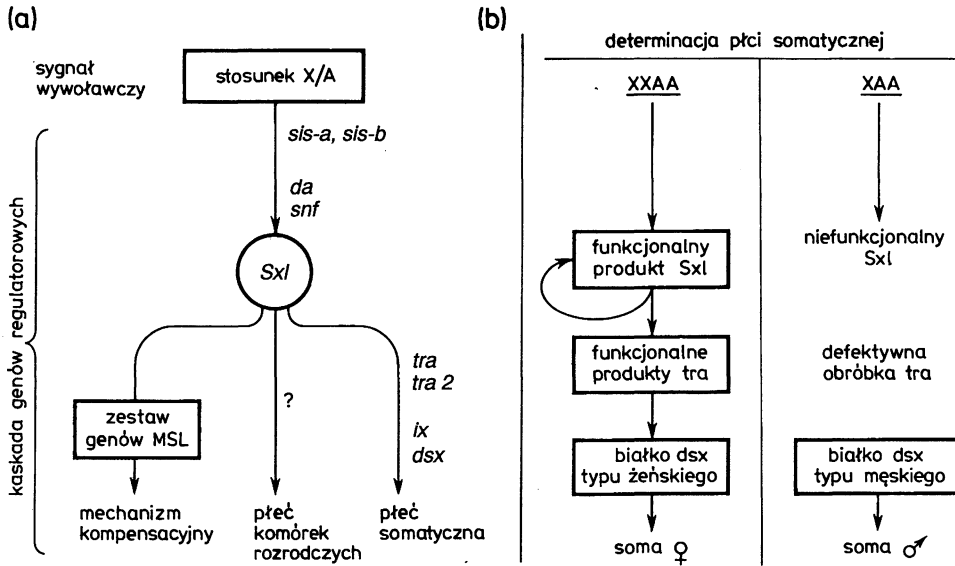
U wielu gatunków zróżnicowanie w kierunku jednej płci (podstawowej) może przebiegać niejako samorzutnie, natomiast rozwój w kierunku płci przeciwnej (dominującej) zostaje narzucony tylko w razie uruchomienia sygnału wywoławczego. Na przykład u ssaków płcią podstawową jest płć żeńska, wykształcenie płci męskiej zaś wymaga sygnału pochodzącego z chromosomu Y, natomiast u *Drosophila* podstawowa jest płć męska.

Badania nad determinacją płci i różnicowaniem się cech płciowych dotyczą wielu ważnych problemów biologicznych o ogólnym znaczeniu, jak precyzyjna kontrola ekspresji genów, autoregulacja, mierzenie wartości progowych, interakcje i koordynacje komórkowe. Dopiero od niedawna zaczynamy poznawać molekularne mechanizmy leżące u podstaw tych procesów. Zostały one najlepiej zbadane u *Caenorhabditis elegans* i u *D. melanogaster*, przy czym okazuje się, iż mimo pozornego podobieństwa przebiegu tych procesów u obu gatunków, szczegółowe mechanizmy molekularne mogą być odmienne. Tutaj ograniczymy się do omówienia mechanizmów determinacji płci u *Drosophila*, a następnie przedstawimy nowe osiągnięcia dotyczące ssaków, gdyż w tej grupie poczyniono w ostatnich latach bardzo duże postępy.

10.4. Determinacja płci u *D. melanogaster*

Znaczny postęp osiągnięty ostatnio w zrozumieniu mechanizmów determinacji płci u *D. melanogaster* wynika z połączenia badań genetycznych i molekularnych. Wyprodukowanie różnych mutantów o fenotypie wskazującym na zaburzenia determinacji płci umożliwiło poznanie najważniejszych genów regulatorowych, z których wiele już sklonowano, a nawet posłużono się nimi do uzyskania osobników transgenicznych. Kaskadę ważniejszych z tych genów przedstawia rysunek 10.16(a). Od sygnału wywoławczego (stosunek X/A) prowadzi droga do nadrzędnego genu regulatorowego *Sxl* (*Sex lethal*), który warunkuje trzy procesy:

a) regulację aktywności genów sprzężonych z chromosomem X, czyli mechanizm kompensacyjny (ang. dosage compensation), dzięki któremu aktywność genów w jednym chromosomie X u samca zostaje podwyższona do poziomu odpowiadającego łącznej ekspresji genów z obu chromosomów X u samicy;



Rys. 10.16 (a) Kaskada genów regulatorowych biorących udział w determinacji płci u *D. melanogaster*; (b) Mechanizm determinacji płci somatycznej (wg Hodgkina, 1990 — zmodyf.)

b) determinację płci somatycznej (dymorfizm płciowy komórek somatycznych);
 c) determinację płciową komórek rozrodczych (zróżnicowanie na jaja lub plemniki). Jak wynika ze schematu, te trzy procesy przebiegają u *Drosophila* w zasadzie niezależnie, jakkolwiek są regulowane przez ten sam sygnał wywoławczy i nadrzędny gen regulatorowy. Etapy te omówione zostaną kolejno.

10.4.1. Płeć u *Drosophila* jest zdeterminowana stosunkiem liczby chromosomów X do liczby autosomów

U *D. melanogaster* samice mają dwa chromosomy X, samce zaś jeden chromosom X i jeden Y. Determinacja płci nie zależy jednak ani od obecności chromosomu Y, ani od liczby chromosomów X, lecz od stosunku liczby chromosomów X do liczby zespołów autosomów, czyli stosunku X/A (gdzie A oznacza haploidalny zespół składający się z trzech autosomów). Wyjaśniły to już klasyczne badania przeprowadzone jeszcze w latach 20. przez C.B. Bridgesa. U normalnego samca stosunek X/A wynosi 0,5, u normalnej zaś samicy 1,0. Bridges w odpowiednio dobranych krzyżówkach osobników o różnej ploidalności otrzymał stosunki zarówno bardziej skrajne, jak i pośrednie (tab. 10.1). Okazało się, że występują tu pewne wartości progowe: przy stosunku pośrednim 0,67 powstają interseksy, tzn. osobniki składające się z mieszaniny komórek typu męskiego i typu żeńskiego, powyżej wartości 0,67 różnicują się samice, a poniżej — samce, z tym jednak, że stosunki wyższe niż 1,50 oraz niższe niż 0,33 prowadzą do letalności.

Tabela 10.1. Wpływ stosunku X/A na determinację płci u *Drosophila*

Genotyp	Liczba		Stosunek X/A	Fenotyp
	X	A		
AA XXX	3	2	1,5	samica
AAA XXX	3	3	1	
AA XX	2	2	1	
AAA XX	2	3	0,67	interseks
AA X	1	2	0,5	samiec
AAA X	1	3	0,33	

Uwagi: X oznacza jeden chromosom X, A — haploidalny zespół autosomów.

W jaki sposób komórki mierzą stosunek X/A, tego jeszcze dokładnie nie wiadomo; w każdym razie odbywa się to nie na poziomie całego organizmu, lecz autonomicznie komórkowo. Panuje pogląd, że w chromosomie X znajduje się wiele czynników (numeratorów), które zwiększają ten stosunek, a po przekroczeniu wartości progowej powodują feminizację. Przekonują o tym badania duplikacji odcinków chromosomu X, które nie mają wprawdzie wpływu u normalnego samca (1X, 2A), ale prowadzą do istotnej feminizacji interseksa (2X, 3A). Dzięki temu wyznaczono regiony chromosomu X, w których czynniki te są zawarte, a dwa z nich udało się nawet częściowo zdefiniować na poziomie molekularnym; są to leżące w chromosomie X geny *sis-a* i *sis-b* (*sisterless*), których sekwencje wskazują, że powinny one kodować białka o charakterze czynników transkrypcyjnych, aktywujących nadrzędny gen regulatorowy *Sxl* (rys. 10.16(a)). Można przypuszczać, iż pozostałe, nie wykryte do tej pory, elementy numeratorowe również kodują czynniki transkrypcyjne, które zostają zsyntetyzowane jeszcze przed ustaleniem mechanizmu kompensacyjnego. Wyższy poziom tych czynników u zarodków XX niż u zarodków XY może wystarczyć do uaktywnienia embrionalnej transkrypcji genu *Sxl* i skierowania rozwoju na drogę płci żeńskiej. We wczesnej fazie kontroli genu *Sxl* biorą także udział inne geny, jak *da* (*daughterless*) i *snf* (*sans-fille*).

Nie wiemy natomiast, jaki charakter mają czynniki autosomowe odgrywające rolę w stosunku X/A.

10.4.2. Mechanizm kompensacyjny podwyższa aktywność chromosomu X u samców *Drosophila* do poziomu odpowiadającego dwu chromosomom X u samic

U *Drosophila* chromosom X zawiera, oprócz czynników zaangażowanych w determinację płci, około 1000 genów (20% genomu) pełniących inne ważne funkcje nie związane z płcią. Ponieważ samica XX ma tych genów dwa razy więcej niż samiec XY, przy jednakowej liczbie genów autosomowych, konieczny jest mechanizm kompensacyjny, zapobiegający skutkom tej dysproporcji. Gdy zmierzono włączanie znakowanej trytem urydyny do politenicznych chromosomów X, stwierdzono, że mechanizm ten u *Drosophila* polega na

dwukrotnie wyższym poziomie transkrypcji genów w chromosomie X u samców niż u samic. W chromosomie X występuje wiele sekwencji wzmacniających, działających w pozycji *cis* na każdy gen, jaki się znajdzie w ich sąsiedztwie, co wykazano na samcach transgenicznym, u których obce geny włączone do chromosomu X przejawiały dwukrotnie wyższą aktywność niż takie same geny włączone do autosomów. Oprócz tego w skład mechanizmu kompensacyjnego wchodzi wiele czynników działających w pozycji *trans*, stanowiących produkty genów *mle* (*maleless*) oraz *m_{sl}-1, -2, -3* (*male specific lethal*). Mutacje któregośkolwiek z tych genów (zestaw MSL, p. rys. 10.16(a)) nie mają wpływu na osobniki XX, ale są letalne dla osobników XY, z powodu zbyt niskiego poziomu transkrypcji genów w chromosomie X. Geny te nie mają wpływu na fenotyp płciowy. Nie wiadomo, w jaki sposób mechanizm kompensacyjny jest kontrolowany przez nadrzędny gen regulatorowy *Sxl* (rys. 10.16(a)). Powinna to być kontrola negatywna, gdyż gen *Sxl* jest aktywny tylko u samic, natomiast mechanizm kompensacyjny działa tylko u samców.

Kompensacja aktywności chromosomów X przebiega różnie u poszczególnych gatunków, np. u *C. elegans*, gdzie występują dwie płcie: hermafrodytyczne osobniki XX i samce XO, wydaje się, że kompensacja polega na redukcji poziomu transkryptów u osobników XX. Jeszcze inaczej jest u ssaków, u których u osobników XX jeden z dwu chromosomów X staje się skondensowany i nieaktywny (s. 313).

10.4.3. Aktywny stan nadrzędnego genu *Sxl* uruchamia kaskadę genów regulatorowych, prowadzących rozwój w kierunku żeńskim

U samic gen *Sxl* działa jako autoaktywator oraz nadrzędny regulator różnicowania się płci somatycznej i komórek rozrodczych (rys. 10.16), natomiast u samców nie ma on żadnej funkcji. Wprawdzie w okresie postembrionalnym transkrypcja genu *Sxl* zachodzi u obu płci, jednak u samców wszystkie transkrypty mają w obrębie jednego z egzonów kodon stop, z czego wynika, iż kodują one niekompletne, zatem niefunkcjonalne produkty. Natomiast u samic wskutek innego sposobu obróbki mRNA kodon stop jest usuwany, wobec czego powstaje białko funkcjonalne. Zawiera ono motyw znajdujący w wielu białkach wiążących się z RNA, toteż może brać udział w obróbce transkryptów zarówno własnego genu *Sxl* (pozytywna autoregulacja), jak i kolejnego w kaskadzie genu *tra* (*transformer*), (p. rys. 10.16(b)), powodując powstawanie funkcjonalnych produktów tych genów.

Przypuszczalnie aktywny stan genu *Sxl* zostaje zapoczątkowany w okresie embrionalnym dzięki transkrypcji ze specjalnego promotora, uruchamianego tylko u zarodków samic, przez produkty genów *sis* aktywowanych w obu chromosomach X (jeszcze przed ustaleniem mechanizmu kompensacyjnego). W ten sposób powstaje po raz pierwszy aktywne białko genu *Sxl*. W dalszym rozwoju, zarówno u samic, jak i u samców zachodzi identyczna transkrypcja

genu *Sxl*, teraz już z konstytutywnego promotora, jednakże tylko u samic transkrypty te będą podlegały prawidłowej obróbce dzięki obecności uprzednio zsyntetyzowanego aktywnego białka *Sxl*. Gen *Sxl* będzie więc u samic aktywny, nawet po zaniku wyzwalającego sygnału X/A.

Podany mechanizm pozwala wytłumaczyć stabilność opisanego systemu. Wyobraźmy sobie bowiem, co by się działo, gdyby funkcjonowanie genu *Sxl* musiało być stale regulowane przez wyzwalający sygnał X/A: np. u zarodka o chromosomach XY gen *Sxl* zostałby początkowo wprowadzony w stan niefunkcyjny, skoro jednak włączyłby się mechanizm kompensacyjny, powodując podwyższenie transkrypcji genów zawartych w chromosomie X do takiego samego poziomu jak u osobników o dwu chromosomach X, to nastąpiłby pozorny wzrost stosunku X/A, co przestawiłoby gen *Sxl* w stan funkcjonalny, zacierając różnice między płciami.

10.4.4. O płci somatycznej *Drosophila* decyduje różny sposób obróbki transkryptów genów regulatorowych

Najlepiej został poznany mechanizm decydujący o wykształceniu płci somatycznej, co dotyczy dymorfizmu płciowego pod względem budowy wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych, ponadto kształtu i barwy odwłoka (zaokrąglony i silniej pigmentowany u samców, ostro zakończony i większy u samic) oraz występowania na odnózu samców grzebyka płciowego utworzonego ze zmodyfikowanych szczecinek. Interseksy są mozaikami pod względem tych struktur, gdyż poszczególne komórki mogą być zróżnicowane „w typie” męskim lub żeńskim.

Determinacją płci somatycznej zawiadują 4 główne geny regulatorowe (rys. 10.16(a),(b)): *tra* (*transformer*), *tra-2*, *ix* (*intersex*) i *dsx* (*doublesex*), podlegające nadrzędniemu genowi *Sxl*. Geny te nie mają jednak wpływu na różnicowanie się komórek rozrodczych. Kontrola determinacji płci somatycznej polega na zróżnicowanej obróbce transkryptów. Jak wyjaśniono poprzednio, u samic obróbka transkryptu *Sxl* prowadzi do wytworzenia funkcjonalnego produktu, który powoduje powstanie również funkcjonalnego białka genu *tra*, a to z kolei decyduje o determinacji płci somatycznej w kierunku żeńskim. Przekonano się bowiem, że transgeniczne osobniki XY, którym wprowadzono sekwencje cDNA komplementarne do transkryptów *tra* typu żeńskiego, stawały się fenotypowo samicami. U normalnych samców natomiast, z powodu braku funkcjonalnego białka *Sxl*, w czasie obróbki transkryptu *tra* zostaje z niego wycięta długa otwarta ramka odczytu (ORF), powodując, że produkt ten jest niefunkcyjny.

Białka genów *tra* oraz *tra-2* również zawierają charakterystyczne sekwencje występujące w domenach wiążących się z RNA, co wskazuje na ich rolę w regulacji obróbki mRNA. Ich genem docelowym jest gen *dsx*, który również wykazuje zależne od płci różnice w strukturze mRNA, jednak w tym przypadku zarówno produkt żeński (powstały pod kontrolą białka *tra*), jak i produkt męski (bez udziału białka *tra*) są funkcjonalne i decydują o dalszym róż-

nicowaniu się cech somatycznych (rys. 10.16(b)). Ponieważ mutacje zerowe genu *dsx* powodują interseksualizm somy zarówno u osobników XX, jak i u XY, należy przypuszczać, iż gen ten ma podwójną rolę: u osobników XX powoduje różnicowanie się w kierunku żeńskim i hamuje rozwój w kierunku męskim, natomiast u osobników XY odwrotnie.

Gen *ix* (*intersex*) jest niezbędny do normalnego funkcjonowania genu *dsx* u samic, ale nie wiadomo jeszcze, w jaki sposób jest regulowany; u samców nie ma on znaczenia.

10.4.5. Na determinację płciową komórek rozrodczych wpływa aktywność genu *Sxl* oraz środowisko komórek somatycznych

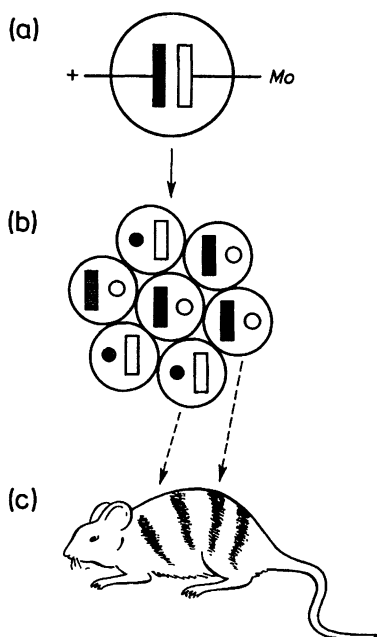
Wprawdzie poznano wiele genów koniecznych do prawidłowego różnicowania się oocytów i plemników, jednak — jak wynika z rysunku 10.16(a) — sam mechanizm determinujący płeć komórek rozrodczych nie został jeszcze poznany. Wiadomo, że aktywność nadrzędnego genu *Sxl* nie jest potrzebna do uruchomienia spermatogenezy, natomiast jest konieczna dla oogenezy, jakkolwiek nie znamy genu docelowego. Geny regulatorowe determinujące płeć somatyczną nie mają bezpośredniego wpływu na determinację rozwojową komórek rozrodczych, które muszą być regulowane przez odrębny mechanizm. Jednakże nie są one całkowicie niezależne od somy, gdyż wykazano, że komórki rozrodcze XX po przeszczepieniu do męskiego środowiska somatycznego mogą wejść na drogę spermatogenezy. Co prawda, nie doprowadzi to jednak do wytworzenia normalnych plemników, gdyż proces ten wymaga m.in. aktywności genów zlokalizowanych w chromosomie Y. Wpływ komórek somy na los komórek rozrodczych stwierdzono także u ssaków (p. s. 316).

10.5. Determinacja płci u ssaków

U ssaków, podobnie jak u *Drosophila*, osobniki XX są samicami a XY — samcami, jednak zarówno mechanizm kompensacyjny, jak i mechanizm determinacji płci są odmienne, gdyż pierwszy z nich jest determinowany liczbą chromosomów X, a drugi — obecnością chromosomu Y. Ponadto, w przeciwieństwie do muszki owocowej, u której procesy te są regulowane w znacznym stopniu autonomicznie przez poszczególne komórki, u ssaków, wskutek integrującej roli układu hormonalnego, determinacja płci somatycznej całego osobnika jest uzależniona od kierunku różnicowania się jego gonad.

10.5.1. Mechanizm kompensacyjny u samic ssaków polega na inaktywacji jednego z dwu chromosomów X

U samic ssaków we wczesnym okresie zarodkowym we wszystkich komórkach blastocysty następuje kondensacja i w konsekwencji — inaktywacja jednego z dwu chromosomów X, który w jądrze interfazowym jest widoczny



Rys. 10.17. Inaktywacja chromosomu X u samicy myszy heterozygotycznej pod względem allelu *Mo* (*Mottled*) powodującego rozjaśnienie sierści. (a) Zapłodniona komórka jajowa z dwoma chromosomami X (czarny z allelem +, jasny z allelem *Mo*). (b) Fragment wczesnego zarodka — w poszczególnych komórkach jeden z dwóch chromosomów X ulega inaktywacji (przedstawiony jako kulisty). (c) Klony komórek powstałe w wyniku podziałów mają ten sam chromosom nieaktywny co komórka wyjściowa, toteż sierść dorosłej myszy składa się z plam ciemnych (czynny allel +) i jasnych (czynny allel *Mo*)

jako grudka chromatyny, tzw. ciało Barra (zwane też ciałkiem X lub chromatyną płciową). Ponieważ proces ten zachodzi w sposób losowy, w jednych komórkach inaktywacji ulega jeden, w innych drugi z chromosomów X (rys. 10.17). Stan ten przenosi się na komórki potomne, toteż organizm heterozygotycznej samicy składa się z dwu klonów komórkowych, w których czynne są allele jednego lub drugiego chromosomu. Inaktywacja obejmuje niemal cały chromosom X, powodując, że ekspresja genów sprzężonych z tym chromosomem u samca i samicy jest jednakowa, mimo różnej liczby tych chromosomów. U osobników aneuploidalnych, posiadających więcej niż jeden chromosom X (XXY, XXXY), wszystkie z wyjątkiem jednego ulegają inaktywacji, natomiast proces ten nie zachodzi u osobników XO. Mechanizm inaktywacji nie jest jeszcze w pełni poznany, wiadomo jednak, iż towarzyszy mu metylacja DNA chromosomu.

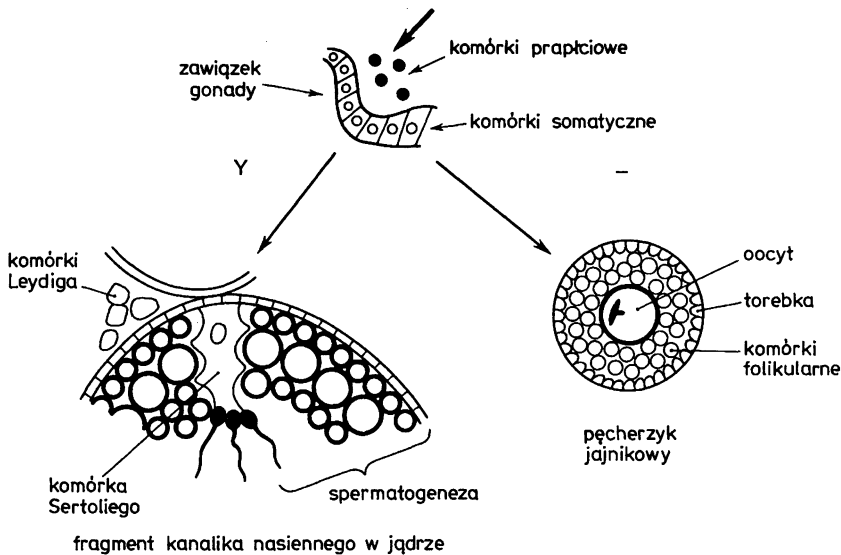
Mechanizm kompensacyjny nie dotyczy jednak komórek rozrodczych, bowiem w oocytach w trakcie profazy mejotycznej następuje reaktywacja nieczynnego poprzednio-chromosomu X. Co więcej, wydaje się, że aktywność obu chromosomów X jest niezbędna do normalnego przebiegu oogenezy. Brak jednego chromosomu X u kobiet z zespołem Turnera (XO) powoduje bezpłodność, natomiast u myszy XO — znaczne skrócenie okresu rozrodczego wskutek zamierania oocytów. Natomiast u osobników płci męskiej obecność drugiego chromosomu X uniemożliwia normalny przebieg spermatogenezy, powodując zamieranie spermatogoniów wkrótce po urodzeniu. Dlatego mężczyźni z zespołem Klinefeltera (XXY) są nieplodni.

10.5.2. Płeć męską ssaków determinuje obecność chromosomu Y w komórkach somatycznych gonady

W roku 1959 wykazano, że w przeciwieństwie do muszki owocowej, u człowieka osobnicy XXY są płci męskiej, natomiast XO — płci żeńskiej. Ponieważ to samo stwierdzono także u myszy i innych gatunków ssaków, stało się oczywiste, że w chromosomie Y musi się mieścić jakiś czynnik, który odgrywa kluczową rolę w determinacji płci męskiej u ssaków. Czynnik ten został u człowieka nazwany *TDF* (ang. testis determining factor), a u myszy — *Tdy* (testis determining gene on the Y).

O płci ssaka decyduje kierunek zróżnicowania się gonady. We wczesnym okresie zarodkowym powstaje ona z zawiązka utworzonego przez komórki somatyczne, do którego przemieszczają się komórki prąplciowe (rys. 10.18) i tylko te ostatnie dadzą początek wszystkim komórkom rozrodczym: jajom lub plemnikom. Początkowo gonada jest jednakowa u obu płci, natomiast o jej zróżnicowaniu się w gonadę męską, czyli jądro, decyduje kierunek rozwoju linii komórek somatycznych typu podporowego. Jeżeli komórki te zawierają chromosom Y, to przekształcają się w komórki Sertoliego, indukując rozwój embrionalnego zawiązka gonady w jądro: komórki prąplciowe różnicują się wtedy w spermatogonia, komórki sterydogenne zaś — w komórki Leydiga produkujące hormon płciowy męski, testosteron, odpowiedzialny za zapoczątkowanie wielu dalszych procesów związanych z wykształceniem cech męskich osobnika.

Natomiast w przypadku braku chromosomu Y gonada różnicuje się jako jajnik, co prowadzi do wykształcenia płci żeńskiej, która u ssaków jest płcią



Rys. 10.18. Schemat różnicowania się gonady ssaków z jednakowego zawiązka u obu płci. Komórki linii płciowej (rozrodcze) zaznaczone grubą kreską. Warunkiem zróżnicowania gonady w jądro jest obecność chromosomu Y w komórkach somatycznych embrionalnego zawiązka

podstawową. W tym przypadku komórki prąpciove stają się oocytami, które już w okresie zarodkowym wchodzą w profazę mejotyczną, a otaczające je komórki podporowe przekształcają się w komórki pęcherzykowe (folikularne); komórki sterydogenne zaś biorą udział w tworzeniu torebki pęcherzyków jajnikowych i produkują hormony płciowe żeńskie.

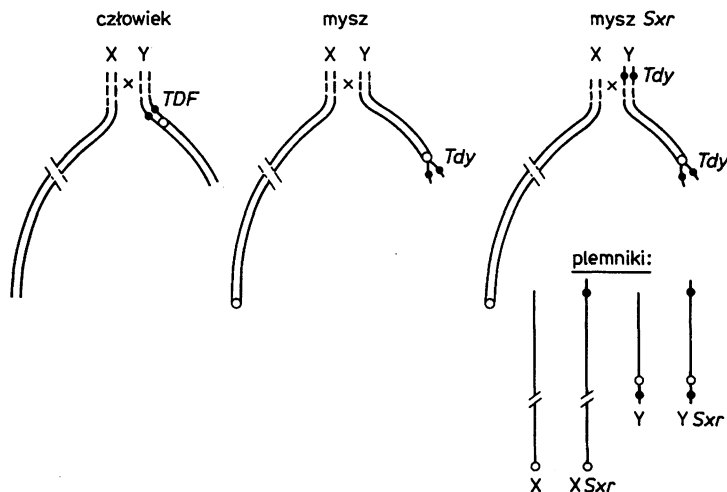
Skład chromosomowy samych komórek prąpciowych nie ma wpływu na determinację płci, o czym można się było przekonać badając rozwój chimer, powstałych ze złączenia zarodków XX i XY o odpowiednich genotypach markerowych. Płeć takiej chimery zależy od proporcji komórek podporowych XX i XY, które znalazły się w zawiązku gonady. Tylko przy bardzo znacznej przewadze komponentu XX utworzy się jajnik, a wtedy zarówno komórki prąpciove XX, jak i XY wejdą w profazę mejotyczną jeszcze w okresie zarodkowym, stając się oocytami. Z komórek XY mogą czasem u myszy powstać zdolne do zapłodnienia komórki jajowe, chociaż brak drugiego chromosomu X powoduje zwykle wczesną degenerację takich oocytów (podobnie jak u samic XO).

Jeżeli natomiast zarodkowa gonada chimery XX/XY różnicuje się w jądro, to komórki prąpciove zarówno XY, jak i XX przekształcają się w prespermatogonia, jednakże te ostatnie obumierają w jądrze jeszcze przed urodzeniem osobnika, gdyż obecność dwu chromosomów X jest dla nich letalna. Tylko komórki XY podlegają spermatogenezie, zwłaszcza że do normalnego przebiegu tego procesu niezbędny jest inny jeszcze gen w chromosomie Y (różny od genu *TDF* lub *Tdy*).

10.5.3. Jak poszukiwano genu determinującego płęć męską ssaków

Poszukiwania genu determinującego płęć męską ssaków przypominają rozwiązywanie fascynującej zagadki kryminalnej: kolejno stawiane hipotezy musiały być odrzucane w świetle nowo odkrywanych faktów, aż wreszcie rok 1990 przyniósł, jak się wydaje, rozstrzygnięcie tego problemu, do czego przyczyniły się przede wszystkim badania dotyczące człowieka i myszy laboratoryjnej.

Punktem wyjścia w tych poszukiwaniach były nienormalności chromosomowe, powodujące wykształcenie płci żeńskiej u osobników z niekompletnym chromosomem Y lub płci męskiej mimo braku tego chromosomu na preparatach cytologicznych. Nienormalności te, jak się później okazało, powstają najczęściej wskutek nietypowego przebiegu crossing-over między chromosomami X i Y podczas profazy mejotycznej w procesie spermatogenezy. Chromosomy X i Y koniugują ze sobą terminalnie, tzn. na bardzo niewielkim końcowym odcinku (rys. 10.19), w którym są homologiczne. Odcinek ten określanym bywa jako region pseudoautosomowy, gdyż zlokalizowane w nim sekwencje DNA mają swoje odpowiedniki zarówno w chromosomie X, jak i w Y, toteż dziedziczą się podobnie jak geny autosomowe, a nie jak geny sprzężone z płcią.



Rys. 10.19. Schemat koniugacji chromosomów X–Y u człowieka, myszy normalnej i myszy *Sxr*. Wyrysowano obie chromatydy każdego chromosomu; region pseudoautosomowy, w którym zachodzi crossing-over (x) zaznaczono linią przerywaną, puste kółko oznacza centromer, ciemne kółka — geny *TDF/Tdy*. U myszy *Sxr* chromosom Y ma drugą kopię genu *Tdy* na dystalnym końcu długiego ramienia. W wyniku crossing-over kopia ta (czyli fragment *Sxr*) zostaje przeniesiona z jednej chromatydy Y na jedną chromatydę X (częściowo wg McLaren, *Trends Genet.*, 4, 1988, 153–157)

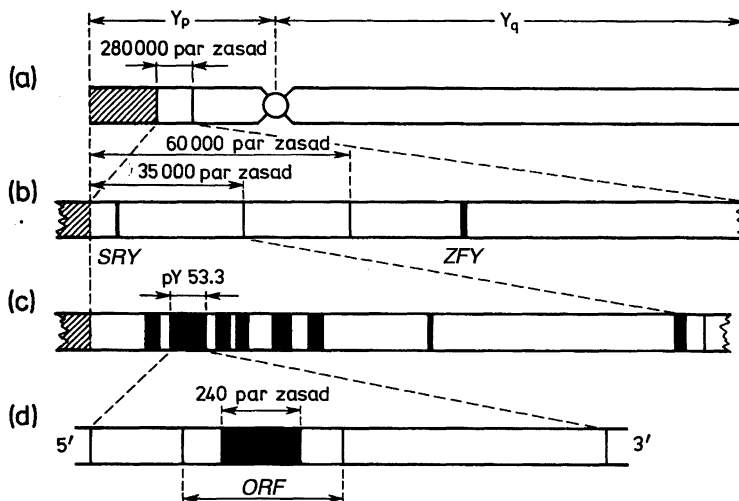
U człowieka gen *TDF* mieści się w krótkim ramieniu chromosomu Y, w pobliżu regionu pseudoautosomowego, o czym przekonano się analizując płę osobników z delecjami tego chromosomu. Jest to lokalizacja bardzo niefortunna, gdyż przy zdarzającym się czasem „głębokim” crossing-over, wykraczającym poza region homologii, gen ten może zostać przeniesiony na chromosom X. Jeżeli plemnik z takim chromosomem zapłodni jajo z normalnym chromosomem X, to powstanie osobnik o kariotypie XX, ale mający gen *TDF* i wobec tego będzie płci męskiej (oczywiście nieplodny ze względu na obecność dwu chromosomów X). Natomiast po zapłodnieniu jaja plemnikiem z chromosomem Y pozbawionym czynnika TDF, powstanie osobnik o kariotypie XY, ale płci żeńskiej (również nieplodny ze względu na brak drugiego chromosomu X).

Inaczej jest u myszy laboratoryjnej, u której region pseudoautosomowy mieści się na innym końcu chromosomu Y niż determinujący płę gen *Tdy* (rys. 10.19), toteż w normalnych warunkach nawet głęboki crossing-over nie powoduje zaburzeń w determinacji płci. W roku 1971 odkryto jednak samca, który był nosicielem nieokreślonego początkowo czynnika „zmiany płci”, nazwanego *Sxr* (ang. sex-reversion), gdyż spośród potomstwa XX połowę stanowiły samce. Ponieważ czynnik *Sxr* dziedziczy się jak dominujący gen autosomowy, podejrzewano, że może to być fragment chromosomu Y przeniesiony do któregoś z autosomów, jednak poszukiwania tego fragmentu nie dawały wyników.

Dopiero w roku 1982 po zastosowaniu sond DNA o sekwencjach sąsiadujących z odcinkiem determinującym płęć, ustalono metodą hybrydyzacji *in situ* na preparatach chromosomowych, iż samiec $XYSxr$ ma w chromosomie Y dwa fragmenty zawierające locus *Tdy*: jeden o normalnej lokalizacji, drugi fragment zaś (czyli czynnik *Sxr*), powstały prawdopodobnie w wyniku zaszłej poprzednio duplikacji, umieszczony jest na końcu regionu pseudoautosomowego. W czasie koniugacji czynnik *Sxr* jednej z chromatyd chromosomu Y jest regularnie przenoszony w wyniku crossing-over na chromatydę chromosomu X, toteż samiec taki produkuje plemniki: Y, $YSxr$, X i $XSxr$ (rys. 10.19), a w potomstwie powstają odpowiednio: normalne samce XY, samce $XYSxr$ — nosiciele czynnika *Sxr*, normalne samice XX oraz nieplodne samce $XXSxr$. Wyjaśnienie, iż czynnik *Sxr* jest niewielkim fragmentem chromosomu Y wystarczającym do determinacji płci męskiej, stało się bardzo pomocne w dalszych badaniach nad identyfikacją genu *Tdy*.

W owym czasie (od 1975 r.) panowała powszechnie bardzo atrakcyjna, jak się początkowo wydawało, hipoteza, iż gen *TDF/Tdy* (tak się go często określa ze względu na odmienne nazewnictwo u człowieka i u myszy) jest równoznaczny z genem kodującym antygen zgodności tkankowej H-Y, który powoduje odrzucanie przeszczepu tkanek samca przez samicę, nawet w obrębie jednego szczepu wsobnego, a więc przy całkowitej zgodności wszystkich innych genów. Fakt, że myszy $XXSxr$ były dodatnie pod względem antygeny H-Y zdawał się tę hipotezę popierać. O jej definitywnym odrzuceniu zdecydowało dopiero w roku 1984 zidentyfikowanie zmutowanego czynnika, nazwanego Sxr^b , którego obecność powodowała, że osobniki $XXSxr^b$ były wprawdzie samcami, ale nie produkowały antygeny H-Y. Stało się więc oczywiste, że gen kodujący H-Y jest innym genem niż *Tdy*, jakkolwiek są one blisko sprzężone, gdyż oba mieszczą się w obrębie nie zmutowanego fragmentu *Sxr* (nazywanego obecnie Sxr^a).

Następny etap w poszukiwaniach genu determinującego płęć męską pochodzi z badań nad człowiekiem. Jeżeli zanalizuje się nienormalności spowodowane „głębokim” crossing-over, a także różnymi delecjami lub translokacjami, to można określić minimalny region chromosomu Y, który musi być obecny u mężczyzny o kariotypie XX, ale którego nie może mieć osobnik płci żeńskiej o kariotypie XY. W tym czasie dysponowano już wieloma sondami DNA specyficznymi dla chromosomu Y, była też znana lokalizacja odpowiadających im regionów na mapie restrykcyjnej tego chromosomu. Przez stosowanie 135 sond DNA wyznaczających różne regiony chromosomu Y oraz metody kroczenia wzdłuż chromosomu (chromosome walking) określono, iż gen *TDF* musi się u człowieka mieścić w krótkim ramieniu chromosomu Y, w obrębie sekwencji DNA o długości 280 000 nukleotydów, przyległej do regionu pseudoautosomowego (rys. 10.20(a)). Kiedy w roku 1987 został tam zidentyfikowany gen kodujący białko o charakterze czynnika transkrypcyjnego (o 13 „palcach cynkowych” typu Cys—Cys/His—His), nazwany *ZFY* (ang. zinc finger of the Y chromosome), wydawało się, że jest to już poszukiwany gen *TDF*.



Rys. 10.20. Lokalizacja genu determinującego płeć u człowieka. (a) Schemat chromosomu Y, Y_p — ramię krótkie, Y_q — ramię długie, kreskowany region pseudoautosomowy. (b) Mapa fragmentu 280 000 par zasad z genami *ZFY* i *SRY* (c) Mapa odcinka 35 000 par zasad (kolorem czarnym zaznaczono sondy użyte do badań; w obrębie sondy pY 53.3 mieści się gen *SRY*). (d) Diagram sondy pY 53.3, w której występuje otwarta ramka odczytu (*ORF*), a w jej obrębie czarno zamalowany fragment kodujący 80-aminokwasową domenę, mającą zdolność łączenia się z DNA ((a) i (b) wg McLaren, 1988 — zmodyf.; (c) i (d) wg Sinclair i wsp., 1990 — zmodyf.)

Gen *ZFY* został znaleziony w chromosomie Y u wszystkich badanych ssaków (ma on jednak także niemal identyczne odpowiedniki w chromosomie X). U myszy, u której gen ten jest podwojony (*Zfy-1* i *Zfy-2*), stwierdzono jego występowanie zarówno u samców $XXSxr^a$, jak i u $XXSxr^b$, co popierało hipotezę, że może on być odpowiedzialny za determinację płci męskiej. Trafność tej hipotezy stała się jednak wątpliwa, gdy wykazano obecność genu *Zfy* u samicy myszy XY o zmutowanym chromosomie Y z niefunkcyjnym czynnikiem determinacji płci męskiej. Są podstawy do przypuszczeń, że jeden z genów *Zfy* może odgrywać rolę w procesie spermatogenezy, ponieważ wykazano jego ekspresję w komórkach rozrodczych jądra.

W roku 1989 hipoteza o roli *ZFY*, jako genu determinującego płeć u człowieka, również została obalona, gdyż wykazano brak tego genu u trzech mężczyzn o kariotypie XX. Zidentyfikowano u nich natomiast w chromosomie X fragment o długości 60 000 nukleotydów, pochodzący z odcinka chromosomu Y bezpośrednio przyległego do regionu pseudoautosomowego (rys. 10.20(b)). Tam więc należało poszukiwać właściwego genu *TDF*. W rok później, po znalezieniu następnych markerów DNA, region poszukiwań został zawężony do 35 000 nukleotydów (rys. 10.20(c)). I wreszcie w odcinku tym, oprócz wielu powtarzalnych sekwencji DNA, bardzo blisko regionu pseudoautosomowego znaleziono sekwencję, która jak to do tej pory spełnia wszystkie, warunki aby uznać ją za poszukiwany gen *TDF/Tdy*. Jest to sekwencja

nazwana u człowieka *SRY* (ang. sex-determining region of the Y chromosome), obejmująca otwartą ramkę odczytu, która koduje białko zawierające bardzo konserwatywną domenę złożoną z 80 aminokwasów. Domena ta jest homologiczna do domeny białka Mc, biorącego udział w wyznaczaniu typu koniugacyjnego u drożdży *Schizosaccharomyces pombe* i mającej zdolność wiązania się ze specyficzną sekwencją DNA. Na tej podstawie można sądzić, iż gen *SRY* jest genem regulatorowym, którego produkt kontroluje aktywność innych genów biorących udział w determinacji płci. Opisano już przypadek kobiety o kariotypie XY, u której właśnie w obrębie genu *SRY* zidentyfikowano delecję 4 zasad, co prawdopodobnie stało się przyczyną utraty funkcji genu wskutek zmiany fazy odczytu (u ojca tej kobiety gen *SRY* był nie zmutowany).

Gen *SRY* jest konserwatywny ewolucyjnie, występuje w chromosomie Y u wszystkich zbadanych do tej pory ssaków. U myszy, gdzie ma on symbol *Sry*, wykazano jego obecność zarówno u normalnych samców XY, jak i u samców $XXSxr^a$ oraz $XXSxr^b$, natomiast brak go było nie tylko u normalnych samic XX, ale także u wspomnianej poprzednio samicy ze zmutowanym chromosomem Y. Co więcej, analizując za pomocą hybrydyzacji *in situ* komplementarne do sekwencji *Sry* cząsteczki mRNA, wykazano, iż ekspresja tego genu następuje w komórkach somatycznych zawiązka gonady w 11,5 dniu życia płodowego myszy, czyli w okresie bezpośrednio poprzedzającym różnicowanie się płciowe gonady. A więc zarówno czas, jak i miejsce ekspresji wskazuje na rolę *Sry* w determinacji płci męskiej.

Wreszcie rok 1991 przyniósł bezpośrednie potwierdzenie tożsamości determinującego płęć genu *Tdy* i genu *Sry*: po wprowadzeniu genu *Sry* do przedjądrza zapłodnionych jaj myszy, uzyskano wiele zwierząt transgeniczných, a wśród nich trzy samce o kariotypie XX. Wprawdzie nie wszystkie osobniki XX mające kopie *Sry* były samcami, ale fakt uzyskania osobników pozytywnych wydaje się dowodem wystarczającym, aby uznać ten gen za determinujący płęć męską.

10.5.4. Na determinację płci ssaków wpływają także geny położone w innych chromosomach

Identyfikacja genu *TDF/Tdy* to dopiero początek badań nad determinacją płci ssaków. Wiadomo bowiem, że gen ten musi współdziałać z wieloma innymi, tworząc prawdopodobnie „kaskadę regulatorową”, jak u muszki owocowej. Wskazują na to przypadki, w których mimo obecności normalnego chromosomu Y, płęć męska nie zostaje wykształcona. Do tej pory poznano zaledwie kilka z tych genów, które mogą być zlokalizowane zarówno w chromosomie X, jak i w autosomach.

U lemingów (*Myopus schisticolor*) występują dwa rodzaje chromosomów X: normalny oraz krótszy (prawdopodobnie z delecją wskutek strukturalnej zmiany krótkiego ramienia) oznaczony X*. Samcami są tylko osobniki XY, natomiast zarówno XX, XX*, jak i X*Y — są samicami. Wynika z tego, że

w normalnym chromosomie X musi występować gen, który jest niezbędny do wykształcenia płci samca.

Natomiast u myszy wykryto geny autosomowe, których obecność jest konieczna do zróżnicowania się gonady męskiej. Okazało się bowiem, iż po skrzyżowaniu myszy mających chromosom Y z podgatunku *Mus musculus domesticus* (Y^{do}) z myszami szczepu laboratoryjnego C57BL/6J (genotyp *M. m. musculus*) rodzą się osobniki XY, będące samicami lub hermafrodytami, które mają jajnik oraz ootestis (narząd składający się zarówno z tkanek typowych dla jądra, jak i tkanek jajnikowych). Analiza różnych krzyżówek wykazała, że w jednym z autosomów znajduje się locus *Tda-1* (testis determination autosomal-1), którego allel występujący w szczepie C57BL/6J nie współpracuje prawidłowo z chromosomem Y^{do} . W innych krzyżówkach zidentyfikowano jeszcze dwa inne loci w podobny sposób wpływające na determinację płci.

Oprócz tych genów zaangażowanych bezpośrednio w determinację płci, również geny jeszcze „niższego rzędu”, kierujące różnicowaniem się narządów rozrodczych i drugo- oraz trzeciorzędowych cech płciowych, mogą powodować „odwrócenie płci”. Zasadniczą rolę odgrywa w tym układ hormonalny, którego funkcjonowanie może być upośledzone genetycznie. Na przykład zarówno u ludzi, jak i u myszy, osobniki XY, będące nosicielami sprzężonej z chromosomem X mutacji *Tfm* (ang. testicular feminization), tzw. zespołu feminizujących jąder, mają fenotyp żeński, mimo posiadania jąder. Mutacja ta powoduje bowiem produkcję defektywnego receptora dla testosteronu, wskutek czego — mimo iż hormon ten jest syntetyzowany w normalnych ilościach — męskie cechy płciowe zależne od testosteronu nie mogą się rozwinąć. Wykształcenie prawidłowej płci wymaga więc precyzyjnie regulowanej aktywności wielu genów, z których zaledwie kilka udało się zidentyfikować. Mutacja któregokolwiek z nich może prowadzić do zaburzeń determinacji płci.

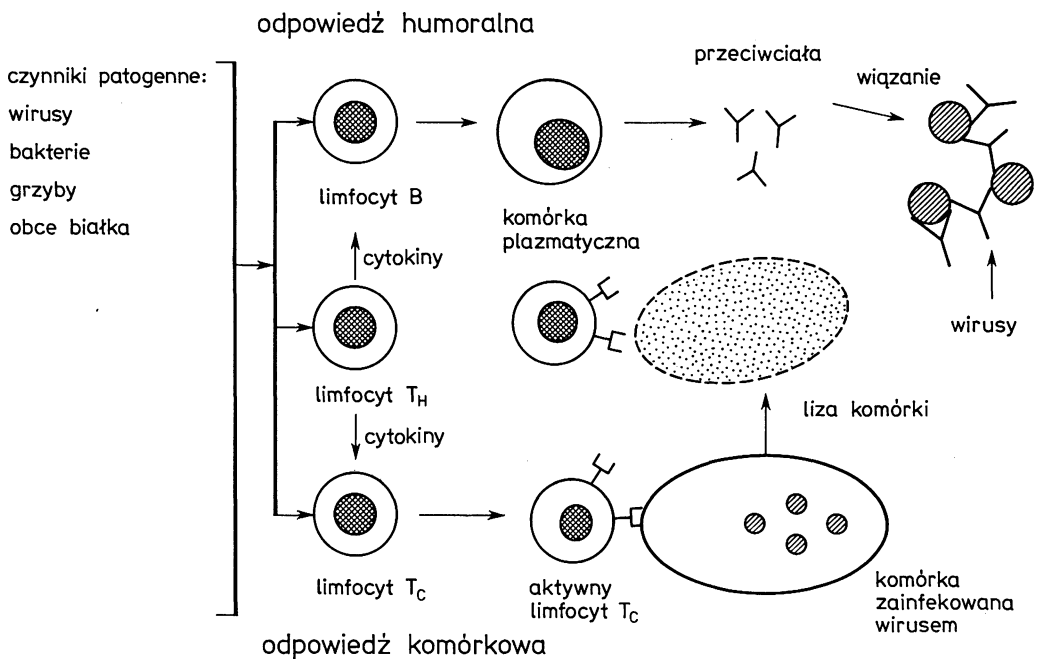
11. MOLEKULARNE PODSTAWY PROCESÓW ODPORNOŚCIOWYCH

Układ immunologiczny kręgowców jest skomplikowanym zespołem środków, które służą organizmowi do obrony przed atakującymi go nieustannie mikroorganizmami: bakteriami, grzybami i wirusami. System ten funkcjonuje dzięki procesowi zapamiętywania i uczenia się: w przypadku pierwszego napotkania patogennego mikroorganizmu, często następują objawy chorobowe, a układ immunologiczny zwalcza infekcję; w przypadku ponownego napotkania tego samego patogenu albo objawy choroby nie pojawiają się wcale, albo są znacznie słabsze — układ immunologiczny neutralizuje organizm patogenny bardzo szybko. Szybkie zwalczenie patogenu następuje dzięki temu, że system immunologiczny zapamiętał dany mikroorganizm jako czynnik obcy i przy ponownej infekcji rozpozna go i zniszczy znacznie szybciej. System immunologiczny ma wysoką zdolność rozpoznawania obcych czynników inwazyjnych, a także odróżniania ich od normalnych elementów własnego organizmu. Pierwszym etapem zwalczania obcego elementu jest jego rozpoznanie — następnym etapem jest jego zniszczenie. Etap pierwszy jest specyficzny, skierowany wobec określonego, indywidualnego celu, natomiast etap drugi odpowiedzi immunologicznej jest niespecyficzny, wspólny dla różnych elementów inwazyjnych. Funkcje układu immunologicznego związane z niespecyficzną fazą odpowiedzi określane są jako funkcje efektorowe. Niniejszy rozdział zawiera odpowiedź na kilka pytań, zasadniczych dla zrozumienia funkcjonowania układu immunologicznego. Jak układ w sposób specyficzny rozpoznaje obce, tak bardzo zróżnicowane czynniki patogenne? Jak odróżnia własne elementy, których nie uszkadza, od elementów obcych, które niszczy? Jaki jest mechanizm uczenia się, pozwalający na sprawną eliminację już raz zwalczanego patogenu? Najdokładniej zostaną omówione sprawy, które zostały najlepiej poznane na poziomie molekularnym: zdolność do rozpoznawania elementów obcych, która wiąże się z wytwarzaniem ogromnie zróżnicowanych przeciwciał dzięki unikatowym procesom przegrupowań (rekombinacji) DNA. Zostaną

omówione mechanizmy prowadzące do wytwarzania różnych klas przeciwciał. Opisana zostanie rola limfocytów T, mechanizmy prowadzące do syntezy ich specyficznych receptorów powierzchniowych, po czym zostanie rozpatrzona interakcja limfocytów T oraz limfocytów B w procesie produkcji przeciwciał. Przedstawiony zostanie model tłumaczący zjawisko autotolerancji limfocytów T. Opisana będzie rola białek głównego kompleksu zgodności tkankowej (czyli MHC) w specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Omówiony będzie mechanizm wywoływania syndromu AIDS przez wirus HIV.

11.1. Antygeny wywołują odpowiedź immunologiczną humoralną i komórkową

Wtargnięcie obcych substancji lub organizmów do ustroju wywołuje u kręgowców złożony system reakcji obronnych, określanych jako odpowiedź immunologiczna. Odpowiedź immunologiczną można podzielić na dwa zasadnicze typy: odpowiedź humoralną oraz odpowiedź komórkową. Odpowiedź humoralna zależy od obecności substancji rozpuszczonych we krwi, określanych mianem immunoglobulin lub przeciwciał. Immunoglobuliny (Ig) są złożoną grupą białek, stanowiącą ok. 20% białek krwi. W komórkowej odpowiedzi immunologicznej specyficzne rozpoznanie odbywa się dzięki wyspecjalizowanym komórkom (limfocytom), mającym na swojej powierzchni białka silnie związane z błoną, zdolne do podobnej reakcji jak przeciwciała rozpuszczone we krwi. Wspomniane typy odpowiedzi immunologicznej są uwarunkowane działaniem różnych klas limfocytów: limfocyty B, odpowiednio stymulowane, produkują przeciwciała; limfocyty T odpowiedzialne są za komórkową odpowiedź immunologiczną. Odpowiedź humoralna jest podstawowym mechanizmem obronnym przeciwko zewnątrzkomórkowym mikroorganizmom i toksynom, ponieważ przeciwciała mogą się z nimi związać i przyczynić do ich destrukcji. Natomiast wewnątrzkomórkowe mikroorganizmy (wirusy i niektóre bakterie), nieosiągalne dla krążących we krwi przeciwciał, są zwalczane w procesie komórkowej odpowiedzi immunologicznej, prowadzącej do zniszczenia zainfekowanej komórki. W obu typach odpowiedzi bardzo istotną rolę odgrywają cytokiny (często określane jako limfokiny, ponieważ wydzielane są głównie przez limfocyty) — substancje białkowe stymulujące odporność zarówno humoralną, jak i komórkową. Stymulują one także wytwarzanie komórek fagocytarnych (m. in. makrofagów), wchłaniających i degradujących zarówno patogeny, jak i resztki komórek własnych. Wtargnięcie do organizmu niemal każdej obcej makrocząsteczki wywołuje wytwarzanie zarówno przeciwciał, jak i komórek odpornościowych, specyficznie wiążących tę substancję. Substancja, która wywołuje wytwarzanie specyficznych przeciwciał i komórek odpornościowych lub wiąże się z przeciwciałem czy komórką odpornościową, określana jest mianem antygeny (rys. 11.1).

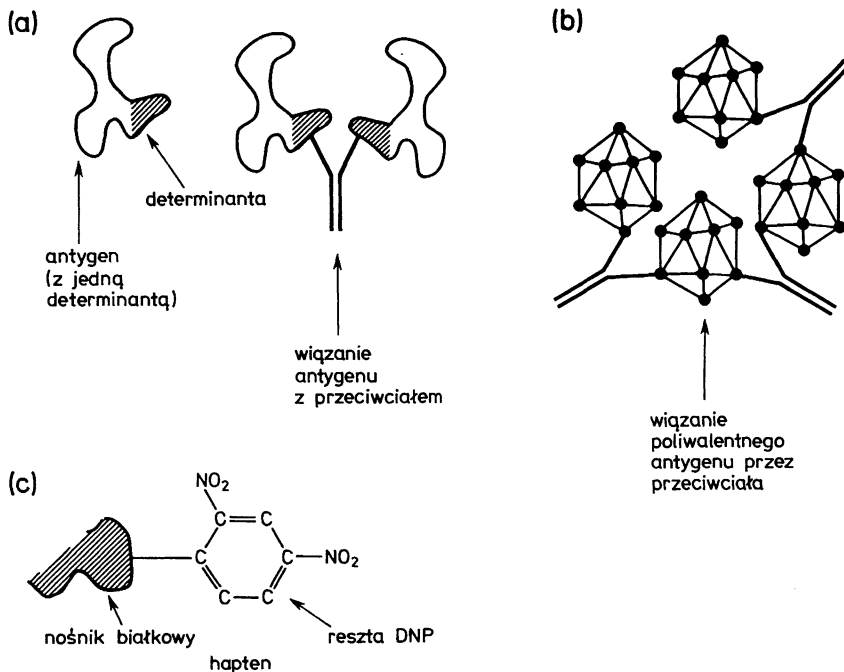


Rys. 11.1. Odpowiedź immunologiczna humoralna i komórkowa. W efekcie oddziaływania patogenu z komórkami B dochodzi do ich proliferacji i różnicowania — przekształcają się one w komórki plazmatyczne, wydzielające przeciwciała, które wiążą się z patogenem. Jest to odpowiedź humoralna. Oddziaływanie patogenu z komórkami T prowadzi do ich aktywacji. Limfocyty T cytotoksyczne (T_C), które wiążą się z komórką organizmu zaatakowaną przez patogen, powodują lizę tej komórki. Limfocyty T-pomocnicze (T_H) wydzielają cytokiny stymulujące zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)

11.2. Przeciwciała wiążą się z determinantami antygenowymi

Przeciwciała wiążą się z określonymi miejscami antygeny, z tzw. determinantami. Częsteczka przeciwciała może związać na ogół dwie determinanty. Jeśli antygen jest poliwalentny, tzn. ma wiele determinant (np. cząsteczka wirusa), przeciwciała mogą tworzyć z antygenem agregaty (rys. 11.2).

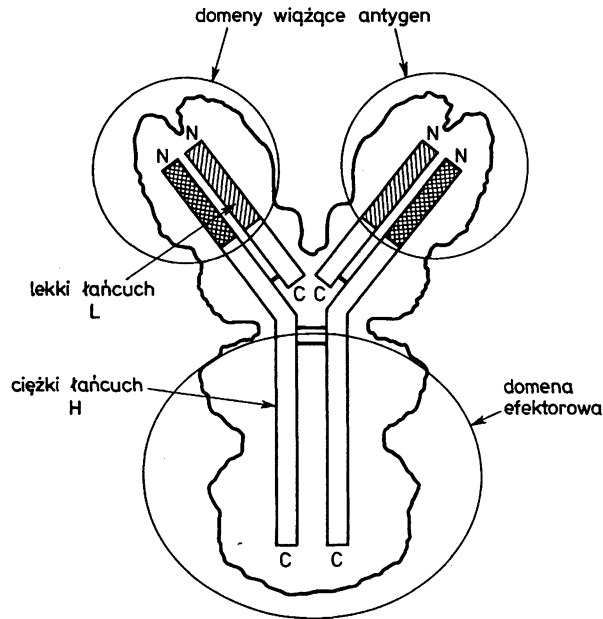
Przez związanie niewielkiej cząsteczki na powierzchni białka można stworzyć nową determinantę antygenową. Taką małą cząsteczką, bardzo często stosowaną w immunologii, jest dinitrofenol (DNP). DNP sprzężony z albuminą surowicy bydłowej, wstrzyknięty myszy, spowoduje wytworzenie przeciwciał reagujących specyficznie z resztą dinitrofenolową. Przeciwciała te będą reagowały też z innym białkiem niosącym resztę dinitrofenolową (rys. 11.2(c)). W tym układzie DNP lub jakaś inna mała cząsteczka, związana z białkiem, zdolna do indukcji specyficznych przeciwciał, określana jest mianem haptenu. Gdy zbada się haptenu, łatwo można zademonstrować niezwykle wysoką specyficzność przeciwciał: otóż wystarczy zmienić w niewielkim stopniu haptenu, aby drastycznie obniżyć zdolność jego wiązania przez specyficzne przeciwciała.



Rys. 11.2. Wiązanie determinant antygenowych przez przeciwciała. (a) Przeciwciało może związać dwie determinanty. (b) Wirusy są antygenami poliwalentnymi. (c) Hapten związany z cząsteczką białka. Przykładem haptenu jest dinitrofenol związany kowalencyjnie z białkiem

I tak, przeciwciała przeciw DNP słabo reagują z trinitrofenolem. Jeśli haptenem jest krótki peptyd, to wystarczy zmiana jednego aminokwasu, aby bardzo obniżyć jego zdolność do reagowania z przeciwciałem. Wysoka specyficzność przeciwciał, czyli zdolność do silnego wiązania ściśle określonych determinant, jest kluczową cechą tych białek. Cecha ta ma swoje podłoże w strukturze cząsteczek przeciwciał. Cząsteczki te zbudowane są z dwóch części: z wysoce zmiennej domeny wiążącej antygen oraz z domeny, która jest mało zmienna, tzn. identyczna u wielu przeciwciał (rys. 11.3). Ta stała domena określana jest również jako domena efektorowa, decydująca o tym, co nastąpi po związaniu antygeny z częścią zmienną przeciwciała. Domena efektorowa sygnalizuje zapoczątkowanie takich procesów, jak np. fagocytoza, zmierzająca do usunięcia antygeny z ustroju, czy cytoliza, powodująca zniszczenie inwazyjnej komórki bakteryjnej. Domena stała jest także zaangażowana w proces transportu przeciwciał — ma m. in. sygnały decydujące o tym, czy przeciwciało będzie związane z błoną komórki B, czy wydzielone do płynów ustrojowych.

Struktura przeciwciał wynika ze struktury genów je kodujących: otóż istnieje ogromna różnorodność genów kodujących części zmienne łańcuchów H i L; geny te mogą zostać połączone z którymkolwiek z niewielu genów determinujących części stałe łańcuchów.



Rys. 11.3. Schemat cząsteczki immunoglobuliny. Ig zawiera dwa łańcuchy lekkie (L) i dwa łańcuchy ciężkie (H). N-terminalne, zmienne części łańcuchów (poliniowane i zakratkowane) H i L tworzą domenę zmienną, wiążącą antygen. C-terminalne, stałe części łańcuchów H tworzą domenę efektorową (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)

11.3. Przeciwciała dzielą się na klasy pełniące różne funkcje

Pomimo wspólnego planu budowy, przeciwciała (Ig) pełnią różne funkcje efektorowe, różnią się strukturą i, w związku z tym, można je podzielić na kilka klas. Podstawowe klasy przeciwciał człowieka to: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. O cząsteczkach należących do tej samej klasy mówimy, że mają ten sam izotyp. Klasy IgA i IgG można podzielić na podklasy, określane jako: IgA1 i IgA2 oraz IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Modelem badawczym w immunologii są myszy, u których podział na główne klasy przeciwciał jest taki, jak u człowieka, lecz izotyp IgG ma podtypy: IgG1, Ig2a, Ig2b, IgG3. Łańcuchy ciężkie (H) przeciwciał należących do jednego izotypu lub podtypu mają duże rejony o identycznej sekwencji aminokwasowej, różnią się natomiast od łańcuchów ciężkich innego izotypu. Łańcuchy H określa się grecką literą alfabetu, odpowiadającą danemu izotypowi i tak: przeciwciała IgA1 mają łańcuchy H typu $\alpha 1$, IgG1 — łańcuchy $\gamma 1$ itd. (tab. 11.1). Łańcuchy lekkie (L) mogą należeć do jednego z dwu typów: kappa (κ) bądź lambda (λ), lecz nie decydują o przynależności Ig do określonej klasy.

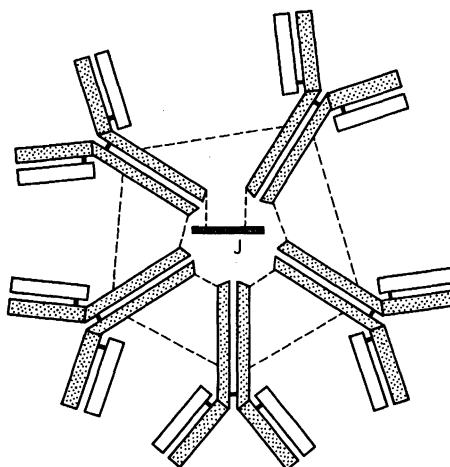
Tabela 11.1. Klasy przeciwciał ludzkich

Klasa	Podklasa	Typ łańcucha H	Stężenie w surowicy (mg/ml)	Forma* wydzielana	Masa formy wydzielanej (kDa)
IgA	IgA1	$\alpha 1$	3	1,2,3	150,300,400
	IgA2	$\alpha 2$	0,5		
IgD	brak	δ	0,03	—	180
IgE	brak	ϵ	0,0003	1	190
IgG	IgG1	$\gamma 1$	9	1	150
	IgG2	$\gamma 2$	3		
	IgG3	$\gamma 3$	1		
	IgG4	$\gamma 4$	0,5		
IgM	brak	μ	1,5	5	950

* Liczba podjednostek 4-łańcuchowych w cząsteczce wydzielanej z komórki B.

Przeciwciała typu IgM są tzw. przeciwciałami wczesnymi, syntetyzowanymi na początku odpowiedzi immunologicznej. Cząsteczki wydzielane z komórki B mają strukturę pentameryczną, tzn. zbudowane są z 5 podjednostek o klasycznej strukturze Ig, czyli zawierających 4 łańcuchy: 2L + 2H. Struktura ta jest stabilizowana mostkami dwusiarczkowymi i ponadto dodatkowym łańcuchem J (rys. 11.4).

Rys. 11.4. Schemat pentamerycznej cząsteczki IgM. IgM jest złożona z pięciu identycznych podjednostek, z których każda zbudowana jest z 4 łańcuchów. Dodatkowy łańcuch J inicjuje polimeryzację podjednostek i uczestniczy w utrzymywaniu struktury oligomeru. Linie przerywane oznaczają mostki S—S (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)



Pentamery IgM mają aż 10 miejsc wiązania antygeny — bardzo efektywnie wiążą się np. z cząstkami wirusów, które mają na swojej powierzchni wiele identycznych determinant antygenowych. IgM, po związaniu z antygenem, aktywuje system dopełniacza. System dopełniacza jest zespołem białek, które wywołują lizę komórek (np. bakteryjnych), na powierzchni których związane są przeciwciała. IgM również aktywuje makrofagi, komórki wyspecjalizowane w fagocytozie.

Przeciwciała typu IgD występują na powierzchni bardzo wielu komórek B, natomiast płyny ustrojowe zawierają zaledwie śladowe ilości tych przeciwciał. Funkcja IgD jest bardzo słabo poznana.

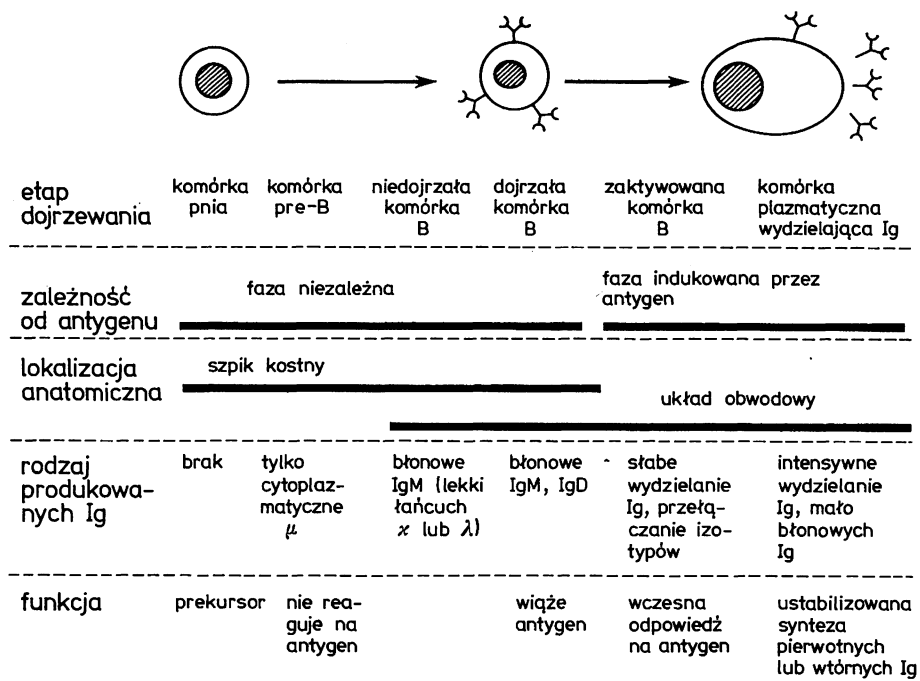
Przeciwciała typu IgG są główną klasą immunoglobulin — pod wpływem kontaktu z antygenem, zwłaszcza jeśli jest to kontakt wielokrotny, komórki B produkują znaczne ilości IgG. Przeciwciała te, podobnie jak IgM, aktywują system dopełniacza i stymulują makrofagi. IgG matki, dzięki systemowi transportującemu, przenikają przez łożysko do krwiobiegu płodu: IgG wiążą się z receptorami w błonie komórkowej łożyska po stronie matki i są przenieszone przez te receptory na stronę płodu. Noworodek, który nie ma jeszcze wykształconego własnego systemu odpornościowego, uzyskuje odporność dzięki temu, że organizm matki wydziela IgG do mleka, a jelito noworodka wchłania przeciwciała dzięki specyficznym receptorom transportującym IgG do krwiobiegu. Za wiązanie się ze specyficznymi receptorami odpowiedzialna jest część efektorowa cząsteczki Ig.

IgE są odpowiedzialne za zjawisko nadwrażliwości typu wczesnego (ang. immediate hypersensitivity), występujące po kilku minutach po zetknięciu się z antygenem. Komórki tuczne i bazofile mają w błonie receptory wiążące tak silnie efektorową część IgE, że przeciwciała te mogą być związane z powierzchnią komórek nawet wtedy, kiedy uprzednio nie związały antygeny. Pojawienie się antygeny powoduje natychmiastową agregację monomerów IgE na powierzchni komórek, co jest z kolei sygnałem do uwolnienia z tych komórek związków o charakterze zapalnym (m.in. histaminy). Konsekwencją jest pojawienie się reakcji alergicznych, jak katar sienny, astma i pokrzywka.

IgA są immunoglobulinami odgrywającymi stosunkowo małą rolę w płynach ustrojowych, natomiast pełnią zasadniczą rolę w wydzielinach śluzowych, jako pierwsza bariera przeciwko inwazji mikroorganizmów. Przeciwciała te są selektywnie transportowane poprzez komórki nabłonka do światła narządów powleczonego śluzem, np. do jelit i płuc. Transport odbywa się dzięki receptorom wiążącym IgA po stronie graniczącej z naczyniami krwionośnymi i przenoszącym je do światła narządu.

11.4. Przeciwciała są wytwarzane przez limfocyty B

Przeciwciała (Ig), są syntetyzowane wyłącznie przez limfocyty B (komórki B). Limfocyty B powstają z komórek szpiku kostnego w wieloetapowym procesie dojrzewania i różnicowania. Dojrzały limfocyt B ma na powierzchni błony przeciwciała typu IgM lub IgM i IgD. Przeciwciała te służą jako receptory antygenów — wiązanie antygeny jest sygnałem do proliferacji i różnicowania się komórki, prowadzącego do wytworzenia komórek plazmatycznych wydzielających przeciwciała na zewnątrz (rys. 11.5).



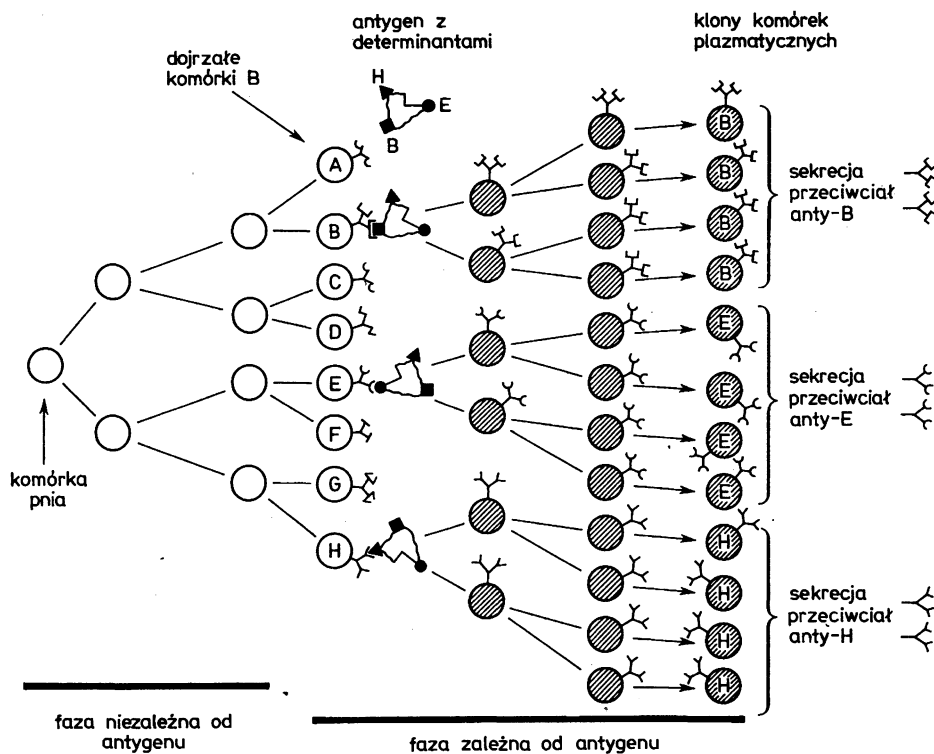
Rys. 11.5. Kolejne etapy dojrzewania i różnicowania limfocytów (komórek) B (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

11.5. Odpowiednie przeciwciała produkowane są dzięki selekcji określonych klonów limfocytów B

Organizm wytwarza Ig zdolne do związania każdego antygeny — nawet takiego, z jakim ani w filogenezie, ani w ontogenezie organizm się nie spotkał. Wytwarzane są Ig wiążące przeróżne antygeny skonstruowane przez człowieka (choćby białka sprzęgane z różnymi haptenami). Tak więc nie sposób wytłumaczyć różnorodność Ig adaptacją ewolucyjną. Liczbę rodzajów różnych przeciwciał, jakie dany organizm wytwarza, ocenia się na ponad 10^9 . Gdyby każde miało być kodowane przez indywidualny gen, a raczej dwa geny (każda cząsteczka Ig złożona jest z dwu łańcuchów), to ponad połowa genomu zdolnego do kodowania białek musiałaby być zaangażowana w tworzenie Ig. W rzeczywistości tak nie jest — limfocyty B mają niezwykle efektywny mechanizm genetyczny wytwarzania olbrzymiej liczby Ig, wykorzystując stosunkowo niewielką pulę genów. Izolacja genów Ig, analiza ich ekspresji i regulacji, równoległe z badaniem struktury przeciwciał, pozwoliły wyjaśnić mechanizm wytwarzania niezwykle zróżnicowanych Ig. Przez długie lata był to jednak problem nie rozwiązany i immunolodzy dzielili się na dwa główne

obozy: zwolenników teorii instrukcyjnej oraz selekcyjnej. Według teorii instrukcyjnej wszystkie cząsteczki Ig miały tę samą budowę, bardzo plastyczną i mogły być indukowane przez antygen do przybrania kształtu umożliwiającego zwiążanie tego antygeny. Tak więc, po pierwszym spotkaniu z antygenem, przeciwciało „umiałoby” rozpoznać następną cząsteczkę antygeny. To tłumaczyłoby różnorodność przeciwciał i zdolność układu immunologicznego do zapamiętywania oraz uczenia się. Teoria ta jest zupełnie nieprawdziwa w obliczu współczesnej wiedzy i przeszła do historii. Teoria selekcyjna zakładała, że organizm niezależnie od antygeny produkuje szerokie spektrum przeciwciał, a antygen wiąże się z tym, które „pasuje”, czyli jest w stanie rozpoznać dany antygen. Antygeny dokonują więc selekcji, wyboru w puli preegzystujących Ig. Teorię selekcyjną rozwinął Sir MacFarlane Burnet, tworząc teorię klonalnej selekcji w produkcji przeciwciał. Teoria ta zakładała, że:

(a) organizm stale wytwarza limfocyty B mające na swojej powierzchni immunoglobuliny;



Rys. 11.6. Zasada klonalnej selekcji w produkcji przeciwciał. Komórki B dojrzewają i produkują przeciwciała zakotwiczone na ich powierzchni. Związanie określonej determinanty antygenowej przez przeciwciało decyduje o selekcji, czyli wyborze danego typu komórki B. Wybrana komórka ulega amplifikacji — jej potomstwo stanowi klon komórek wydzielających Ig rozpoznającą daną determinantę (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)

(b) wszystkie Ig wytwarzane przez jedną komórkę mają identyczną zdolność wiązania antygeny;

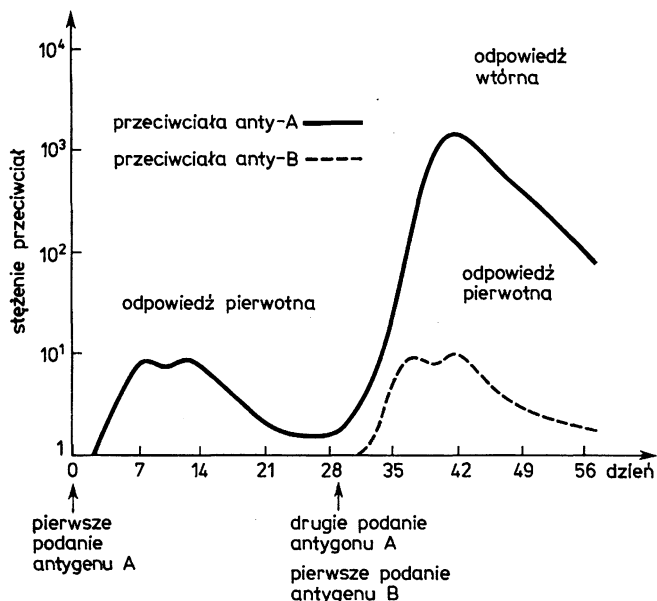
(c) tylko niewielka populacja limfocytów B wytwarza Ig rozpoznające określoną determinantę antygenową. Zgodnie z teorią, organizm ma bardzo niewielką pulę limfocytów B z Ig powierzchniowymi zdolnymi związać określony antygen. Kiedy organizm zetknie się z antygenem, tylko te komórki B, które mają na swojej powierzchni odpowiednie Ig zwiążą antygen. Ta reakcja wyzwoli proces polegający na tym, że komórka B zacznie się dzielić, produkując komórki potomne, które na dalszym etapie dojrzewania zaczną wydzielać przeciwciała o tej samej specyficzności wobec antygeny (rys. 11.6).

Potomstwo jednej komórki określa się jako klon — jest to grupa komórek B wydzielających Ig o takiej samej specyficzności antygenowej. Stąd też pochodzi nazwa selekcji klonalnej. Teoria ta została tak gruntownie zweryfikowana, że stanowi podstawę całej współczesnej immunologii.

Jak już podkreślono, proces wytwarzania klonów komórek plazmatycznych wydzielających Ig dzieli się na dwie fazy: pierwszą, niezależną od antygeny i drugą, która zaczyna się tylko wtedy, jeżeli dana komórka B zwiąże się z antygenem (rys. 11.5, 11.6). Wszystkie komórki B powstają w szpiku kostnym z komórek pnia (ang. stem cells), niezdolnych do wytwarzania Ig. W procesie dojrzewania, komórki macierzyste przekształcają się w prelimfocyty B, które wytwarzają ciężkie łańcuchy typu μ . Brak jeszcze łańcuchów lekkich, a więc i kompletnych Ig i co za tym idzie — zdolności do wiązania antygeny. Następnie dochodzi do syntezy łańcuchów lekkich (κ lub λ), które łączą się z łańcuchami ciężkimi i na powierzchni komórki pojawiają się przeciwciała typu IgM, stanowiące receptory dla antygeny. Komórki B wędrują ze szpiku do systemu krwionośnego i obwodowego limfatycznego, gdzie dalej dojrzewają. W dojrzałych komórkach B zachodzi synteza zarówno ciężkich łańcuchów μ , jak i δ , co daje w efekcie cząsteczki IgM i IgD zakotwiczone w błonie. Obie klasy Ig mają takie same rejony zmienne, czyli tę samą specyficzność wobec antygeny. Niektóre dojrzałe komórki B mają jedynie klasę IgM. Dojrzałe komórki B są gotowe do stymulacji antygenem (oraz innymi czynnikami wspomagającymi). Przy braku antygeny komórka B ginie po 3–4 dniach, natomiast jeśli zwiąże się z antygenem, stanie się zaktywowanym limfocytym B, który ulega podziałom i różnicowaniu się, produkując coraz mniej związanych z błoną Ig, a coraz więcej Ig wydzielanych na zewnątrz. W niektórych komórkach potomnych dochodzi do przełączenia syntezy danego typu łańcucha H na inny typ — czyli komórka zaczyna produkować łańcuchy inne niż μ czy δ , tzn. γ , α lub ϵ . Z tym wiąże się produkcja przeciwciał klasy IgG, IgA lub IgE — wciąż o tej samej specyficzności wobec antygeny, jaką miały IgM i IgD macierzystej komórki B. Jest to zjawisko przełączania izotypów. Komórka B intensywnie wydzielająca Ig określana jest jako komórka plazmatyczna.

11.6. System odpornościowy ma pamięć immunologiczną

Niewielka liczba komórek B zaktywowanych przez związanie antygeny nie wydziela Ig, lecz pozostaje jako komórki pamięci immunologicznej z membranowymi Ig. Komórki pamięci trwają latami (a nawet przez całe życie osobnika), krążą we krwi, limfie i gruczołach limfatycznych, nie ulegając proliferacji. Stymulacja komórek pamięci przez antygen prowadzi do gwałtownej odpowiedzi immunologicznej, tzn. do szybkiej syntezy znacznej ilości przeciwciał, głównie klasy IgG i IgA (rys. 11.7). Komórki pamięci na ogół



Rys. 11.7. Pierwotna i wtórna odpowiedź immunologiczna. W czasie 0 mysz zaszczepiono antygenem A, po czym mierzono stężenie specyficznych przeciwciał anti-A we krwi. Po 4 tygodniach, kiedy obniżyła się ilość anti-A, będących efektem pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, zwierzę zaszczepiono mieszaniną antygenu A i nowego antygenu — B. Wtórna odpowiedź immunologiczna na antygen A była szybsza i silniejsza od pierwotnej. Antygen B wywołał reakcję typową dla odpowiedzi pierwotnej. Świadczy to, że wtórna odpowiedź immunologiczna jest zjawiskiem specyficznym wobec antygenu (a nie generalnym zjawiskiem). W pierwotnej odpowiedzi dominują IgM, natomiast we wtórnej — IgG i IgA (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnel, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.).

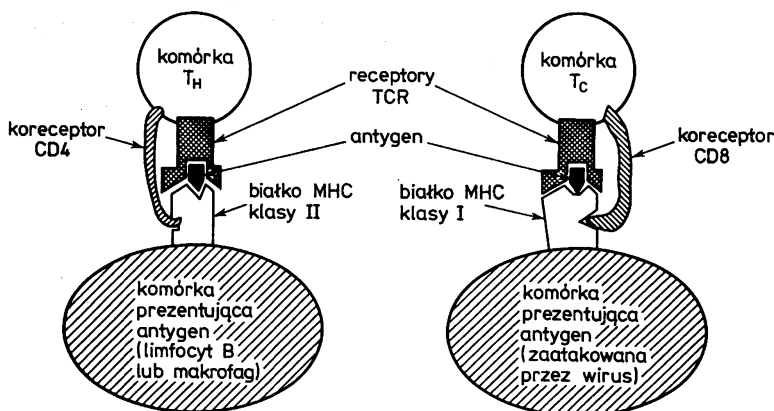
wytwarzają Ig o wyższym powinowactwie do antygenu w porównaniu do Ig znajdujących się w błonie komórki macierzystej przed stymulacją antygenem. Jest to zjawisko dojrzewania powinowactwa przeciwciał do antygenu, które ma swoje podłoże w somatycznych mutacjach genów Ig, co będzie omówione później. Pamięć immunologiczna powoduje to, że organizm łatwiej zwalcza już raz napotkany antygen — ponowne zakażenie taką samą bakterią lub wirusem zastaje organizm przygotowany do obrony.

11.7. Limfocyty T są podstawą odpowiedzi komórkowej i niezbędnym elementem odpowiedzi humoralnej

Omawiane do tej pory limfocyty B mają zdolność wytwarzania specyficznych przeciwciał umieszczonych w błonie oraz wydzielanych na zewnątrz komórki po zetknięciu z antygenem. Limfocyty T zaś mają na swojej powierzchni cząsteczki o strukturze zbliżonej do przeciwciał, zdolne do wiązania antygeny, nazywane receptorami komórek T (TCR), nie są jednak zdolne do wydzielania tych cząsteczek na zewnątrz. Ponadto, w odróżnieniu od przeciwciał powierzchniowych limfocytów B, receptory TCR nie wiążą rozpuszczonych antygenów — łączą się tylko z antygenami na powierzchni innych komórek. Limfocyty T zawdzięczają swoją nazwę temu, że przechodzą etap dojrzewania w grasicy (ang. thymus), co będzie omówione dokładnie dalej. Istnieją dwie klasy limfocytów T: limfocyty cytolityczne (T_C) oraz limfocyty pomocnicze (T_H) (ang. helper).

Limfocyty T_C wiążą komórki, na których powierzchni znajdują się obce antygeny i powodują lizę tych komórek. Klasycznym przykładem może być komórka zaatakowana przez wirus — zostanie ona rozpoznana przez receptory TCR na powierzchni limfocytu T_C , związana z limfocytem i zlizowana. Związanie TCR z antygenem staje się bodźcem do proliferacji limfocytu — w efekcie otrzymuje się klon komórek T_C , rozpoznających komórki zaatakowane przez dany wirus. Działanie jest podobne jak w przypadku przeciwciał, tzn. prowadzi do zniszczenia niepożądanych substancji. Różnicę stanowi to, że limfocyty T_C nie wiążą antygeny rozpuszczonego, lecz umieszczony na powierzchni komórek; antygen ten pochodzi z rozpadu obcych białek wytwarzanych w komórce i, ponadto, musi być związany z białkiem powierzchniowym MHC klasy I (czyli odpowiednio „zaprezentowany” receptorom TCR) (rys. 11.8).

Limfocyty drugiego typu, czyli T_H , działają w ten sposób, że rozpoznają obce antygeny znajdujące się na powierzchni komórek, przy czym antygeny te są produktem rozpadu obcych cząstek degradowanych przez daną komórkę. I w tym przypadku antygen musi być w kompleksie z białkami powierzchniowymi MHC (klasy II), czyli musi być „zaprezentowany” receptorom TCR. Interakcja limfocytów T_H z antygenem powoduje sekrecję cytokin, czynników niezwykle istotnych w odpowiedzi immunologicznej — stymulują one m.in. limfocyty B do sekrecji przeciwciał. Bez tej stymulacji połączenie antygeny z limfocytem B nie jest wystarczającym bodźcem do proliferacji komórki B i wydzielania przeciwciał; wręcz przeciwnie: związanie antygeny bez stymulacji T_H może prowadzić do paraliżu komórki B. Cytokiny wydzielane przez T_H stymulują również limfocyty T_C i makrofagi — widać więc, że limfocyty pomocnicze biorą udział w większości reakcji immunologicznych. Jak istotna jest ich rola, widać w przypadku zakażeń wirusem HIV, atakującym właśnie limfocyty T_H . Zniszczenie komórek T-pomocniczych prowadzi do syndromu AIDS, czyli załamania systemu obrony immunologicznej.



Rys. 11.8. Limfocyty T_C i T_H mają receptory TCR, które wiążą się odpowiednio z antygenami prezentowanymi na powierzchni komórek przez białka MHC klasy II i MHC klasy I. Białka CD4 i CD8 pełnią rolę koreceptorów. Antygenami są fragmenty obcych białek (wg H. Boehmer, P. Kisielow, *Scientific American*, p. 50–59. October 1991 — zmodyf.)

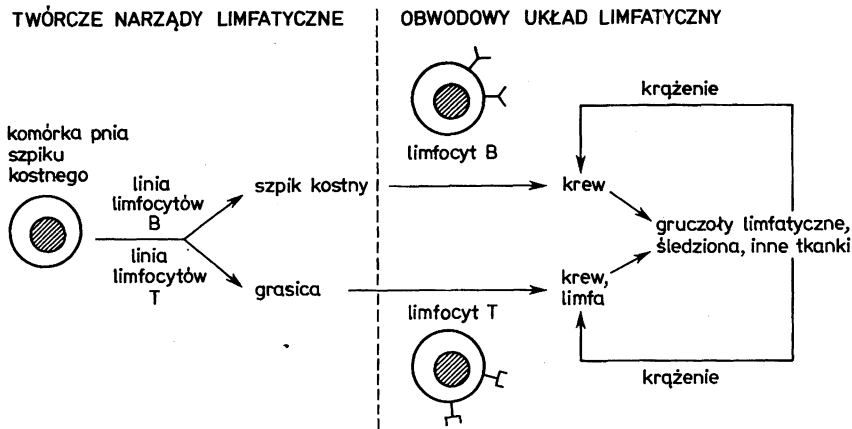
Jak rozróżnia się poszczególne klasy limfocytów, które morfologicznie są identyczne? Otóż posiadają one specyficzne białka powierzchniowe, które mają właściwości antygenowe i można je identyfikować w reakcjach immunologicznych. Białko powierzchniowe — specyficzne dla limfocytów B, to np. białko B-220, natomiast wszystkie limfocyty T mają białko Thy-1; limfocyty T_C niosą na powierzchni białko CD8, natomiast limfocyty T_H — białko CD4 (rys. 11.8).

11.8. Makrofagi są ważnymi komórkami wspomagającymi odpowiedź immunologiczną

Oprócz limfocytów B i T, makrofagi odgrywają bardzo istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej. Powstają, jak limfocyty, w szpiku kostnym, skąd migrują do tkanek oraz do krwi (we krwi określa się je mianem monocytów). Komórki te są wyspecjalizowane w fagocytozie, czyli wchłanianiu obcych cząstek, a więc bakterii, makrocząsteczek, a także resztek własnych, obumarłych komórek. Wchłonięte substancje są degradowane wewnątrz przez lizosomalne enzymy. Peptydy, będące fragmentami zdegradowanych białek (antygenów), wiążą się wewnątrz makrofagów z białkami MHC klasy II, które migrują na powierzchnię i prezentują fragmenty antygenów limfocytom T_H (rys. 11.8). Własne antygeny są ignorowane, natomiast obce stymulują limfocyty T_H do wzrostu, rozmnażania się i sekrecji cytokin. Cytokiny są absolutnie niezbędne w stymulacji limfocytów B do sekrecji przeciwciał.

11.9. Komórki układu immunologicznego krążą po całym organizmie

Komórki zaangażowane w odpowiedź immunologiczną, a więc przede wszystkim limfocyty B i T oraz mononuklearne fagocyty (tzn. monocyty i makrofagi), związane są z układem limfatycznym. Powstają one w szpiku kostnym z komórek pnia, skąd migrują do obwodowego układu limfatycznego; limfocyty T, przed wejściem do obwodu, wędrują do grasicy, w której dochodzi do selekcji, mającej na celu pozostawienie limfocytów rozpoznających jedynie obce antygeny, tolerancyjnych wobec własnych. Obwodowy układ limfatyczny złożony jest z gruczołów limfatycznych oraz systemu naczyń. Gruczoły zlokalizowane są w „strategicznych” miejscach organizmu, chroniąc go przed inwazją patogenów. Tak więc znajdują się m. in. w gardle (migdałki), w nosie (adenoidy), w pachach i pachwinach, gdzie filtrują płyny z kończyn, w ścianie jelit, gdzie filtrują antygeny dostające się z pokarmem lub pochodzące od bakterii namnażających się w jelitach. Limfa tworzy się z płynu transportowanego przez ścianki naczyń krwionośnych do tkanek i przestrzeni międzytkankowych. Stamtąd wpływa do naczyń limfatycznych, które zebraną limfę z powrotem wprowadzają do żył systemu krwionośnego. Limfocyty stanowią we krwi zaledwie 20–30% jądrzastych komórek, podczas gdy w limfie aż 99%. Wędrują pomiędzy krwią a limfą, przeciskając się między komórkami nabłonka naczyń krwionośnych. Limfocyty wędrują z limfą, są filtrowane przez gruczoły limfatyczne i tam okresowo przebywają. Do gruczołów trafiają również antygeny znajdujące się w limfie. Antygeny rozpuszczone we krwi filtrowane są przez śledzionę, której funkcja jest bardzo podobna do funkcji gruczołów



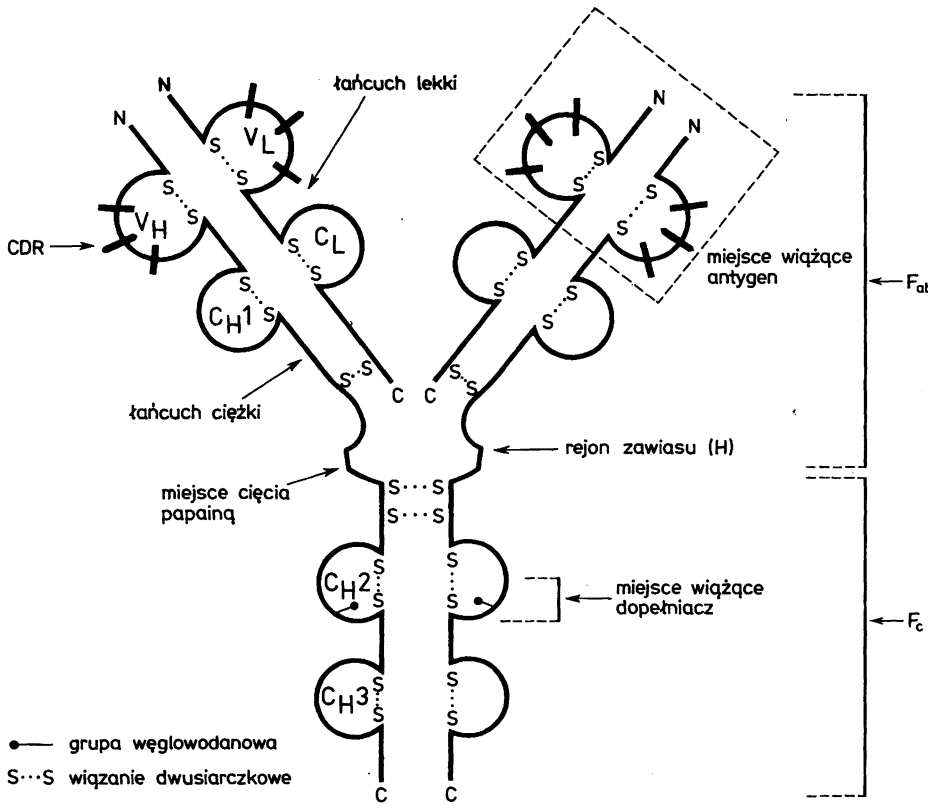
Rys. 11.9. Schemat cyrkulacji limfocytów u ssaków. Limfocyty wytwarzane w szpiku kostnym przed zetknięciem się z antygenem dojrzewają w narządach limfatycznych, skąd przedostają się do obwodowego systemu limfatycznego, gdzie zachodzi faza odpowiedzi immunologicznej, wywołana obecnością antygeny (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.).

limfatycznych. W gruczolach limfatycznych i w śledzionie mononuklearne fagocyty wchłaniają antygeny, degradowują je i prezentują na swojej powierzchni. Limfocyty B z odpowiednimi przeciwciałami powierzchniowymi oraz limfocyty T z odpowiednimi receptorami wiążą wolne antygeny lub antygeny prezentowane przez komórki. W efekcie stymulacji antygenem, limfocyty B i limfocyty T ulegają aktywacji, mnożą się i dojrzewają. Związanie antygeny prowadzi do selekcji klonalnej, tzn. do wybrania komórek B z odpowiednimi przeciwciałami (Ig) i komórek T z odpowiednimi receptorami (TCR). W gruczolach limfatycznych i śledzionie następuje współdziałanie limfocytów B i T, co jest ułatwione przez znaczną koncentrację komórek. W efekcie selekcji klonalnej tworzą się dojrzałe limfocyty B, czyli komórki plazmatyczne wydzielające przeciwciała. Komórki plazmatyczne i przeciwciała opuszczają wraz z limfą gruczoły i transportowane są do krwi (rys.11.9).

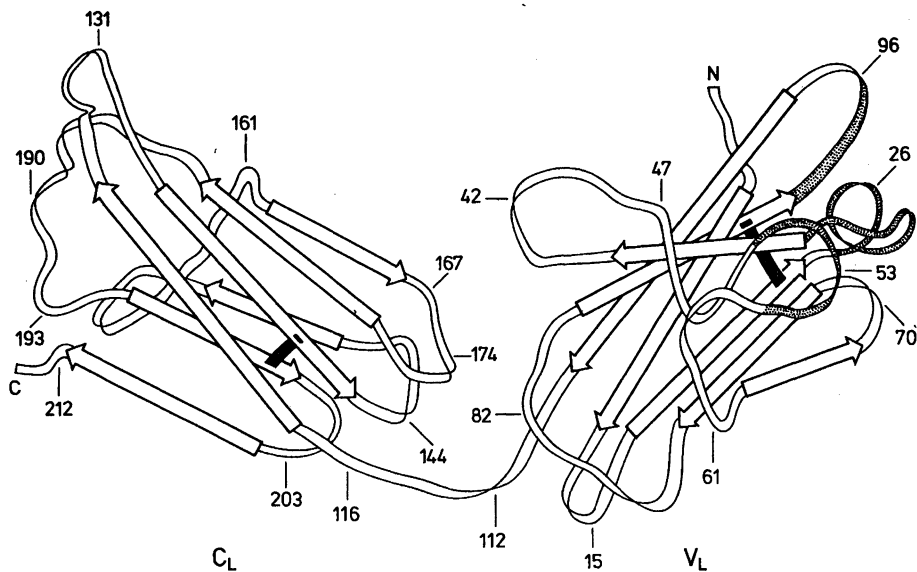
11.10. Przeciwciała mają wspólny plan budowy, lecz są bardzo różnorodne

Struktura przeciwciał (Ig) bardzo pobieżnie została omówiona wcześniej. W tej części zwrócona zostanie uwaga na fakt, że cząsteczki przeciwciał, w zasadzie mające bardzo podobną budowę, są jednak niesłychanie zróżnicowane co do zdolności do reagowania z antygenami. Dokładne badania nad chemiczną strukturą przeciwciał były utrudnione tak długo, jak długo jedynym źródłem tych białek była krew immunizowanych określonym antygenem osobników. Krew zawierała mieszaninę różnych rodzajów Ig, z których każda była produktem jednego klonu komórek B. Problem został rozwiązany, kiedy okazało się, że komórki szpiczaka (ang. myeloma), nowotworu będącego efektem transformacji nowotworowej pojedynczej komórki limfoidalnej, intensywnie wydzielają przeciwciała — stanowią one aż do 10% wszystkich białek produkowanych przez te komórki. Ponieważ wszystkie komórki stanowią jeden klon, wytwarzają tylko jeden rodzaj Ig o na ogół nie znanej specyficzności wobec antygeny. Szpiczaki powstają spontanicznie u ludzi, mogą być także indukowane u myszy przez dootrzewnowe wstrzyknięcie oleju mineralnego. Pierwsze prace dotyczące sekwencji aminokwasów poszczególnych łańcuchów Ig wykonano właśnie na przeciwciałach wytwarzanych przez komórki szpiczaków. Następna możliwość uzyskiwania homogenych przeciwciał powstała dzięki opracowaniu metody otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. Metoda ta polega na uzyskaniu linii komórkowych z pojedynczych komórek B, wytwarzających przeciwciała o określonej specyficzności. Dostępność homogenych przeciwciał i produkujących je klonów umożliwiła nie tylko badania nad strukturą przeciwciał, ale również klonowanie i analizę ich genów. Badania nad strukturą przeciwciał wykazały, że Ig wszystkich 5 klas (tab. 11.1) mają ten sam ogólny plan budowy. Każda cząsteczka składa się z dwu identycznych lekkich łańcuchów (L) o masie ok. 23 kDa oraz z dwu identycznych łańcuchów

ciężkich (H), o masie ok. 53 kDa lub więcej. Cząsteczka Ig zawiera łańcuchy lekkie należące do typu kappa (κ) lub lambda (λ), nigdy mieszanie tych typów. Różnice między klasami Ig wynikają z różnic między łańcuchami H, ponieważ każda klasa charakteryzuje się swoistym typem łańcucha, określanego grecką literą odpowiadającą nazwie Ig (tab. 11.1). Łańcuchy H są glikozylowane, przez przyłączenie łańcuchów cukrowych do reszt asparaginy. Łańcuchy są połączone mostkami dwusiarczkowymi: łańcuch H z L, tworząc monomer, oraz oba łańcuchy H, dzięki czemu dwa monomery tworzą dimer, podstawową jednostkę struktury. Oba łańcuchy zbudowane są z serii powtarzających się homologicznych jednostek, każda o długości ok. 110 reszt aminokwasowych; jednostki te zwijają się niezależnie, tworząc globularne domeny, określane jako motywy immunoglobulinowe (rys. 11.10). Wszystkie domeny, Ig zawierają



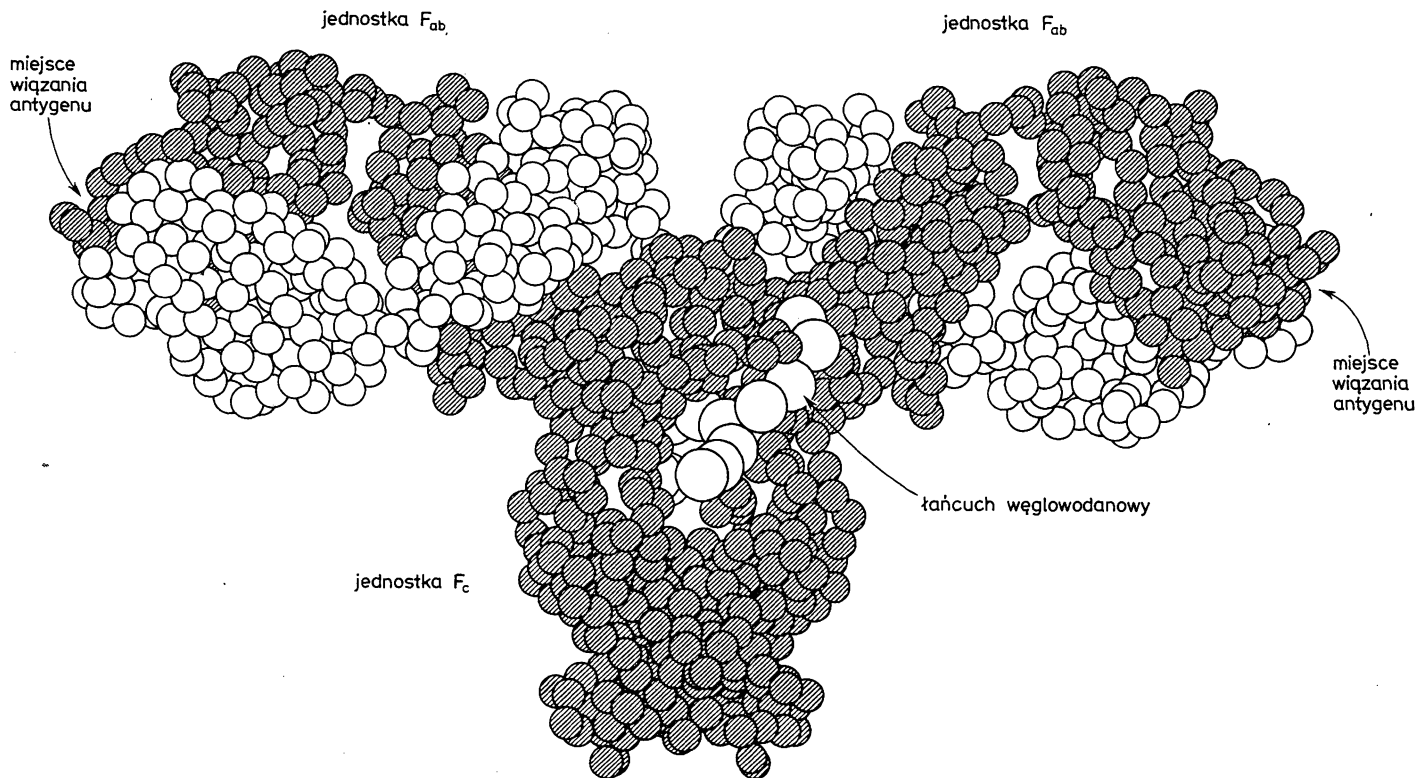
Rys. 11.10. Struktura cząsteczki przeciwciała. Zaznaczono domeny immunoglobulinowe, zawierające ok. 110 aminokwasów i związane mostkiem S—S. Domeny rejonów zmiennych obu łańcuchów — V_L i V_H — zawierają 3 rejon nadzmienny (CDR), warunkujące specyficzną interakcję z antygenem. Pozostałe domeny mają stabilną sekwencję (C_H1 , C_H2 , C_H3 oraz C_L). Łagodnie trawienie papainą przecina rejon zawiasu, cząsteczka rozpada się na dwa elementy F_{ab} (wiążące antygen) i jeden element F_c . V_H — rejon zmienny łańcucha ciężkiego; C_H — rejon stały łańcucha ciężkiego; V_L — rejon zmienny łańcucha lekkiego; C_L — rejon stały łańcucha lekkiego (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)



Rys. 11.11. Model domeny zmiennej (V_L) oraz domeny stałej (C_L) lekkiego łańcucha Ig. Strzałki reprezentują rejony β -harmonijki łańcucha peptydowego, którego N- i C-koniec są oznaczone odpowiednio jako N i C. Zakropkowane rejony nadzmiennie: CDR1, CDR2 i CDR3 rejonu zmiennego, tworzące pętle, które formują powierzchnię łańcucha L wiążącą antygen. Czarne odcinki symbolizują mostki S—S (wg A.B. Edmundson et al., *Biochemistry*, 14, 3953–3961, 1975 — zmodyf.)

dwie warstwy β -harmonijki z 3 lub 4 pasmami przeciwnie skierowanych łańcuchów peptydowych. Każda z domen utrzymywana jest przez wewnętrzne mostki S—S (rys. 11.11). Łańcuch L ma dwie takie domeny, natomiast H — cztery lub pięć. Wiele innych białek należących do systemu immunologicznego ma podobne motywy budowy — stąd zalicza się je wszystkie do superrodziny Ig, a ich geny — do superrodziny genów Ig. Pierwsze dwie N-terminalne domeny łańcucha L powiązane są z dwiema domenami łańcucha H, tworząc zwartą strukturę (F_{ab}), która wiąże determinantę antygenową. Łańcuchy H mają na ogół rejon zawiasu, o dużej ruchliwości, umożliwiający dość swobodne poruszanie się rejonu wiążącego antygen. W tym rejonie znajdują się reszty cysteinowe, tworzące mostki S—S między monomerami. Rejon ten jest wrażliwy na działanie proteaz i, stosując łagodną hydrolizę enzymatyczną (np. papainą), można przeciąć cząsteczkę Ig na część F_{ab} , czyli wiążącą antygen, oraz na część F_c , zawierającą rejon stały cząsteczki.

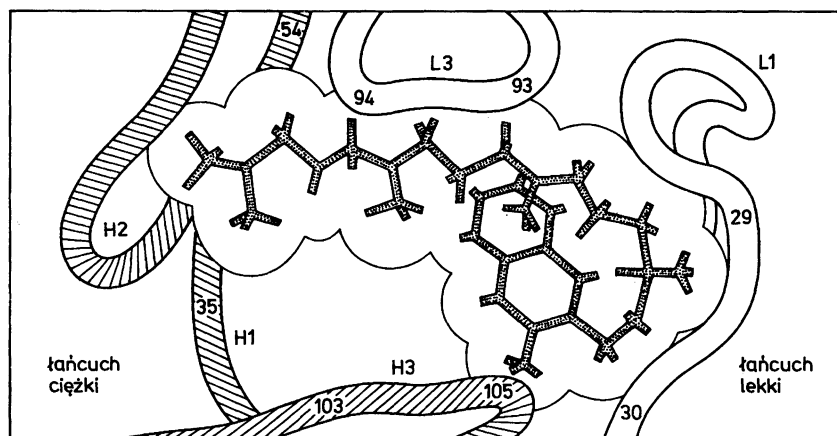
N-terminalne domeny obu łańcuchów (tzn. V_H i V_L) mają bardzo zmienną sekwencję aminokwasów, w odróżnieniu od domen C-terminalnych, charakteryzujących się stabilną budową. Stąd też rejon N-terminalny łańcuchów określa się mianem rejonu zmiennego — V (ang. variable), a rejon C-terminalny — mianem rejonu stałego — C (ang. constant). Obie domeny zmienne (V_H i V_L) tworzą zwartą strukturę ze szczeliną wiążącą determinantę antygenową. Zróżnicowanie przeciwciał polega na zróżnicowaniu rejonów zmiennych (V),



Rys. 11.12. Model cząsteczki IgG, opracowany na podstawie badań krystalograficznych. Model przedstawia atomy jako „pileczki” wypełniające cząsteczkę — widać wyraźnie, że cząsteczka ma kształt litery Y i złożona jest z czterech łańcuchów — dwu łańcuchów H („pileczki” zakreskowane) i dwu łańcuchów L („pileczki” białe). Widoczny jest łańcuch węglowodanowy (wg E.W. Silverton et al., PNAS 74, 51410, 1977)

całkowicie odpowiedzialnych za wiązanie antygeny. Specyficzność Ig wobec antygeny uwarunkowana jest jedynie przez sekwencje aminokwasowe rejonów zmiennych. W reakcji z antygenem konieczna jest obecność obu rejonów (V_H i V_L) razem tworzących miejsce wiązania. Pozostała część cząsteczki Ig, zbudowana z rejonów stałych (C), nie bierze udziału w wiązaniu antygeny. Część ta odpowiedzialna jest za efektorową funkcję Ig, m.in. wiąże białko należące do systemu dopełniacza, przez co system ten ulega aktywacji.

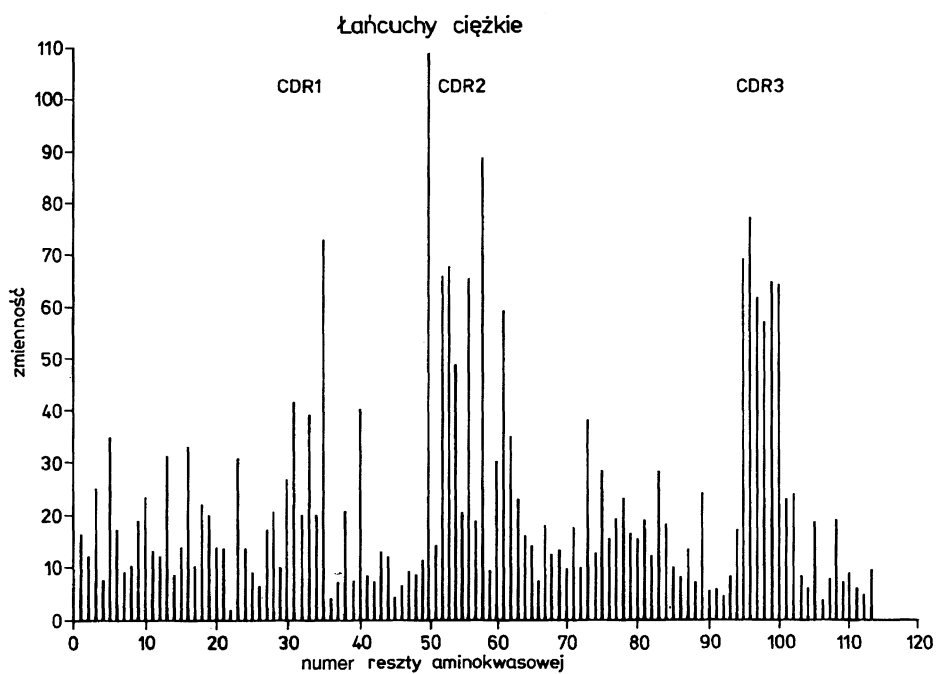
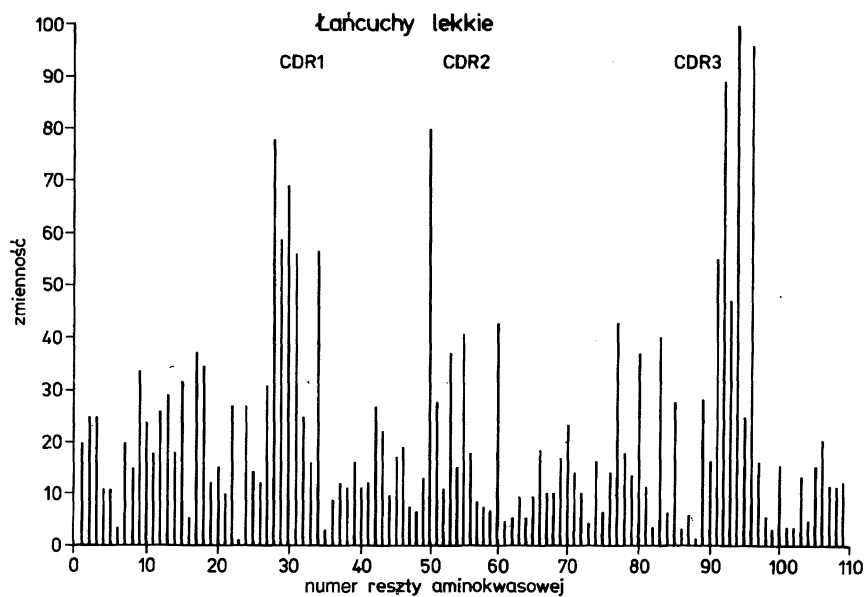
Dzięki badaniom kryształów Ig metodą dyfrakcji promieni X można było określić z dużą dokładnością strukturę wielu przeciwciał (rys. 11.12) i kompleksów antygen–przeciwciało. Obrazy uzyskane tą metodą przedstawiają szczelinę, kieszeń lub płaszczyznę na powierzchni przeciwciała, utworzone przez trzy krótkie segmenty polipeptydowe z każdego z łańcuchów (a więc razem sześć) (rys. 11.13)



Rys. 11.13. Cząsteczka antygeny umieszczona jest w szczelinie utworzonej przez miejsce wiązanie Ig. Schemat narysowano na podstawie analizy krystalograficznej ludzkiego IgG (białko NEW szpiczaka) wiążącego γ -hydroksylo-witaminę K. Antygen kontaktuje się z 10–12 aminokwasami rejonów nadzmiennych (CDR) łańcuchów lekkich i ciężkich (oznaczonych jako L1, L3, H1, H2, H3). Liczby określają aminokwasy (liczone od N-końca) kontaktujące się z antygenem (wg I.M. Roitt, J. Brostoff, D.K. Male, *Immunology*. Gower Medical Publishing, London – New York 1989)

Pętle łańcucha polipeptydowego kontaktujące się z antygenem, określane jako rejony CDR (ang. complementarity determining regions), warunkują komplementarność przeciwciała w stosunku do antygeny. Są to rejony nadzmiennicze rejonu zmiennego, tzn. rejony o najwyższej zmienności sekwencji aminokwasowych (rys. 11.14).

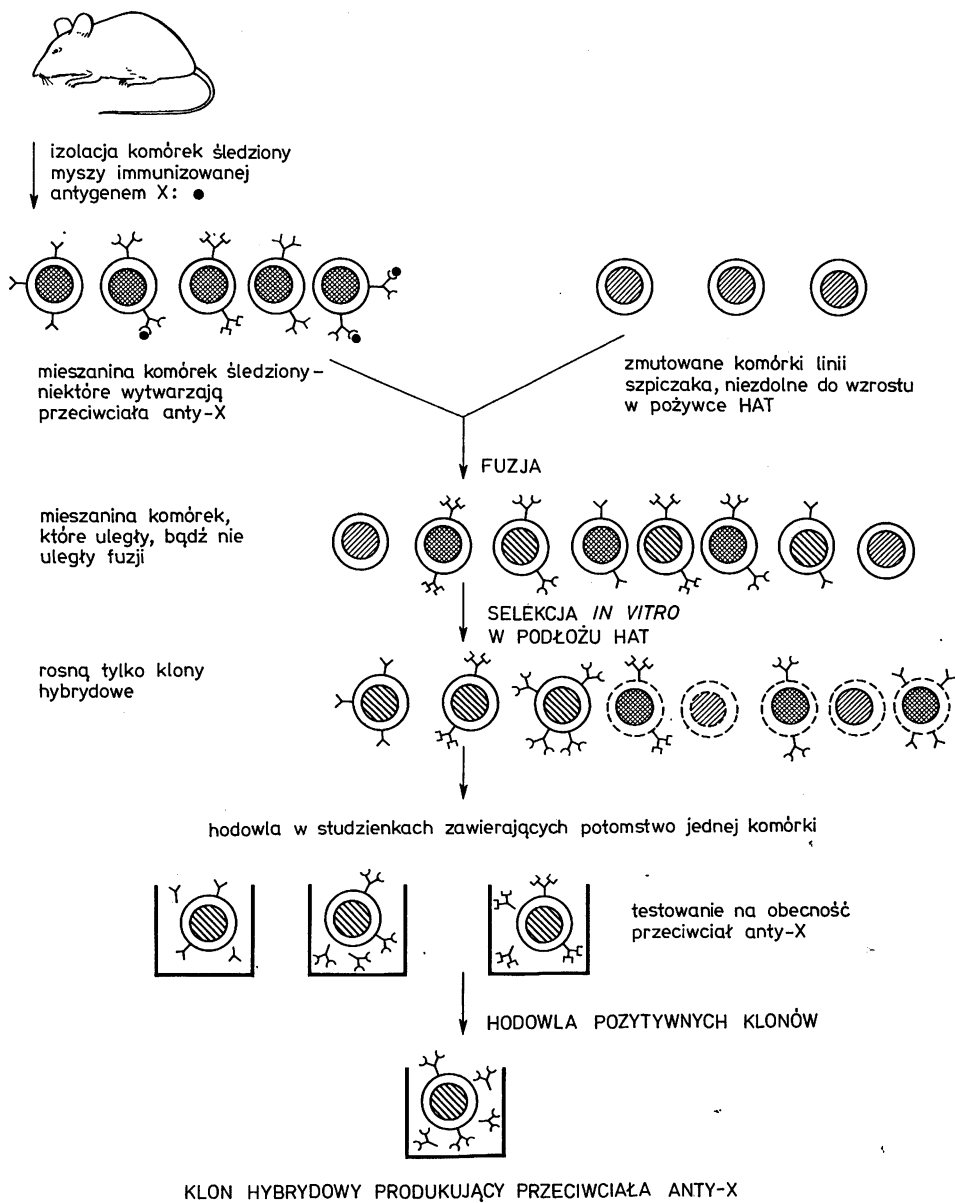
Wiązania utrzymujące kompleks antygen–przeciwciało — to wiązania niekwalencyjne, a więc: wodorowe, elektrostatyczne, oddziaływania hydrofobowe i siły van der Waalsa. Wielokrotność wiązań czyni te oddziaływania w sumie bardzo silnymi. Warunkiem silnego związania antygeny jest bardzo dobry i bliski kontakt, gdyż jest to warunek wytworzenia wiązań niekwalencyjnych. Stąd konieczność komplementarności struktur przeciwciała i antygeny.



Rys. 11.14. Rejony nadzmiennie w łańcuchach lekkich i ciężkich cząsteczek immunoglobulin. Zmiennność określono jako liczbę różnych aminokwasów znalezionych w danej pozycji łańcucha polipeptydowego, licząc od N-końca niezależnie zsekwencjonowanych łańcuchów różnych cząsteczek Ig. Najbardziej zmienne reszty aminokwasowe zgrupowane są w trzech rejonach, określanych jako CDR1, CDR2 i CDR3 (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

11.11. Umiemy wytwarzać przeciwciała monoklonalne

Jak wiemy, każdy limfocyt B produkuje jeden rodzaj przeciwciał, o określonej specyficzności. Tak więc linia komórkowa, czyli klon, pochodząca od jednego limfocyta będzie wytwarzała stale jeden i ten sam typ przeciwciał. Niestety, normalna komórka B nie może żyć wiecznie. Wyjątkiem są nowotwory typu szpiczaka, czyli komórki B, które uległy transformacji nowotworowej i, w związku z tym, zdobyły nieśmiertelność. Jeśli dokona się fuzji komórki B z komórką linii szpiczaka, efektem będzie komórka nieśmiertelna, czyli rosnąca i ulegająca podziałom w nieskończoność, a ponadto produkująca przeciwciała o pożądanej specyficzności — takie, jakie wytwarzał limfocyt B. Hybrydowe komórki produkują więc przeciwciała monoklonalne. Trudność polega na znalezieniu właściwej fuzji komórkowej — jest to możliwe dzięki zastosowaniu odpowiednio zmutowanych komórek szpiczaka, zdolnych do wzrostu w normalnej pożywce, a niezdolnych do wzrostu w podłożu selekcyjnym. Zdolność do wzrostu w podłożu selekcyjnym zyskują tylko te komórki, które połączyły się z komórką B. Komórka B dostarcza nie zmutowane geny, defektywne w linii szpiczaka, sama natomiast zyskuje zdolność do nieskończonych podziałów. Komórki B, które nie uległy fuzji, giną po 1–2 tygodniach hodowli. Tak więc w podłożu selekcyjnym mogą rosnąć jedynie hybrydy. Defekt w linii komórkowej szpiczaka polega na mutacji uniemożliwiającej syntezę DNA w podłożu selekcyjnym. Otóż podłoże selekcyjne zawiera aminopterynę, która blokuje syntezę nukleotydów *de novo*. Synteza nukleotydów purynowych i tymidylanu *de novo* przebiega wieloetapowo — jeden z etapów wymaga aktywnego kwasu tetrahydrofoliowego jako dawcy reszty metylowej lub formylowej. Aminopteryna hamuje reaktywację kwasu tetrahydrofoliowego, tym samym hamując wytwarzanie zarówno puryn, jak i tymidylanu. Efektem jest zahamowanie syntezy DNA. Normalne komórki traktowane aminopteryną mogą sobie poradzić, stosując rezerwowy szlak resyntezy nukleotydów, gdzie puryny są syntetyzowane z dostarczanej do pożywki hipoksantyny, dzięki funkcjonowaniu enzymu fosforybozylotransferazy hipoksantynowej (HGPRT). Tymidylan zaś jest tworzony z dostarczanej w pożywce tymidyny, dzięki działaniu kinazy tymidylanowej (TK). Zmutowane komórki szpiczaka (TK⁻ lub HGPRT⁻) nie mogą korzystać ze szlaku resyntezy, nie są więc w stanie rosnąć w obecności aminopteryny, w pożywce zawierającej hipoksantynę i tymidynę (pożywka HAT). Jeśli normalna komórka ulegnie fuzji z komórką TK⁻ lub HGPRT⁻, to stanie się źródłem brakującego enzymu(ów), tak więc hybrydy produkują DNA i rosną w pożywce HAT. Oczywiście, różne klony hybrydowe produkują różne przeciwciała, specyficzne wobec różnych determinant antygeny użytego do immunizacji. Klony hybrydowe produkujące przeciwciała o pożądanej specyficzności są źródłem przeciwciał monoklonalnych, które można produkować w hodowli tkankowej lub też *in vivo*,



Rys. 11.15. Wytwarzanie przeciwciał monoklonalnych. Objaśnienia są w tekście (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

wstrzykując myszy hybrydowe komórki, które indukują powstawanie guzów nowotworowych, wytwarzających znaczne ilości przeciwciał (rys.11.15). D fuzji najczęściej używane są komórki szpiczaka niezdolne do wytwarzania własnych przeciwciał.

11.12. Są dwa zasadnicze mechanizmy prowadzące do różnorodności przeciwciał

Jak wynika z dyskusji nad budową przeciwciał, ich zróżnicowanie, a więc i zdolność do wiązania różnych antygenów, wynika z różnorodności części zmiennych (V) łańcuchów Ig. Jak pogodzić ogromną zmienność jednej części polipeptydu z dużą stabilnością pozostałej części? Można sobie wyobrazić dwa mechanizmy tłumaczące to zjawisko:

(a) istnieje jeden gen kodujący cały łańcuch polipeptydowy Ig i gen ten ulega bardzo częstym mutacjom, lecz tylko w części V. W efekcie tych mutacji uzyskuje się zróżnicowaną populację komórek B;

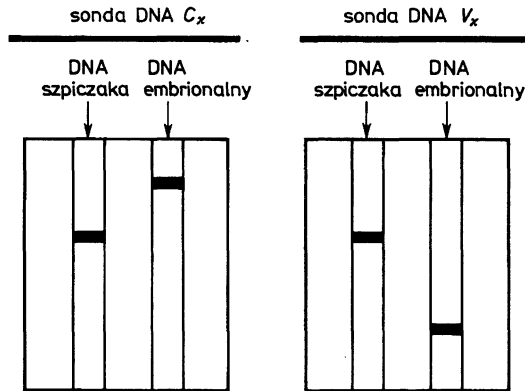
(b) istnieje duża liczba genów kodujących rejony zmienne V i każdy z nich może połączyć się z pojedynczym genem kodującym rejon stały. Okazało się, że oba te mechanizmy, tzn. somatycznych mutacji (a) i somatycznych rekombinacji (b) są wykorzystywane w tworzeniu różnorodnych Ig. Jako pierwsza została udowodniona eksperymentalnie hipoteza somatycznej rekombinacji, tłumacząca powstanie różnorodnych Ig przegrupowaniami w DNA kodującym Ig.

11.13. Geny immunoglobulin ulegają somatycznej rekombinacji

Dreyer i Bennett postulowali w roku 1965, że każdy łańcuch Ig jest kodowany przez co najmniej dwa geny, jeden zmienny, a drugi stały, które łączą się bądź na poziomie DNA, bądź też mRNA. Dowód na to, że DNA rzeczywiście ulega przegrupowaniu w czasie dojrzewania komórek B, przedstawiono ponad 10 lat później. Porównano DNA z tkanki embrionalnej myszy, nie wytwarzającej przeciwciał i DNA z komórek szpiczaka myszy, produkujących przeciwciała. Doświadczenia wykazały, że specyficzne sekwencje kodujące rejony V i C w komórkach szpiczaka znajdowały się w tym samym fragmencie restrykcyjnym DNA, natomiast te same sekwencje występowały w dwu różnych fragmentach restrykcyjnych DNA komórek embrionalnych. Świadczy to o przegrupowaniu sekwencji kodujących cząsteczki Ig w trakcie różnicowania komórek B (rys. 11.16).

Tak więc, dojrzewaniu limfocytów B towarzyszy przegrupowanie w DNA kodującym immunoglobuliny. Polega ono na zbliżeniu, w procesie somatycznej rekombinacji, rejonów DNA kodujących część stałą (C) i część zmienną (V) łańcucha Ig.

Organizacja genów Ig w linii zarodkowej (i w komórkach somatycznych różnych od tkanki limfoidalnej) jest zasadniczo podobna u badanych gatunków. Geny kodujące dwa łańcuchy lekkie, κ i λ , oraz pojedynczy locus zawierający różne geny łańcuchów ciężkich, są zlokalizowane w różnych chromosomach (odpowiednio w chromosomie 2, 22 i 14 u człowieka). Każdy zestaw ma podobną podstawową organizację. Najdokładniej poznano struk-

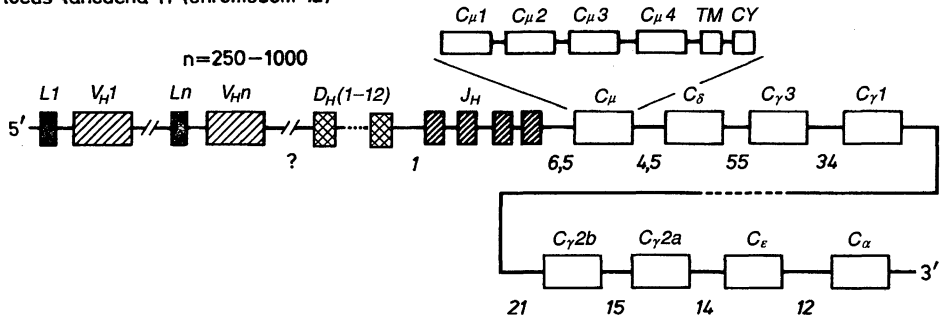


Rys. 11.16. Przegrupowania wewnątrz genu łańcucha κ w komórkach B. DNA izolowany z komórek szpiczaka, produkujących przeciwciała, oraz z komórek embrionalnych myszy cięto enzymami restrykcyjnymi i rozdzielano elektroforetycznie. Po elektroforezie, DNA hybrydyzowano z radioaktywnymi sondami. Lewa część rysunku przedstawia wynik hybrydyzacji z sondą specyficzną wobec regionu stałego genu łańcucha κ ($C\kappa$), prawa część — wynik hybrydyzacji z sondą specyficzną wobec części zmiennej ($V\kappa$) genu. Widać, że przy zastosowaniu każdej z sond inne fragmenty DNA ulegają hybrydyzacji w przypadku szpiczaka niż w przypadku komórek embrionalnych. Widać też, że DNA szpiczaka zawiera fragment hybrydujący zarówno z sondą $C\kappa$, jak i $V\kappa$ — a więc te rejony muszą znajdować się blisko siebie. W przypadku DNA embrionalnego, rejony $C\kappa$ i $V\kappa$ znajdują się w różnych fragmentach — a więc są dalej od siebie niż w DNA szpiczaka (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)

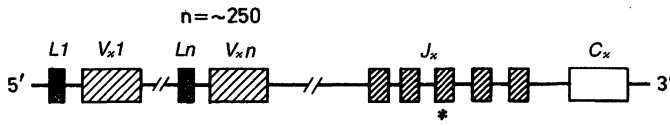
ture loci Ig u myszy (rys. 11.17). Loci łańcuchów lekkich i ciężkich złożone są z wielu genów kodujących rejony V i C polipeptydów, oddzielonych rejonami niekodującymi. Na końcu 5' każdego locus Ig znajdują się egzony regionu V (każdy ok. 300 par zasad), oddzielone od siebie odcinkami niekodującymi. Około 90 par zasad w kierunku 5' od każdego z egzonów V znajduje się mały, (60–90 par zasad) egzon, oznaczany jako L , kodujący sygnał inicjacji translacji oraz peptyd liderowy, czyli N-terminalny odcinek łańcucha Ig, złożony z 20–30 aminokwasów (umiarkowanie hydrofobowy). Jak wiadomo, sekwencje liderowe są typowe dla białek wydzielanych oraz dla białek błon. W omawianym przypadku uczestniczą one w transporcie łańcuchów Ig do wnętrza retikulum endoplazmatycznego, gdzie peptydy liderowe są odcinane. Liczba egzonów V (często określanych jako geny V^1) u myszy waha się od dwu dla łańcucha λ do ok. 1000 dla łańcuchów ciężkich, gdzie zajmują odcinek DNA o znacznej długości. U wszystkich zbadanych gatunków, geny V (w sensie „egzony”) tworzą rodziny genów, przy czym w obrębie rodziny sekwencje nukleotydowe

¹ Przy opisywaniu loci Ig termin „gen” określa albo DNA kodujący cały łańcuch lekki bądź ciężki Ig, lub też segment DNA kodujący jedynie części V lub C ; często też zamiennie używa się określenia „gen” i „egzon”. Określenie „gen V ” może oznaczać cały rejon DNA kodujący część V łańcucha (jak zostanie wyjaśnione, odcinek V składa się z egzonu V oraz dodatkowych elementów D i J), bądź tylko egzon V . Niestety, terminologia jest niemal tak skomplikowana jak same geny.

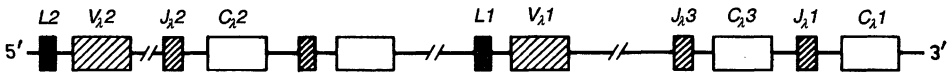
locus łańcucha H (chromosom 12)



locus łańcucha κ (chromosom 6)



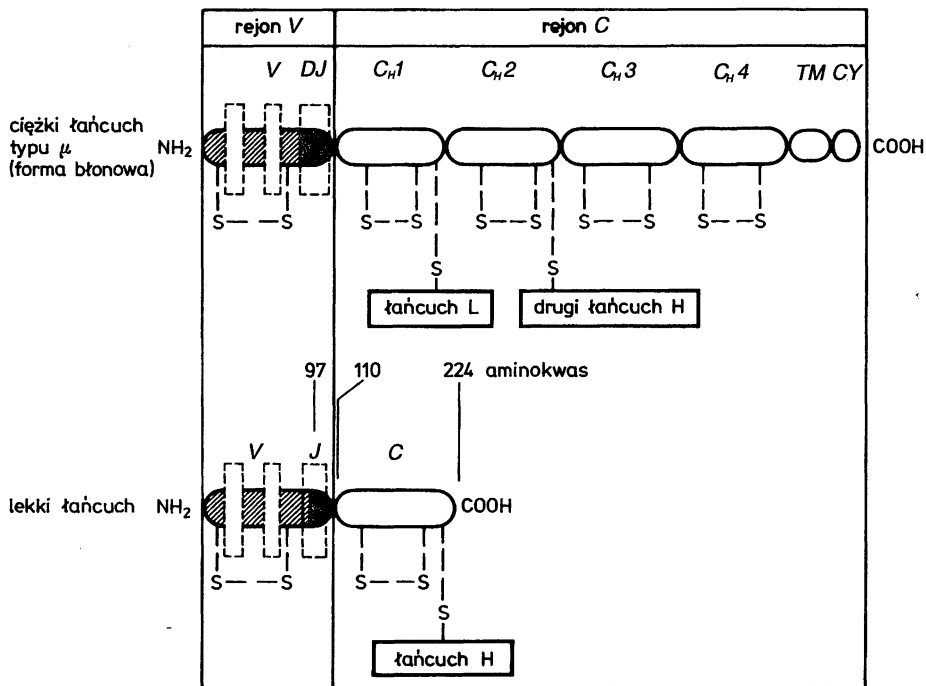
locus łańcucha λ (chromosom 16)



Rys. 11.17. Organizacja genów immunoglobulin w linii zarodkowej myszy. Rozmiary egzonów i sekwencji rozdzielających nie są narysowane w skali. Liczby napisane kursywą określają w przybliżeniu długość odcinków DNA (w 1000 par zasad). Gwiazdka oznacza niefunkcyjny pseudogen. Każdy gen C_H jest przedstawiony jako pojedynczy prostokąt, składa się jednak z wielu egzonów; egzony te przedstawiono jedynie dla C_μ — w tym przypadku widać cztery główne egzony ($C_{\mu 1}$ – $C_{\mu 4}$) oraz egzony rejonu transmembranowego (TM) i cytoplazmatycznego (CY). Segmenty genów oznaczono następująco: L — część kodująca peptyd liderowy; V — egzon części zmiennej; D — rejon różnorodności; J — rejon łączący, C — segment kodujący część stałą. Należy zwrócić uwagę, iż łańcuch H oraz $L\kappa$ zawierają biblioteki rejonów V , złożone z kilkuset ułożonych tandemowo egzonów V (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

są identyczne w ponad 80%; między rodzinami homologia wynosi poniżej 70%. Uważa się, że każda rodzina jest efektem duplikacji jednego, wyjściowego genu V . Złożoność rodziny określona jest liczbą genów w tej rodzinie. Na przykład u myszy istnieje co najmniej 9 rodzin genów V łańcucha H, a każda złożona jest z 2–60 genów. W kierunku 3' od genów V znajdują się geny rejonu C . U myszy i u człowieka locus łańcucha lekkiego κ ma pojedynczy gen C , locus λ ma trzy do sześciu, natomiast geny C rejonu C różnych izotypów łańcucha ciężkiego ułożone są tandemowo w porządku specyficznym dla gatunku. Każdy gen C łańcucha ciężkiego złożony jest z 3–4 egzonów (o rozmiarze podobnym do egzonu V), kodujących rejon C , oraz z mniejszych egzonów kodujących C-terminalne domeny transmembranowe i cytoplazmatyczne cięż-

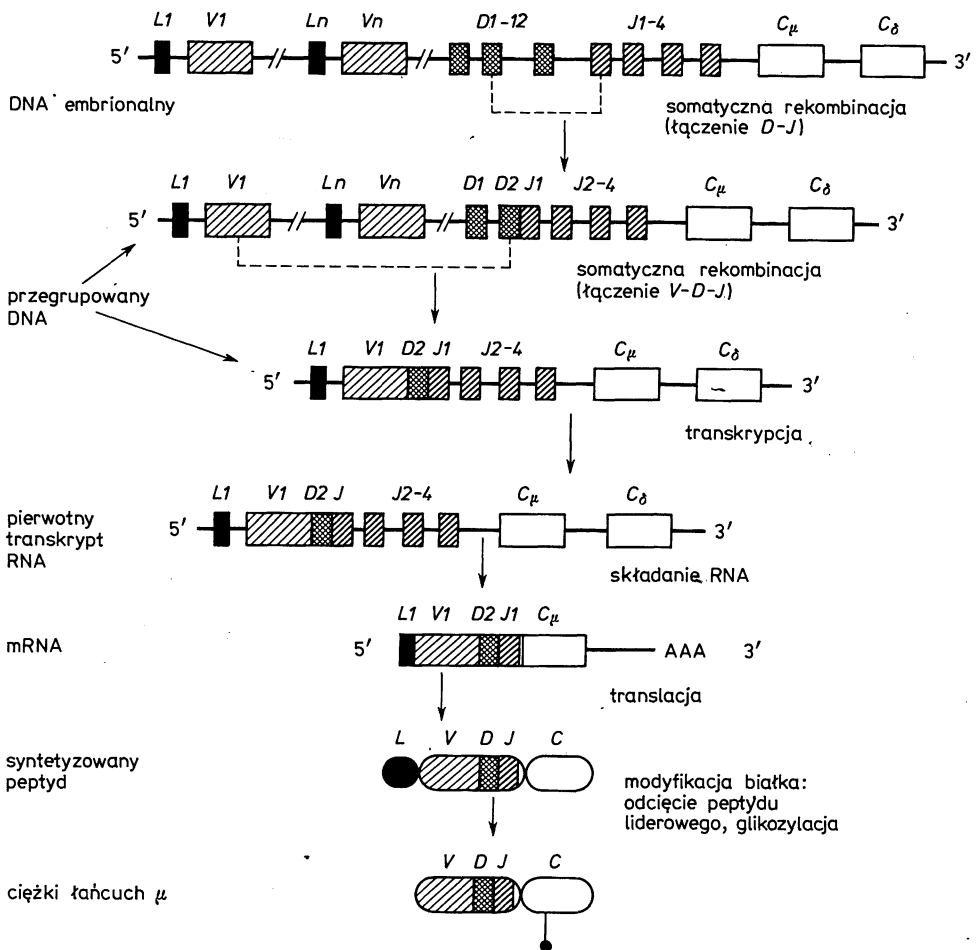
kich łańcuchów. Pomiedzy genami *V* i *C*, oddzielonymi intronami, zlokalizowane są dodatkowe sekwencje (o długości 30–50 par zasad), kodujące segmenty łączące (*J*) oraz, tylko w locus łańcucha H, segmenty różnorodności (*D*) (ang. diversity). Segmenty *J* i *D* kodują karboksyterminalne końce rejonów *V*, w tym trzeci nadzienny rejon cząsteczki (CDR3) (rys. 11.18). Tak więc, w łańcuchu lekkim (κ i λ) rejon zmienny kodowany jest przez egzony *V* i *J*, a rejon stały — przez egzony *C* (ten ostatni nie ma rejonu transmembranowego ani cytoplazmatycznego). W łańcuchu ciężkim rejon zmienny zakodowany jest przez egzony *V*, *D* i *J*. Stały rejon białka kodowany jest przez liczne egzony *C*, a w przypadku łańcuchów związanych z błoną, również przez egzony kodujące domenę transmembranową i cytoplazmatyczną. Każdy gen *C*, nie tylko *C_μ*, ma egzony kodujące domenę transmembranową i cytoplazmatyczną — stąd każdy rodzaj Ig może występować w wersji związanej z błoną lub w wersji rozpuszczalnej.



Rys. 11.18. Relacje między segmentami genów Ig a domenami łańcucha polipeptydowego. Rejony *V* i *C* łańcucha polipeptydowego są kodowane przez różne segmenty genów. Przerwana linia określa położenie nadziemnych rejonów *CDR* (czyli determinujących specyficzność wobec antygeny). W łańcuchu ciężkim typu μ , część transmembranowa i cytoplazmatyczna są kodowane przez oddzielne egzony *TM* i *CY*. W łańcuchu lekkim liczby określają położenie aminokwasów. Nie pokazano rejonu kodowanego przez segment *L*, znajdujący się w położeniu 5' do segmentu *V*, ponieważ kodowany przez *L* peptyd liderowy jest odcinany w czasie transportu łańcucha przez błonę retikulum endoplazmatycznego (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

Tandemowe ułożenie genów *V* i *C* w każdym z loci oraz strukturalne homologie między nimi pozwalają przypuszczać, że wszystkie te geny w ewolucji powstały przez wielokrotne duplikacje pierwotnego genu. Każdy egzon *V* i *C* koduje oddzielną domenę w białku Ig.

W procesie dojrzewania limfocytów B dochodzi do somatycznej rekombinacji, prowadzącej do wytworzenia funkcjonalnych genów Ig. Pierwsze przegrupowanie następuje w locus łańcucha ciężkiego, gdzie dochodzi do połączenia jednego z segmentów *D* z jednym z segmentów *J*, z jednoczesną delecją dzielącego te segmenty DNA (rys. 11.19).



Rys. 11.19. Kolejne wydarzenia prowadzące do syntezy łańcucha ciężkiego Ig typu μ u myszy. W tym przypadku, rejon *V* jest kodowany przez egzony: *V1*, *D2* i *J1*. Geny *C_H* położone po stronie 3' od *C_δ* nie są pokazane. Lokalizacja reszty cukrowej jest przybliżona; odległości nie są przedstawione w skali (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

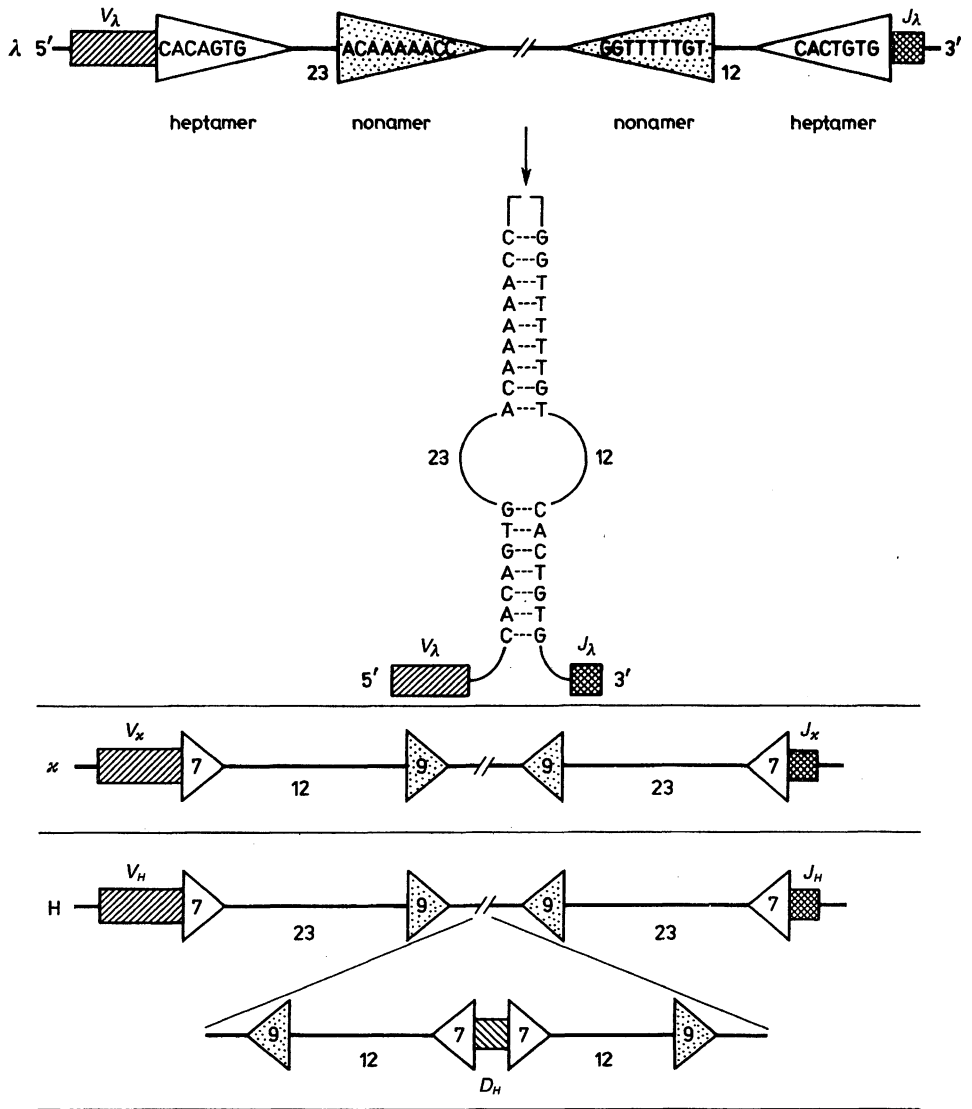
Następnie, jeden z wielu genów V łączy się z kompleksem DJ , tworząc gen VDJ . Dopiero po tym etapie może nastąpić transkrypcja genu kodującego łańcuch H. W pierwotnym transkrypcie kompleks VDJ jest oddzielony od rejonu C przez intron, który ulega wycięciu w procesie składania mRNA; transkrypt ulega poliadenylacji w miejscu zlokalizowanym 3' od rejonu C_{μ} . Geny kodujące inne klasy C_H także mają miejsca poliadenylacji, które mogą być wykorzystywane, kiedy te właśnie klasy C_H ulegają ekspresji (p. rys. 11.35). Translacja dojrzałego mRNA prowadzi do wytworzenia białka μ , które na pewnym etapie dojrzewania limfocytu B jest jedynym prekursorem Ig.

Następnie, somatyczna rekombinacja zachodzi w locus łańcucha lekkiego (κ lub λ) i przebiega według podobnego schematu jak rekombinacja locus łańcucha H. Jeden z segmentów V jest przyłączany do jednego z segmentów J ; pierwotny transkrypt zawiera intron dzielący VJ od C — intron ten ulega wycięciu w procesie składania mRNA. Lekki łańcuch wiąże się z uprzednio wytworzonym łańcuchem ciężkim w retikulum endoplazmatycznym i tam tworzy się błonowa forma IgM, transportowana następnie na powierzchnię błony.

Synteza łańcucha μ pociąga za sobą dodatkowy skutek — otóż hamuje ona przegrupowania DNA w siostrzanym chromosomie, powodując tzw. wyłączenie alleliczne (ang. allelic exclusion). Geny łańcucha ciężkiego chromosomu siostrzanego ulegną przegrupowaniu tylko wtedy, jeśli rekombinacja w pierwszym chromosomie nie da funkcjonalnego peptydu (co może być spowodowane delecją, mutacją lub przesunięciem ramki odczytu w procesie rekombinacji). Tak więc, w danej komórce B tylko jeden allel genu łańcucha ciężkiego ulega przegrupowaniu i ekspresji. U myszy transgenicznych, u których przegrupowany gen μ jest wyrażany jako transgen, większość komórek B zawiera ten gen i produkuje zakodowane w nim białko oraz nie przegrupowuje endogennych loci ciężkich łańcuchów. Ten efekt wywołuje tylko forma membranowa μ — forma wydzielana nie hamuje somatycznej rekombinacji. Mechanizm supresji nie jest jednak poznany.

Produkcja peptydu μ ma także inny efekt — otóż stymuluje rekombinację w genie łańcucha lekkiego. Przegrupowanie następuje najpierw w locus κ — jeśli jest ono produktywne, tzn. wytwarza się łańcuch κ , to rekombinacja locus λ jest zahamowana. Locus λ ulega przegrupowaniu tylko wtedy, jeśli oba rodzicielskie allele κ są nieproduktywne. I, jak w przypadku łańcucha ciężkiego, produkcja łańcucha lekkiego blokuje rekombinację w allelicznym genie. Efekt zbiorczy jest taki, że dany limfocyt B produkuje łańcuch albo L_{κ} , albo L_{λ} i tylko pochodzący z jednego allelu. Około 5% Ig mysich i ok 50% ludzkich ma łańcuch L_{λ} . Zjawisko wyłączenia allelicznego powoduje, że określona komórka B wytwarza tylko jeden rodzaj cząsteczek Ig, z jednym rodzajem łańcucha L i H, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia mechanizmu selekcji klonalnej.

Przegrupowanie genów Ig, polegające na wycinaniu odpowiednich odcinków DNA pomiędzy segmentami genów i łączeniu tych segmentów, zachodzi

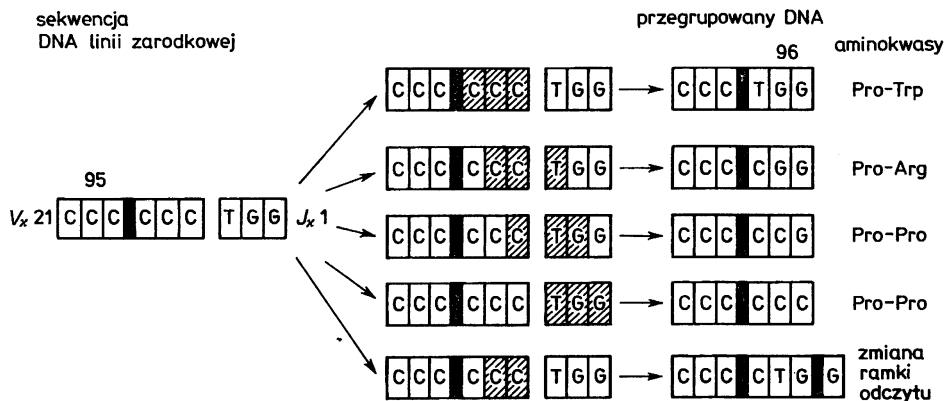


Rys. 11.20. Sekwencje rozpoznawane przez rekombinazy w procesie somatycznej rekombinacji genów Ig. Konserwatywne sekwencje heptamerów i nonamerów sąsiadują z egzonami *V* i *J* (w loci κ i λ) oraz z *V*, *D* i *J* (w locus łańcucha H) i zbliżają egzony. Niekodujący DNA tworzy pętlę i ulega wycięciu. 12 i 23 oznaczają niekonserwatywne sekwencje rozdzielające hepta- i nonamer. Rekombinacja zawsze zachodzi między DNA z 12-nukleotydowym rejonem a DNA z 23-nukleotydowym rejonem — to zapewnia łączenie się różnych egzonów (np. *V* z *J*), a nie tych samych (np. *V* z *V*) (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.).

dzięki systemowi enzymów określanych jako rekombinazy. Rekombinazy są komórkowo specyficzne — ich aktywność występuje jedynie w limfocytach, we wczesnym stadium rozwoju komórek B. Sądzi się, że rozpoznają one specyficzne sekwencje znajdujące się w pozycji 3' wobec każdego egzonu *V* i w pozycji 5' wobec każdego segmentu *J* oraz po obu stronach segmentów *D* (rys. 11.20). Te rozpoznawane rejony są złożone z silnie konserwowanych sekwencji 7- lub 9-nukleotydowych, oddzielonych zmienną sekwencją o długości 12 lub 23 nukleotydów (oddzielone więc jednym lub dwoma obrotami heliksu DNA). Heptamery i nonamery rozpoznają komplementarne sekwencje, dzięki czemu egzony znajdują się blisko siebie w dogodnej pozycji dla rekombinaz, które dokonują wycięcia pętli DNA i połączenia egzonów. Elementy systemu rekombinaz są bardzo słabo poznane. W komórkach zidentyfikowano geny *RAG1* i *RAG2*, odpowiedzialne za stymulację rekombinacji. Aberracje w funkcjonowaniu rekombinaz prowadzą do nie wytwarzania Ig oraz receptorów komórek T — uważa się, że tego rodzaju defekt genetyczny jest podłożem syndromu SCID (ang. severe combined immunodeficiency) u myszy. Syndrom ten charakteryzuje się prawie całkowitym brakiem dojrzałych limfocytów B i T.

Łączenie się egzonów jest procesem nieprecyzyjnym, co dodatkowo zwiększa różnorodność Ig. Otóż okazało się, że w Ig kodowanych przez ten sam zestaw egzonów *V*, *D* i *J* mogą istnieć różnice w sekwencji aminokwasów na złączach segmentów. Dzieje się tak dlatego, że rekombinacja na końcach segmentów może zachodzić w różnych miejscach, z dokładnością do kilku nukleotydów (rys. 11.21).

Nieprecyzyjna rekombinacja może też prowadzić do wytworzenia niefunkcjonalnego genu przez zmianę ramki odczytu (rys. 11.21) — jest to cena płacona



Rys. 11.21. Tworzenie różnic w strukturze Ig przez nieprecyzyjne łączenie segmentów w procesie somatycznej rekombinacji. W czasie łączenia egzonów *V* i *J* delecje ulegają różne nukleotydy (zakreskowane), co prowadzi do zróżnicowanej sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej, może też nastąpić zmiana ramki odczytu i brak syntezy funkcjonalnego łańcucha. Liczby 95 i 96 oznaczają kolejne aminokwasu kodowane przez gen *V* (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

za zwiększenie różnorodności Ig. W takiej sytuacji rekombinacji ulega drugi allel genu, a jeśli i tu powstanie niefunkcjonalny produkt, to limfocyt prawdopodobnie ginie.

Następnym mechanizmem zwiększającym różnorodność Ig w miejscu połączenia segmentów jest zróżnicowanie rejonu *N* (ang. *N* region diversification). Jest to zjawisko polegające na tym, że sekwencje kilkunukleotydowe (określane jako rejon *N*), nie zakodowane w DNA, mogą być dodawane na złączach rejonów *VDJ*. Dodawanie nukleotydów jest przypadkowe i katalizowane przez terminalną transferazę deoksyrybonukleotydową — polimerazę DNA nie wymagającą matrycy. Tak więc, kompletny rejon zmienny łańcucha H będzie się składał z: V_HNDNJ_H . I tu znowu napotykamy niebezpieczeństwo zmiany ramki odczytu, więc i utworzenie niefunkcjonalnego genu. W sekwencji *NDN* może też powstać kodon terminatorowy w ramce odczytu. Ta możliwość jest zmniejszona przez brak kodonów stop we wszystkich ramkach odczytu większości rejonów *D*. Różnorodność Ig wytwarzana przez jednostkę *NDN* jest ogromna, ze względu na przypadkowość sekwencji *N* i możliwość odczytania *D* w dowolnej ramce odczytu (mimo tej możliwości, w badanych Ig jedna z ramek odczytu była preferowana). Znalezione dotychczas segmenty *NDN* miały długość do 30 nukleotydów, jest to więc rejon mogący kodować aż do 10 aminokwasów.

Cząsteczka Ig ma, jak wiemy, trzy rejonu *CDR*, czyli nadzmiennie. Różnorodność biblioteki egzonów *V* odpowiada za różnorodność wszystkich *CDR*. Omawiana tutaj różnorodność, wytwarzana na złączach *VJ* i *VDJ*, dodatkowo przyczynia się do różnicowania rejonu *CDR3* — tak więc różnorodność rejonu *CDR3* tworzy się również w procesie somatycznym, w komórkach osobnika, a nie tylko w procesie ewolucyjnym, który wytworzył zróżnicowanie biblioteki *V*.

Wiele razy podkreślana była możliwość wytworzenia ogromnej różnorodności przeciwciał — olbrzymiego repertuaru Ig przez jeden organizm. Podsumujmy więc genetyczne mechanizmy prowadzące do wytworzenia tego repertuaru — zebrane one zostały w tabeli 11.2.

Tabela 11.2. Mechanizmy przyczyniające się do różnicowania przeciwciał u myszy

	H	κ	λ
Geny linii zarodkowej			
segmenty <i>V</i>	250–1000	250	2
segmenty <i>J</i>	4	4	3
segmenty <i>D</i>	12	0	0
Przypadkowe łączenie			
$V \times J (\times D)$	10 000–40 000	1000	6
Połączenie łańcuchów			
$H \times \kappa$		$1-4 \times 10^7$	
$H \times \lambda$		$5-10 \times 10^4$	
Potencjalny repertuar ze zmiennością na złączach		10^9-10^{11}	

* Liczby segmentów są przybliżone. Mysz jest wyjątkowym gatunkiem ze względu na niską liczbę genów V_H i niewielkie zróżnicowanie Ig z łańcuchami L_H . Poza tym, inne gatunki ssaków (w tym człowiek) są zasadniczo podobne.

Przede wszystkim lekkie i ciężkie łańcuchy są kodowane przez wiele genów V , J i D (D tylko w przypadku łańcuchów H). Wyjątkiem są lekkie łańcuchy L_λ u myszy, ponieważ locus λ zawiera tylko dwa funkcjonalne geny V . Somatyczna rekombinacja DNA Ig, prowadząca do wytworzenia różnych kombinacji segmentów V , J i D , może potencjalnie prowadzić do uzyskania liczby $V \times J \times D$ łańcuchów ciężkich (czyli u myszy $1 \times 10^4 - 4 \times 10^4$) oraz liczby równej $V \times J$ łańcuchów lekkich (czyli dla łańcuchów L_κ u myszy ok. 1×10^3). Następnie, różnorodność powstająca na złączach $V-J$ oraz $V-D-J$ w wyniku nieprecyzyjnej rekombinacji zwiększa liczbę prawdopodobnych łańcuchów, zarówno L, jak i H, co najmniej 10-krotnie. Do tego dochodzi wzrost zróżnicowania przez dodanie na złączach rejonów N , co w przypadku łańcuchów ciężkich zwiększy liczbę możliwości co najmniej 100-krotnie. Bez uwzględniania różnorodności na złączach, zakładając dowolne połączenie łańcuchów H i L_κ (L_λ stanowią u myszy zaledwie ok. 5%, więc pomijamy je w obliczeniach), uzyskujemy $1-4 \times 10^4 \times 10^3 = 1-4 \times 10^7$ możliwości. Wnosząc poprawkę z tytułu nieprecyzyjnej rekombinacji w obu łańcuchach uzyskujemy $1-4 \times 10^7 \times 10 \times 10 = 1-4 \times 10^9$. Uwzględniając rejon N w łańcuchu ciężkim uzyskujemy $1-4 \times 10^9 \times 100 = 1-4 \times 10^{11}$, czyli wartość ok. 10^{11} . Oczywiście, ocena ta jest przybliżona, ale wynika z niej niezbitcie olbrzymi potencjał repertuaru przeciwciał pojedynczego organizmu. Mysz wytwarza tylko ok. 10^8 limfocytów dziennie, więc może ona w ciągu całego swojego życia nie wyprodukować wszystkich możliwych Ig. Zdolność organizmu do reagowania na każdy patogen polega właśnie na istnieniu olbrzymiego repertuaru przeciwciał. Omawiana tu różnorodność dotyczy fazy rozwoju limfocytów B niezależnej od antygeny.

Ogromne zróżnicowanie populacji dziewiczych limfocytów B osiągnana jest dodatkowo dzięki temu, że macierzyste komórki limfocytów B, w trakcie dojrzewania związanego z rekombinacją DNA Ig, ulegają podziałom. We wczesnych fazach rozwoju komórki te dzielą się co ok. 12 h. Tak więc komórka, w której już nastąpiła rekombinacja rejonu DJ_H , może dać potomstwo, które dokona swoich własnych, różnych połączeń $V_H DJ_H$. Potomstwo każdej komórki z określonym rejonem $V_H DJ_H$ może dokonać niezależnych połączeń $V_\kappa J_\kappa$. Dojrzały dziewiczy limfocyt B, zawierający powierzchniowe przeciwciała, przestaje się dzielić, opuszcza szpik kostny i krąży w układzie krwionośnym oraz limfatycznym. Teoretycznie więc, każda komórka opuszczająca szpik kostny może być unikatowa. W rzeczywistości, wydaje się, że pewne przegrupowania genetyczne są faworyzowane, co ilustruje fakt, że różne osobniki myszy z tej samej linii chowu wsobnego, w odpowiedzi na określony hapten, produkują praktycznie identyczne przeciwciała. Dojrzałe komórki B są gotowe do związania najróżniejszych determinant antygenowych.

Związanie antygeny powoduje stymulację komórki B, prowadzącą m.in. do jeszcze większego zróżnicowania repertuaru Ig. Dzieje się to na skutek somatycznych mutacji zachodzących przede wszystkim w rejonach V obu przegrupowanych łańcuchów — proces ten zostanie omówiony w dalszej części rozdziału.

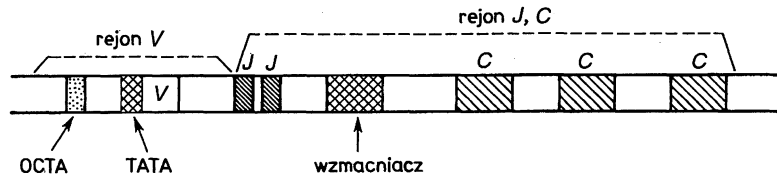
11.14. Regulacja transkrypcji genów immunoglobulin

Transkrypcja genów immunoglobulin jest interesującym zagadnieniem ze względu na to, że zachodzi ona wyłącznie w jednym rodzaju komórek — w linii komórek B. Geny Ig, podobnie jak większość genów eukariotycznych, są regulowane przez sekwencje promotorów i wzmacniaczy (enhancerów).

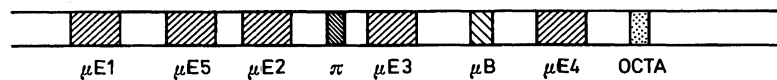
Promotory Ig zawierają klasyczne sekwencje TATA w pozycji 5' wobec każdego z segmentów *V*. Większość genów Ig zawiera konserwatywny oktamer ATGCAAAT (obecny także w innych genach), stymulujący wybiórczo transkrypcję w komórkach limfoidalnych i uważany za miejsce wiążące białka regulatorowe (rys. 11.22). Z ekstraktów jądrowych ssaków wyizolowano 3 białka wiążące się *in vitro* z rejonem oktameru. Jedno z nich (Oct1) występuje we wszystkich komórkach, dwa pozostałe Oct2 (OTF2A) i OTF2B są specyficzne dla limfocytów. Wykazano, że Oct2 syntetyzowane w nielimfoidalnych komórkach (w wyniku manipulacji genetycznych) stymuluje transkrypcję genów reporterowych, które mają rejon promotorowy Ig zawierający oktamer.

Wzmacniacze są także elementami specyficzności tkankowej — funkcjonują tylko w linii komórek B. Wzmacniacz zlokalizowany jest między elementami *V* a egzonomi rejonu *C*. Ta lokalizacja zapewnia, że rejon *V* w nie prze-

(a) usytuowanie promotora i wzmacniacza w genie Ig



(b) rejon wzmacniacza łańcucha ciężkiego (H)



(c) rejon wzmacniacza łańcucha lekkiego α (L_α)



Rys. 11.22. Elementy regulujące transkrypcję genów Ig. Elementy o długości 6–12 nukleotydów wiążą specyficzne białka. Typowe dla promotora są motywy: OCTA i TATA. Wzmacniacze genów kodujących łańcuch H i L_α zawierają wiele różnych motywów. S oznacza rejon silencera (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)

grupowanym genie nie są pod jego wpływem, natomiast po przegrupowaniu wszystkie elementy są pod wpływem tego samego wzmacniacza. Wzmacniacz genu kodującego łańcuch L_{κ} u myszy zawiera 10-nukleotydową sekwencję, która wiąże białko NF- κ B — sekwencja taka występuje również w innych genach, m.in. w genie interleukiny 2. Czynniki NF- κ B jest nieaktywny w komórkach pre-B, w których nie ma jeszcze transkrypcji genów κ . Przypuszcza się, że NF- κ B w takich komórkach występuje w cytoplazmie i jest związany z inhibitorem. Sądzi się, że aktywacja białkowej kinazy C powoduje fosforylację inhibitora, który odłącza się, a NF- κ B wędruje do jądra i wiąże się z rejonem enhancera, stymulując transkrypcję κ . Stwierdzono, że w komórkach szpiczaka, aktywnie produkujących łańcuch κ , nie ma aktywności czynnika NF- κ B — sugeruje to, że czynnik ten może być niezbędny tylko we wczesnym etapie rozwoju komórek B, przy inicjacji transkrypcji κ , natomiast nie jest konieczny do podtrzymywania transkrypcji. Miejsce κ B jest pozytywnym regulatorem, a elementy E są rejonami wspomagającymi. Wewnątrz wzmacniacza κ znajduje się motyw „silencera” — prawdopodobnie zapobiega on działaniu wzmacniacza w komórkach innych niż komórki B.

Wzmacniacz genu kodującego łańcuch H zawiera wiele motywów wiążących różne białka, m.in. rejon OCTA, taki jak w rejonie promotora. Motywy π i μ B są głównie odpowiedzialne za komórkowo specyficzne działanie enhancera. Do motywów E przyłączają się dimery białka o domenie wiążącej się z DNA typu heliks–pętla–heliks.

Wiedza dotycząca regulacji genów Ig jest bardzo fragmentaryczna, niewątpliwie jednak, ze względu na bardzo intensywne badania prowadzone w tej dziedzinie, najbliższa przyszłość przyniesie wiele nowych informacji.

11.15. Limfocyty T mają receptory TCR

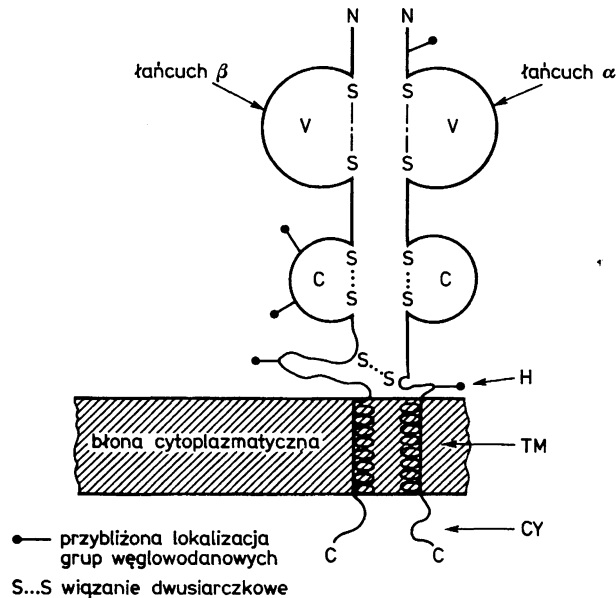
Omówienie limfocytów T jest istotne przed dalszymi rozważaniami dotyczącymi dojrzewania limfocytów B, konkretnie dotyczącymi tej części procesu dojrzewania, która jest zależna od obecności antygeny. Jest to spowodowane faktem, że do powstania dojrzałego limfocytu B, który wydziela przeciwciała, konieczne jest współdziałanie limfocytów B i T.

Limfocyty T mają zdolność rozpoznawania określonego antygeny dzięki obecności na powierzchni komórki białkowych receptorów TCR (ang. T-cell receptor), które wykazują znaczne podobieństwo do przeciwciał. Receptory TCR różnią się jednak od przeciwciał w wielu aspektach, przede wszystkim tym, że występują jedynie w formie związanej z błoną komórkową, podczas gdy przeciwciała mogą być albo związane z błoną, albo mogą być wydzielane przez limfocyty na zewnątrz. Reakcja wiązania antygeny przez TCR różni się także od reakcji antygen–przeciwciało: mianowicie, antygen musi znajdować się na powierzchni komórki, w kompleksie ze specyficznymi białkami, czyli musi być

specjalnie „zaprezentowany”. Stąd wynika, że oddziaływania między receptorem TCR a antygenem są zawsze oddziaływaniami między komórkami: komórką prezentującą antygen i limfocytym T.

Jak wynika z poprzednich rozważań, istnieją dwa zasadnicze typy komórek T: komórki pomocnicze (T_H) oraz komórki cytotoliczne (T_C). Dojrzałe komórki T_H i T_C mają na swojej powierzchni receptory TCR należące do tej samej rodziny białek, które są kodowane przez tę samą rodzinę genów (o przynależności do grupy limfocytów T_H lub T_C decydują receptory CD4 i CD8, nie TCR).

Większość TCR zbudowana jest z dwu łańcuchów polipeptydowych, α i β , o masie 40–50 kDa, z których każdy zawiera rejon zmienny (V) oraz stały (C). Łańcuchy te połączone są mostkami dwusiarczkowymi i wiązaniami niekowalencyjnymi; typowy receptor jest glikoproteiną o masie ok. 80–90 kDa, zbudowaną, jak przeciwciało, z domen mających strukturę motywu immunoglobulinowego (rys. 11.23).



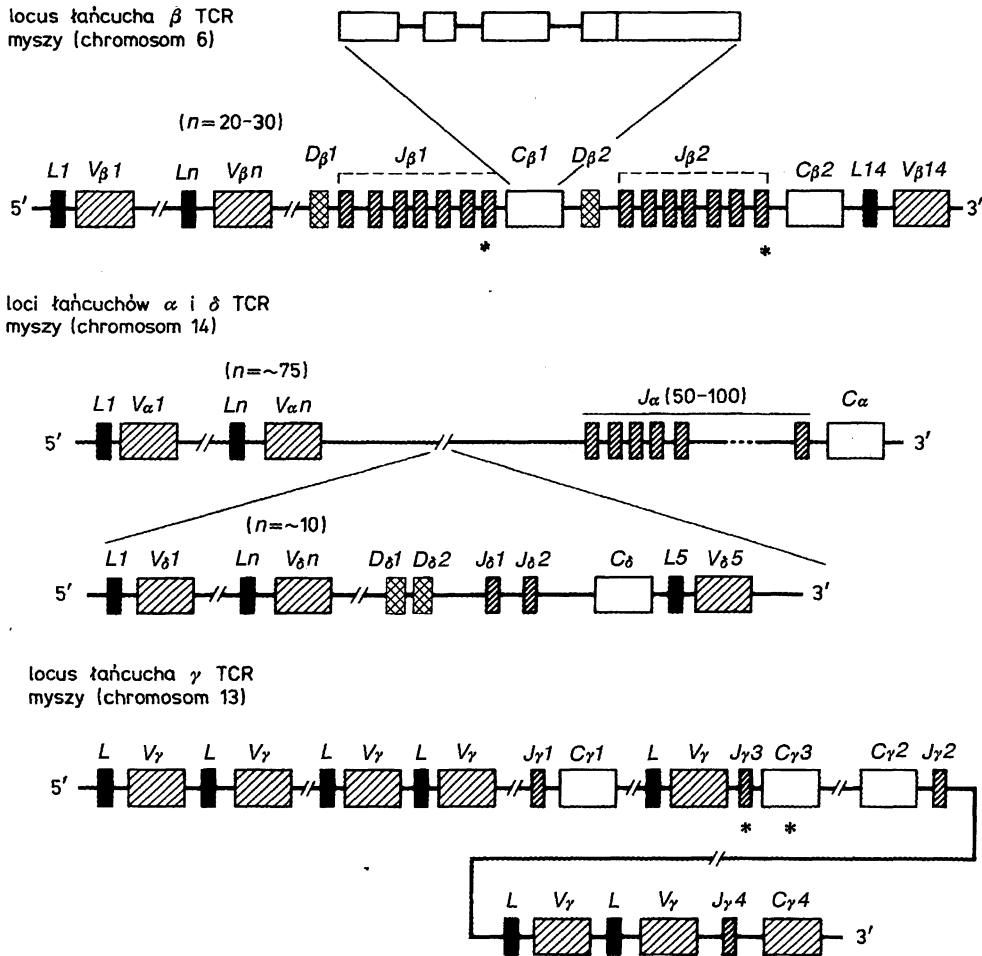
Rys. 11.23. Schemat budowy receptora komórki T (TCR). V i C — odpowiednio zmienne i stałe domeny łańcuchów α i β ; N i C — koniec aminowy i karboksylowy polipeptydów; TM — hydrofobowy odcinek kotwiczący TCR w błonie komórkowej; CY — rejon cytoplazmatyczny oraz H — rejon zawiasu (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

Odcinek kotwiczący TCR w błonie składa się z 20–24 aminokwasów, głównie hydrofobowych, zawiera także aminokwasy naładowane dodatnio (reszty lizyny i arginy), które być może uczestniczą w interakcjach z ujemnie

naładowanymi resztami znajdującymi się w transmembranowych partiach polipeptydów CD3.

Niewielka część limfocytów T ma TCR zbudowane z dwu innych łańcuchów, nazwanych γ i δ , przy czym aminokwasowa sekwencja łańcuchów γ przypomina sekwencję łańcuchów β , a łańcuchy δ przypominają łańcuchy α . Tak jak i w przypadku dimerów $\alpha\beta$, większość informacji dotyczących struktury dimerów $\gamma\delta$ została przewidziana na podstawie struktury sklonowanych genów. Bardzo niewiele wiadomo na temat funkcji receptorów $\gamma\delta$.

Geny kodujące TCR mają organizację podobną do organizacji genów immunoglobulin, podobna jest także relacja między egzonami genów a dome-



Rys. 11.24. Organizacja genów TCR w linii zarodkowej myszy. Rozmiary egzonów i intronów nie są narysowane w skali. Wszystkie elementy C są w rzeczywistości zbudowane z wielu egzonów, co pokazano tylko dla genu C β 1. Interesujący jest fakt lokalizacji genów δ wewnątrz locus łańcucha α . * oznacza niefunkcjonalne pseudogeny (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

nami polipeptydów. Funkcjonalne geny TCR, czyli geny zdolne do ekspresji polipeptydów, powstają w wyniku somatycznych przegrupowań genów linii zarodkowych, podobnie jak geny Ig. Organizacja genów TCR jest zasadniczo podobna u zbadanych dotychczas gatunków. Istnieją biblioteki rejonów V , D , i J , których elementy ulegają połączeniu i tworzą geny receptorów (rys. 11.24).

Biblioteki segmentów genów łańcuchów α , β i γ człowieka zlokalizowane są, odpowiednio, na chromosomie 14, 7q i 7p. Nie stwierdzono występowania rejonów D w loci łańcuchów α oraz γ . W locus łańcucha γ występuje wiele segmentów C_γ , różniących się sekwencją, długością i liczbą egzonów kodujących rejon zawiasu w polipeptydzie. Efektem tego jest występowanie różnych łańcuchów γ w poszczególnych komórkach. Na uwagę zasługuje fakt zlokalizowania locus łańcucha δ wewnątrz locus łańcucha α , między V_α a zgrupowaniami JC_α .

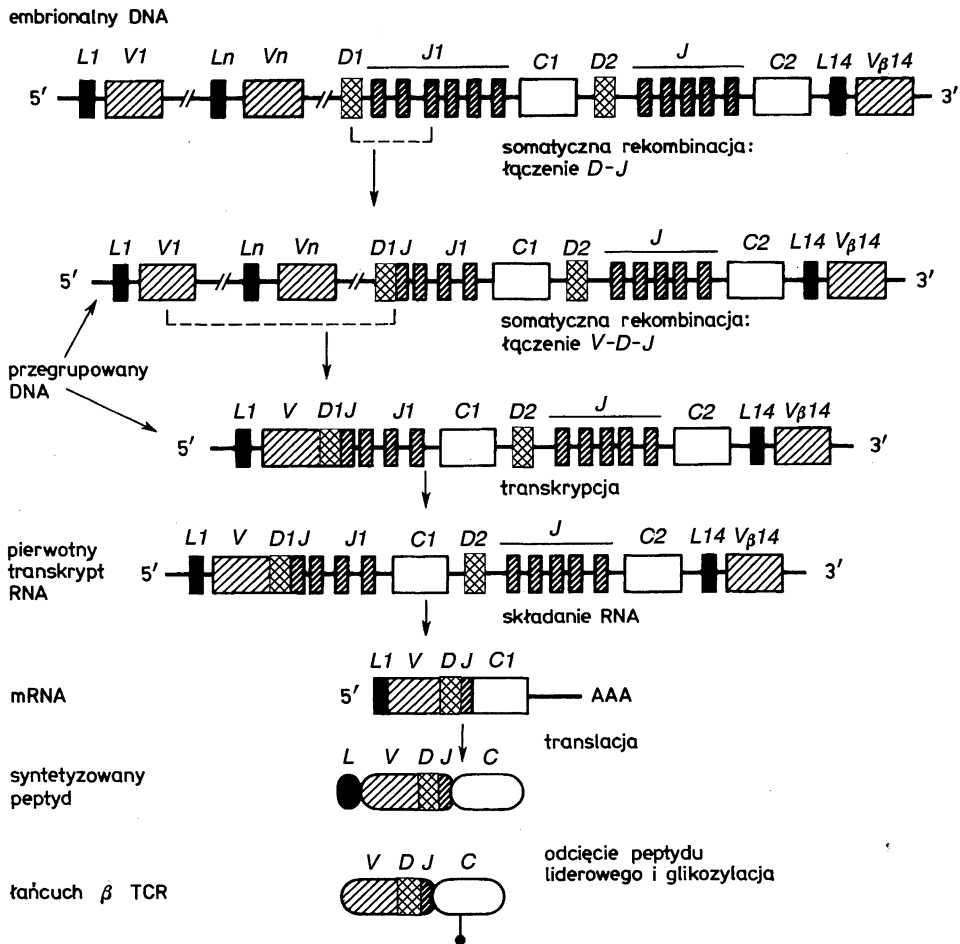
Proces przegrupowań somatycznych, zmierzający do wytworzenia funkcjonalnych genów TCR, w których segmenty V , D , J i C znajdują się blisko siebie, jest zasadniczo podobny do przegrupowań genów Ig (rys. 11.25).

Inaczej niż w łączeniu genów immunoglobulin, w przegrupowaniu łańcuchów β może zachodzić albo łączenie D i J , po czym V łączy się z DJ , albo V łączy się bezpośrednio z J (wtedy łańcuch β nie ma elementu D). Łączenie segmentów, z udziałem rekombinaz, jest sterowane, tak jak i w przypadku genów Ig, przez sekwencje heptamerów i nonamerów. Na podobieństwo mechanizmów rekombinacji wskazuje m.in. fakt, że geny TCR z linii zarodkowej, po transfekcji do niedojrzałych komórek B, ulegały efektywnemu przegrupowaniu. Gen po rekombinacji jest transkrybowany, a pierwotny transkrypt ulega składaniu. Na tym etapie dokonywany jest wybór jednego z dwu genów C_β . Sądzi się, że wybór C_β jest przypadkowy i że nigdy nie dochodzi w jednej komórce T do uruchomienia ekspresji drugiego genu. Jako pierwszy ulega przegrupowaniu locus β — funkcjonalne przegrupowanie i, przypuszczalnie, ekspresja locus β stymuluje przegrupowanie locus α .

W danej komórce T tylko jeden z dwu alleli α i β ulega funkcjonalnemu przegrupowaniu i ekspresji — mamy tu, tak jak w przypadku Ig, do czynienia z wyłączeniem allelicznym. Dzięki temu, dana komórka T ma tylko jeden rodzaj receptorów TCR, co jest bardzo istotne w selekcji odpowiednich klonów komórek T w odpowiedzi immunologicznej.

Różnorodność receptorów T, podobnie jak immunoglobulin, jest wynikiem działania mechanizmów podobnych do tych, które decydują o różnorodności Ig. Mechanizmy te są następujące:

- (a) duża ilość segmentów V , D , J ;
- (b) losowe łączenie różnych segmentów V , D , J ;
- (c) zmienność na złączach (tu zalicza się: zmienność rejonu N , wynikającą z przypadkowego dodawania nukleotydów na złączach; nieprecyzyjność wiązania V z J oraz J z D oraz fakt, że wiele segmentów D może ulegać translacji we wszystkich trzech ramkach odczytu — to ostatnie bardzo rzadko zdarza się w Ig);



Rys. 11.25. Kolejność wydarzeń prowadzących do syntezy łańcucha β receptora TCR myszy. DNA ulega rekombinacji oraz transkrypcji; pierwotny transkrypt jest składany, następnie zachodzi translacja i modyfikacja (odcięcie peptydu liderowego, glikozylacja) łańcucha polipeptydowego. W podanym przykładzie rejon *V* jest kodowany przez egzony *V1*, *D1* i trzeci egzon zgrupowania *J1*; rejon *C* jest kodowany przez *C1*. Każdy gen *C* składa się z wielu egzonów, co nie zostało uwidocznione na rysunku. Nie wykorzystane segmenty *V* i *J*, zlokalizowane między przegrupowanymi genami *V* i *J*, ulegają delecji. W podanym przypadku najpierw dochodzi do połączenia *DJ*, a następnie *V* łączy się z *DJ*. W przypadku łańcuchów β TCR możliwe jest także bezpośrednie łączenie *V-J* (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.).

(d) łączenie łańcuchów w dimery pomnażające różnorodność wytworzoną dla każdego łańcucha osobno. Mechanizmy są podobne, udział ich jest jednak niejednakowy w zwiększaniu różnorodności TCR i Ig (tab. 11.3). Generalnie rzecz biorąc, w przypadku TCR większą rolę odgrywa zmienność na złączach i, mimo mniejszej liczby genów *V* TCR niż *V* Ig, ocenia się, że liczba możliwych

Tabela 11.3. Mechanizmy wytwarzania różnorodności genów receptorów komórek T (TCR) oraz immunoglobulin (Ig)

Mechanizm	Ig		TCR $\alpha\beta$		TCR $\gamma\delta$	
	łańcuch ciężki	κ	α	β	γ	δ
Zmienne segmenty (<i>V</i>)	250–1000	250	75	25	7	10
Segmenty różnicujące (<i>D</i>)	12	0	0	2	0	2
Czytanie <i>D</i> w 3 RO	rzadko	–	–	często	–	często
Zmienność rejonu <i>N</i>	<i>V-D, D-J</i>	brak	<i>V-J</i>	<i>V-D, D-J</i>	<i>V-J</i>	<i>V-D1, D1-D2, D1-J</i>
Segmenty łączące (<i>J</i>)	4	4	5	12	2	2
Liczba kombinacji segmentów zmiennych	62500–250000			1875		70
Potencjalna liczba możliwych wersji	$\sim 10^{11}$			$\sim 10^{16}$		$\sim 10^{18}$

Mechanizmy prowadzące do zmienności TCR i Ig zostały omówione w tekście. Loci TCR mają mniej segmentów *V* niż loci Ig, lecz większą potencjalnie możliwość różnicowania w łączeniu segmentów. W tabeli nie uwzględniono mutacji somatycznych, zachodzących w genach Ig, lecz nie w genach TCR. RO — ramka odczytu.

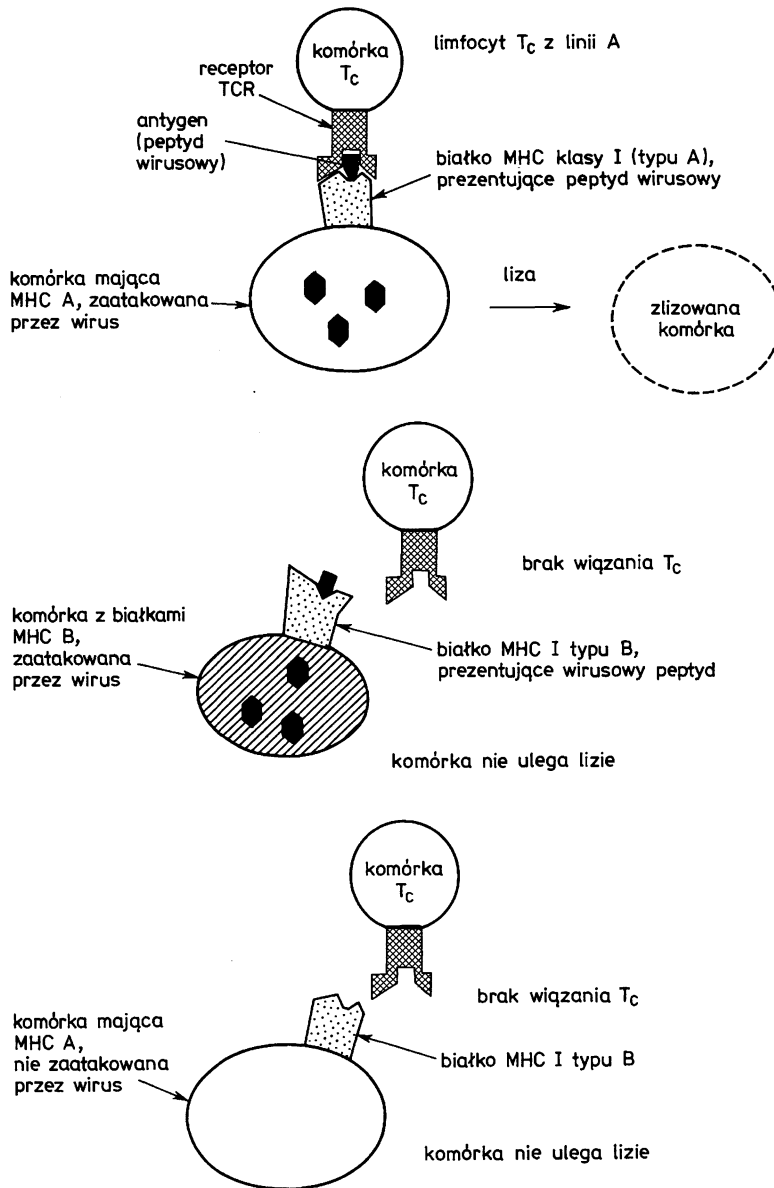
TCR jest większa niż Ig — o około 10^{16} dla TCR $\alpha\beta$ (tab. 11.3). Niewielka liczba segmentów *V* genów γ i δ sugeruje ograniczoną zmienność receptorów $\gamma\delta$. Jednakże istnieje tu ogromna zmienność zachodząca przy łączeniu, wynikająca głównie z wyjątkowego faktu, że w jednym genie δ może dojść do włączenia albo jednego, albo obu segmentów *D*.

Inaczej niż w przypadku genów Ig, geny TCR raz przegrupowane nie ulegają dalszym przemianom. Nie ma tu zjawiska przełączania izotypów, nie stwierdzono też somatycznych mutacji w genach TCR. W efekcie, nie ma zmiany powinowactwa TCR do antygeny w czasie odpowiedzi immunologicznej. Ma to głęboki sens biologiczny, co zostanie wyjaśnione przy okazji omawiania selekcji limfocytów T w grasicy.

11.16. Receptory komórek T wiążą antygeny prezentowane na powierzchni komórki

Receptory komórek T, podobnie jak przeciwciała, rozpoznają obce antygeny, jednocześnie wykazując tolerancję wobec antygenów własnych. Istnieje jednak fundamentalna różnica w mechanizmie rozpoznawania antygeny przez receptory komórek T (TCR) i przez przeciwciała.

W przypadku TCR obcy antygen musi być zaprezentowany komórce T jako kompleks ze specyficznym białkiem własnym. Komórka T „widzi” antygen jedynie wtedy, gdy jest on powiązany z określonym typem białek



Rys. 11.26. Mechanizm restrykcji cytotoxicznej aktywności limfocytów T_C przez białka MHC klasy I. Limfocyty cytotoxiczne T_C pochodzą ze zwierząt linii A, zakażonych wirusem. Te limfocyty spowodują śmierć własnych komórek, zainfekowanych wirusem. Niosą one na powierzchni kompleks zawierający peptyd pochodzenia wirusowego oraz białko MHC I z linii genetycznej własnej, czyli A. Limfocyty nie spowodują lizy komórek obcych, zainfekowanych, lecz niosących na swojej powierzchni inne białko MHC I — białko linii genetycznej B. TCR do rozpoznania komórki — „ofiary” i związania się z nią wymagają jednocześnie obecności antygeny obcego i własnego białka MHC. Z tego względu limfocyty T_C nie zniszczą zainfekowanych komórek obcych, niosących MHC typu B, ani nie zainfekowanych komórek własnych, które mają odpowiednie białko MHC, lecz pozbawione są wirusowego antygeny (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)

powierzchniowych komórki gospodarza. Zasada ta odnosi się do obu typów limfocytów T, zarówno pomocniczych (T_H), jak i do cytotoxicznych (T_C). Decydujący eksperyment prowadzący do wykrycia tego zjawiska wykonano w roku 1974, badając lizę komórek zainfekowanych wirusem, powodowaną przez limfocyty T. Myszy pochodzące z chowu wsobnego zainfekowano wirusem, następnie wyizolowano limfocyty T i badano *in vitro* ich zdolność do lizowania komórek fibroblastów mysich, zainfekowanych uprzednio tym samym wirusem. Kiedy fibroblasty pochodziły z tej samej myszy, limfocyty T_C rozpoznawały je i zabijały. Ku zdziwieniu badaczy okazało się, że limfocyty T_C nie uszkadzały fibroblastów zainfekowanych wirusem, lecz pochodzące z myszy z innej linii chowu wsobnego, czyli genetycznie różnych. Ponadto, limfocyty T_C nie lizowały obcych, nie zakażonych fibroblastów ani fibroblastów zakażonych innym wirusem. Widać stąd, że receptory limfocytów T_C rozpoznają jednocześnie i rodzaj komórki, i typ wirusa. Wymagają jednoczesnej obecności obcego antygeny i jakiegoś własnego białka. Okazało się, że tymi własnymi białkami powierzchniowymi są białka MHC, czyli białka głównego układu zgodności tkankowej. Białka MHC rozpoznawane przez limfocyty T_C należą do MHC klasy I (rys. 11.26).

Ponieważ białka MHC I występują na powierzchni wszystkich typów komórek, sądzi się, że limfocyty T_C są zdolne do wyeliminowania własnej komórki każdego typu, zaatakowanej przez wirus.

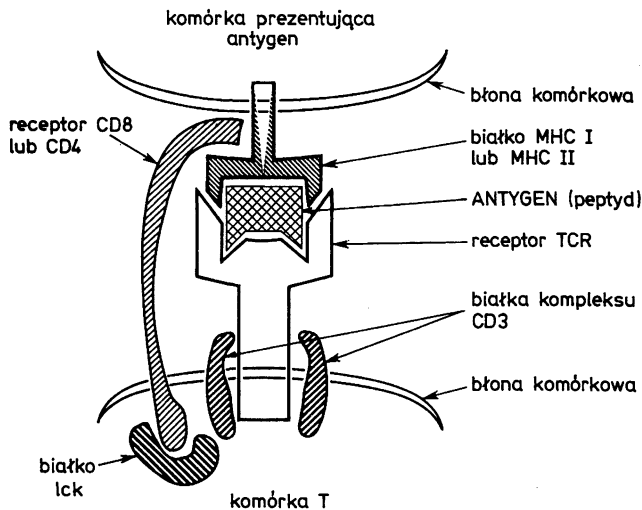
Zaktywowane przez związanie antygeny limfocyty T_C wydzielają białka, które polimeryzują i tworzą niespecyficzne kanały jonowe w błonie, co powoduje depolaryzację komórki, niszczy jej równowagę jonową i osmotyczną. Zaatakowana komórka najpierw pęcznieje, po czym ulega lizie. Dodatkowy mechanizm niszczenia polega na wydzielaniu przez zaktywowany limfocyt T_C białkowej toksyny (limfotoksyny LT lub podobnej), która aktywuje enzymy zaatakowanej komórki — enzymy te tną DNA, co w efekcie daje fragmentację jądra komórkowego. Jeden limfocyt T_C może zniszczyć wiele komórek.

Receptory limfocytów pomocniczych T_H również rozpoznają jedynie antygen obcy połączony z własnym białkiem MHC — w tym przypadku z białkiem MHC należącym do klasy II (rys. 11.8). Białka MHC II, inaczej niż MHC I, występują na powierzchni tylko niektórych komórek, głównie makrofagów i limfocytów B.

Restrykcja limfocytów T przez białka MHC zapewnia, że limfocyty będą działały jedynie na powierzchni docelowych komórek, a ich receptory (TCR) nie ulegną „zaklejeniu” przez antygeny rozpuszczone w płynach ustrojowych.

Jeżeli porównamy kompleksy receptorów komórek T_H i T_C z antygenami, to widzimy, że w obu przypadkach rzeczywistym antygenem rozpoznawanym przez TCR jest kompleks antygeny obcego z odpowiednim białkiem MHC, tzn. z MHC I w przypadku limfocytów T_C i z MHC II w przypadku limfocytów T_H . Obcy antygen nie jest całym białkiem, lecz jego fragmentem — peptydem powstającym w efekcie degradacji obcego białka. Aby antygen obcy mógł być rozpoznany przez TCR, białko musi ulec częściowej proteolizie, peptyd tworzy

bardzo trwały kompleks z białkiem MHC znajdującym się wewnątrz komórki, a następnie kompleks MHC–peptyd przemieszcza się na powierzchnię komórki i w ten sposób peptyd związany z MHC jest prezentowany receptorom limfocytów T (rys. 11.27).



Rys. 11.27. Wiązanie antygeny przez receptor limfocytu T (TCR). TCR wiąże się z antygenem prezentowanym przez białko MHC klasy I lub II na powierzchni komórki. Limfocyty T_H , mające receptory CD4, wiążą się z antygenem prezentowanym przez MHC II. Limfocyty T_C z receptorami CD8 wiążą się z antygenem prezentowanym przez MHC I. Kompleks białek CD3, ściśle związanych z TCR, bierze udział w przekazywaniu do wnętrza komórki sygnału o związaniu antygeny. W przekazywaniu sygnału uczestniczy m.in. kinaza tyrozynowa lck (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)

Istnieje zasadnicza różnica między kompleksami tworzonymi przez białka MHC I i MHC II z peptydami. Mianowicie, MHC I wiążą peptydy pochodzące z białek wytwarzanych wewnątrz komórki, a MHC II wiążą peptydy pochodzące z degradacji białek zewnątrzkomórkowych. Tak więc peptydy pochodzące z białek wirusowych, produkowanych w zaatakowanej przez wirus komórce, są prezentowane przez białka MHC I, podczas gdy makrofagi wchłaniają bakterie, trawią ich białka i prezentują na powierzchni w kompleksie z białkiem MHC II.

Limfocyty B także prezentują antygeny związane z MHC II. Limfocyty T_H rozpoznają peptydy w kompleksie z MHC II, ulegają aktywacji i stymulują limfocyty B do wydzielania przeciwciał.

Dlaczego limfocyty T_H wybierają kompleksy antygen–MHC II, a limfocyty T_C wybierają kompleksy antygen–MHC I prezentowane przez komórki? Jak wspomniano uprzednio, komórki T_H i T_C mają na swojej powierzchni odpowiednio receptory CD4 i CD8, które uczestniczą w wiązaniu przez TCR kompleksu antygen–MHC, przy czym CD4 wiążą się z kompleksem zawierającym MHC II, a CD8 wiążą się z kompleksem zawierającym MHC I (rys. 11.8.).

Limfocyty T rozpoznają inne formy antygenów niż limfocyty B i wydzielane immunoglobuliny. Otóż, limfocyty T rozpoznają tylko antygeny białkowe, podczas gdy limfocyty B mogą rozpoznawać specyficznie białka, kwasy nukleinowe, polisacharydy, lipidy i małe związki chemiczne. Ponadto, limfocyty B mogą rozpoznawać determinanty antygenowe z uwzględnieniem ich konformacji — czyli determinanty istniejące w białku o natywnej strukturze lub determinanty uwidaczniane przez proces denaturacji czy też proteolizy białek. Inaczej dzieje się w przypadku limfocytów T, które rozpoznają liniowe determinanty, zdefiniowane przez sekwencję aminokwasów.

11.17. Białka MHC uczestniczą w odrzucaniu przeszczepów

Białka i geny MHC zidentyfikowano po raz pierwszy nie w badaniach nad reakcją receptorów limfocytów T z prezentowanymi przez komórki antygenami, lecz w trakcie badań nad przeszczepianiem tkanek w latach 40. Od dawna wiadano, że jeśli przeszczepi się skórę lub narząd myszy pochodzącej z linii chowu wsobnego innemu osobnikowi z tej samej linii, czyli genetycznie identycznemu, przeszczep przyjmie się, natomiast jeśli biorcą będzie zwierzę z innej linii, genetycznie różne, przeszczep zostanie odrzucony. W eksperymentach zmierzających do ustalenia, które geny są odpowiedzialne za odrzucanie przeszczepów, zmniejszano stopniowo, przez krzyżowanie, różnice genetyczne między zwierzęciem dawcą a zwierzęciem biorcą, aż do uzyskania zwierząt różniących się tylko jednym rejonem genetycznym, tym właśnie, który powodował odrzucenie przeszczepu. W ten sposób zidentyfikowano kilka kompleksów genów przyczyniających się do odrzucania przeszczepów. Badania skoncentrowały się na tym kompleksie, który powodował szczególnie szybkie odrzucanie i któremu nadano nazwę głównego kompleksu zgodności tkankowej. Kompleks ten oznacza się skrótem MHC (ang. major histocompatibility complex). Kompleks ten składa się z wielu genów (rys. 11.28), z których część bierze udział w procesie odrzucania przeszczepów a część nie.

Co warunkuje zdolność białek MHC do odrzucania przeszczepów? Otóż okazało się, że geny, a co za tym idzie, białka MHC są w wysokim stopniu polimorficzne — tzn. w obrębie gatunku występuje bardzo wiele alleli genów MHC (praktycznie każdy osobnik w obrębie jednego gatunku ma geny lub białka MHC różne od MHC innego osobnika, z wyjątkiem zwierząt pochodzących z jednej linii chowu wsobnego oraz identycznych bliźniąt). Każdy osobnik ma dwa allele kompleksu MHC i oba ulegają ekspresji (nie zachodzi tutaj, jak przy ekspresji genów Ig lub TCR, wyłączenie alleliczne). Każdy osobnik ma więc tożsamość, zdefiniowaną przez własny zestaw białek MHC ulokowanych na powierzchni komórek. Limfocyty cytolityczne T_C odróżniają tkankę własną od cudzej, ponieważ ich receptory TCR mogą wiązać się z obcymi białkami MHC, a wykazują tolerancję wobec własnych MHC. Komórki T_C , wiążąc się z obcymi MHC na powierzchni obcych komórek,

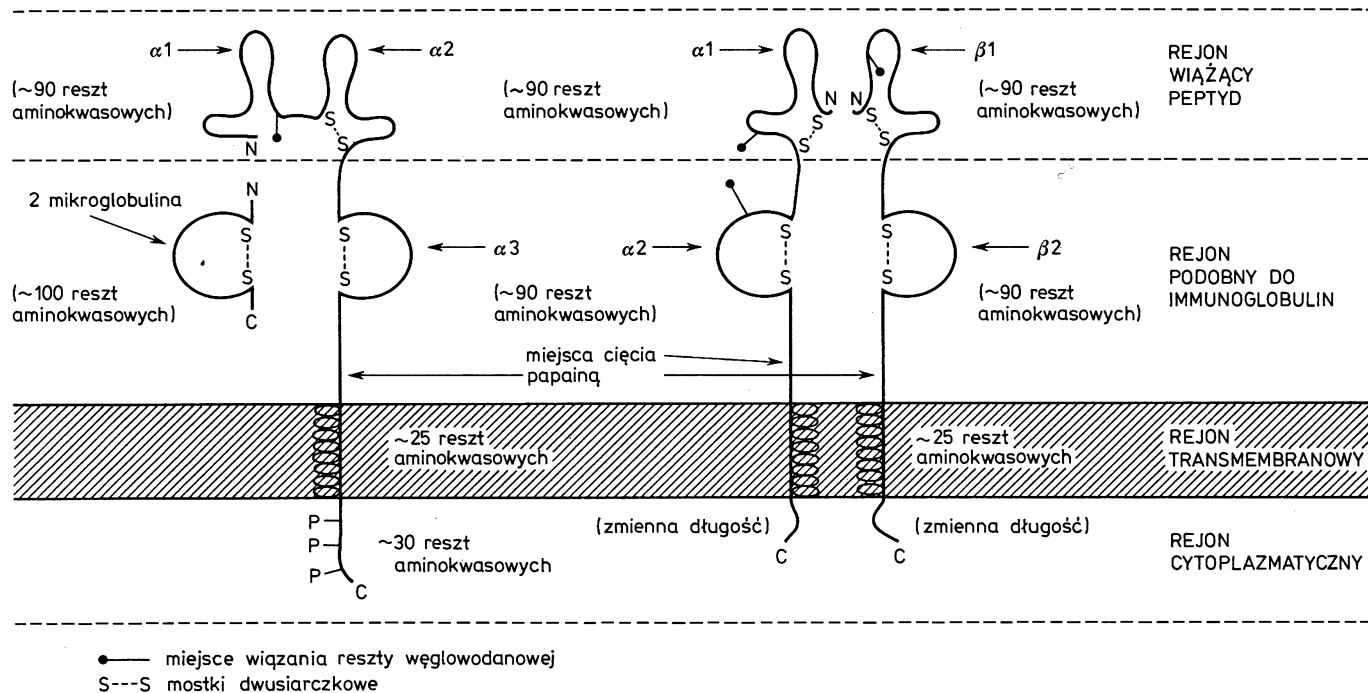
mianowicie, że myszy i świnki morskie z niektórych linii chowu wsobnego nie były w stanie wytworzyć przeciwciał przeciwko prostym polipeptydowym antygenom; okazało się, że ten defekt odpowiedzi immunologicznej spowodowany był przez geny mapujące się w rejonie MHC, którym nadano nazwę Ir (ang. immune response). Dalsze badania wykazały, że są to geny kodujące białka MHC klasy II. Jak już wspomniano poprzednio, są to białka występujące na powierzchni niektórych typów komórek, głównie limfocytów B oraz makrofagów i prezentujące antygen receptorom limfocytów T pomocniczych (T_H). Receptory TCR komórek T_H rozpoznają obcy antygen jedynie jako element kompleksu antygen-własne białko MHC II. Rozpoznanie obcego antygeny w kompleksie z białkiem MHC II jest warunkiem wypełnienia przez limfocyt T_H jego funkcji, tzn. wspomagania limfocytów B w produkcji przeciwciał (proces opisany w dalszej części rozdz.). Niektóre białka MHC II nie mogą wiązać pewnych antygenów lub wiążą je słabo i to może być przyczyną braku stymulacji limfocytów wspomagających. W rezultacie antygeny te nie powodują normalnej odpowiedzi immunologicznej — mamy wtedy do czynienia z fenotypem Ir⁻.

11.19. Białka MHC są polimorficzne i należą do superrodziny immunoglobulin

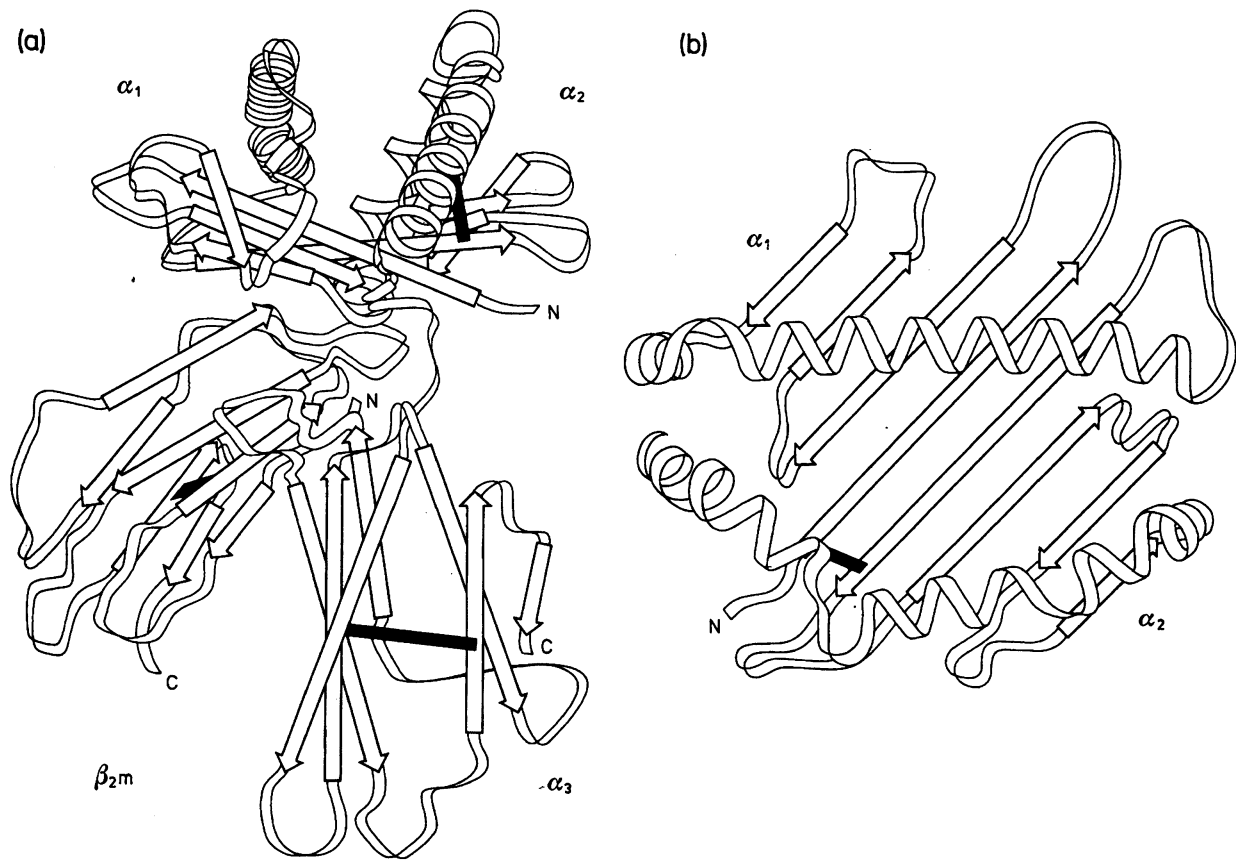
Stwierdzono, że wszystkie białka klasy MHC I są dimerami zbudowanymi z wysoce polimorficznego polipeptydu, łańcucha α (o masie ok. 44 kDa u człowieka) oraz ze stałego polipeptydu, tzw. β_2 -mikroglobuliny (ok. 12 kDa). Łańcuch α jest kodowany przez rejon MHC, natomiast locus mikroglobuliny znajduje się poza rejonem MHC. Na podstawie sekwencji aminokwasowej wielu cząsteczek MHC I i badań struktury krystalicznej kilku rodzajów MHC I, ustalono, że cząsteczki te składają się z czterech rejonów: amino-terminalnego, wiążącego peptydowy antygen; zewnątrzkomórkowego, o strukturze podobnej do struktury immunoglobulin; z części transmembranowej i części cytoplazmatycznej, C-terminalnej (rys. 11.29). Część wiążąca peptyd złożona jest z dwu homologicznych fragmentów ($\alpha 1$ i $\alpha 2$), które tworzą bardzo charakterystyczną strukturę (rys. 11.30). Jest to szczelina o rozmiarach ok. 2,5 nm \times 1,0 nm \times 1,1 nm, teoretycznie pozwalających wiązać peptyd z 10–20 aminokwasów, zależnie od konformacji. Istotne jest, że miejsce to jest zbyt małe, by wiązać całe białko, znacznie mniejsze od analogicznego miejsca immunoglobulin. Z porównania sekwencji różnych białek MHC wynika, że ta właśnie część jest najbardziej zmienna u różnych form allelicznych. Tak więc polimorfizm białek MHC I tworzy podstawę do wytwarzania wielu różnych miejsc wiązania antygeny. Różnorodność białek MHC wynika jedynie z ich polimorficzności, tzn. istnienia wielu alleli genów MHC w obrębie gatunku, nie jest natomiast wynikiem genetycznych przegrupowań somatycznych, jak ma to miejsce w przypadku Ig czy TCR.

BIAŁKO MHC KLASY I

BIAŁKO MHC KLASY II



Rys. 11.29. Schemat cząsteczki białka MHC klasy I i MHC klasy II. Różne rejony nie są narysowane w skali. N i C oznaczają odpowiednio koniec aminowy i karboksylowy łańcuchów polipeptydowych (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)



Rys. 11.30. Schemat struktury szczeliny wiążącej peptyd (antygen) białka MHC I. (a) Widok całej cząsteczki z boku. (b) Widok z góry na szczelinę wiążącą peptyd. Strzałki reprezentują rejony β -harmonijki; zwoje — α spirale; ciemna kreska — wiązanie dwusiarczkowe (wg P.J. Bjorkman et. al., *Nature*, 329, 506–512, 1987, — zmodyf.)

Część MHC I podobna strukturalnie do immunoglobulin jest złożona z fragmentu $\alpha 3$ peptydu α , o sekwencji bardzo mało zmiennej w obrębie MHC i homologicznej do stałego rejonu immunoglobulin, oraz z β -mikroglobuliny, której sekwencja również jest homologiczna do rejonu stałego Ig (rys. 11.29). Z badań nad zmutowanymi białkami MHC wynika, że ten stały rejon odpowiada za interakcję białek MHC I z receptorem CD8, czyli za specyficzną interakcję komórek Tcytolitycznych z białkami MHC I.

Białka MHC II zbudowane są z dwu niekowalencyjnie połączonych polipeptydów α (32–34 kDa) i β (29–32 kDa), przy czym oba łańcuchy są polimorficzne i kodowane przez różne geny kompleksu MHC (rys. 11.29). Częsteczki MHC II mają plan budowy podobny do białek MHC I. Inaczej jednak niż w MHC I, rejon wiążący peptyd składa się z elementów obu łańcuchów (segmenty $\alpha 1$ i $\beta 1$). Są to najbardziej polimorficzne rejony łańcuchów, tworzące specyficzną szczelinę, bardzo przypominającą szczelinę cząsteczek MHC I.

Rejon o budowie zbliżonej do immunoglobulin jest zasadniczo niezmienny w obrębie alleli określonej klasy genów MHC II. Sądzi się, że ta niepolimorficzna domena białek MHC II jest odpowiedzialna za wiązanie receptorów CD4 i stąd powinowactwo limfocytów TCD4⁺ (czyli pomocniczych) do białek MHC II prezentujących obcy antygen (rys. 11.8).

Białka MHC, ze względu na podobieństwo struktury tych białek oraz homologie na poziomie genów, zalicza się do superrodziny immunoglobulin.

11.20. Geny MHC mają bardzo wiele alleli

Białka MHC kodowane są przez kompleks genów MHC. Kompleksy tych genów u myszy noszą nazwę H-2, a u człowieka — HLA (ang. human leukocyte antigen). U ludzi MHC ulokowany jest w chromosomie 6, natomiast β_2 -mikroglobulina zakodowana jest w chromosomie 15. Rejon MHC człowieka jest bardzo duży, obejmuje ok. 3,5 mln par zasad, czyli ok. 4 cM (rys. 11.28).

Geny klasy II obejmują loci DP, DQ i DR, geny klasy I — loci A, B i C. Należy zwrócić uwagę na fakt, że niektóre loci klasy II zawierają więcej niż jeden gen kodujący łańcuch β , lecz na ogół jeden łańcuch α . To zwiększa liczbę rodzajów białek MHC produkowanych przez komórkę. W przypadku klasy I, heterozygotyczny osobnik ma 6 różnych polimorficznych alleli (trzy od każdego z rodziców) i komórka produkuje 6 rodzajów cząsteczek MHC I. W przypadku klasy II, mimo że osobnik dziedziczy tylko 6 różnych polimorficznych loci, komórka może produkować znacznie więcej rodzajów dimerów MHC II: ekspresji mogą ulegać różne geny β w obrębie tego samego locus, ponadto mogą tworzyć się heterodimery z łańcucha α , pochodzącego z jednego allelu i z łańcucha β — z drugiego allelu. Zazwyczaj komórka jednego osobnika może wytwarzać 10–20 różnych cząsteczek MHC II — zależnie od odziedziczonych alleli. Geny MHC są najbardziej polimorficzne pośród dotychczas

analizowanych. W przypadku niektórych loci MHC człowieka zidentyfikowano ponad 40 alleli.

Czemu służy polimorficzność genów i białek MHC? Uważa się, że polimorfizm ten wytworzył się ewolucyjnie, w efekcie pozytywnej selekcji, dzięki której osobniki danego gatunku wytwarzają różne białka MHC, zdolne do wiązania bardzo wielu różnych peptydów. Gdyby liczba typów MHC w populacji była niska, można sobie wyobrazić, że mikroorganizmy mutowałyby swoje antygeny tak długo, aż powstałyby struktury nie mogące wiązać się z żadnymi MHC. W efekcie mikroorganizmy uniknęłyby specyficznej odpowiedzi immunologicznej.

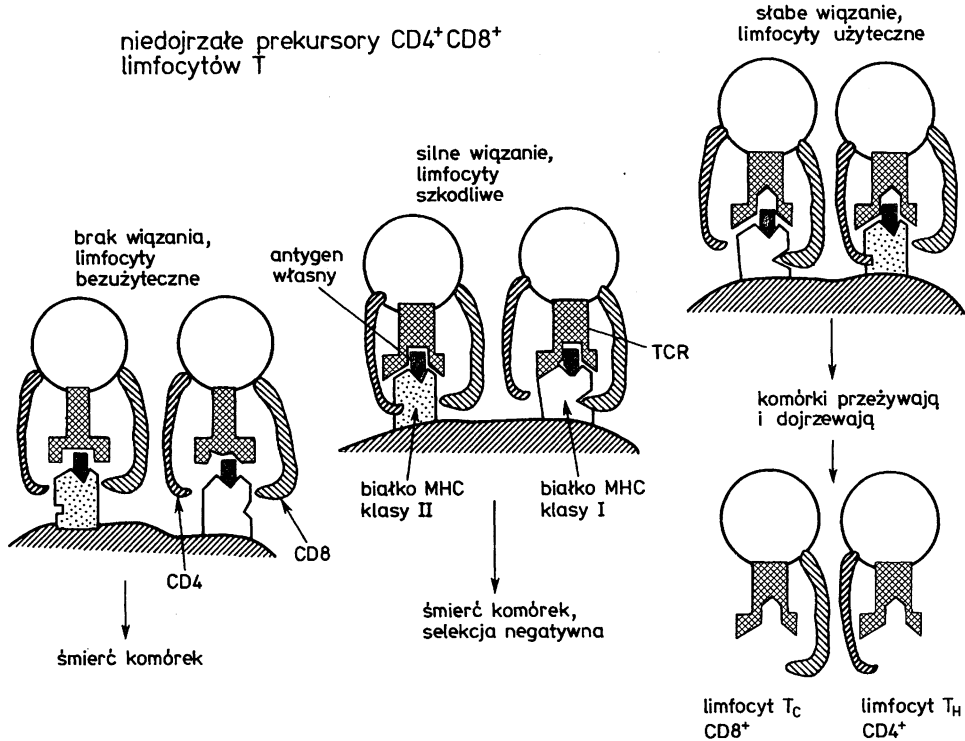
Rejon MHC, poza genami klasy I i klasy II, zawiera geny kodujące białka systemu dopełniacza, a także rejon kodujący cytokiny: (TNF) i limfotoksynę (LT).

11.21. Edukacja grasicowa uczy komórki T reagować z obcymi białkami i tolerować własne

Receptory komórek T (TCR) są wytwarzane w sposób przypadkowy, bez względu na to, jakie cząsteczki MHC i jakie peptydy znajdują się w organizmie — łatwo więc sobie wyobrazić, że część z nich będzie użyteczna, część bezużyteczna, a część wręcz szkodliwa. Użyteczne to te, które mogą wziąć udział w obronie organizmu, rozpoznając obce peptydy prezentowane przez własne MHC. Bezużyteczne to te, które nie potrafią rozpoznać żadnych peptydów prezentowanych przez własne MHC. Szkodliwe receptory to takie, które mogłyby związać się z własnymi peptydami prezentowanymi przez własne MHC.

Prekursory komórek T powstają w szpiku kostnym, migrują do grasicy, tu dochodzi do ekspresji receptorów na ich powierzchni, tu też następuje selekcja, eliminująca szkodliwe i bezużyteczne limfocyty, stymulująca rozwój użytecznych. Proces selekcji jest bardzo surowy — ok. 95% młodych tymocytów ginie w grasicy, ponieważ nie potrafią rozpoznać własnych cząsteczek MHC (selekcja pozytywna) lub też wiążą je bardzo mocno, z własnym peptydem w miejscu wiążącym (selekcja negatywna). Ta ostatnia selekcja jest podstawą autotolerancji — komórki T muszą wykazywać tolerancję wobec własnych antygenów (rys. 11.31).

Istotną rolę w dojrzewaniu komórek T odgrywają komórki nabłonka grasicy. Hipoteza tłumacząca mechanizm selekcji pozytywnej zakłada, że jeśli receptor TCR dojrzewającego tymocyty wiąże się z białkiem MHC na powierzchni nabłonka grasicy, nawet słabo, wtedy ten tymocyt przeżyje i osiągnie dojrzałość. Stąd specyficzność limfocytów do własnych MHC. Te same komórki T, które związały się słabo z własnymi MHC w grasicy, mogą być zdolne, po przedostaniu się do układu obwodowego, do silnego związania obcego antygeny w kompleksie z własnym MHC.



Rys. 11.31. Model selekcji limfocytów T w grasicy. Niedojrzałe tymocyty, oprócz receptorów TCR, mają jednocześnie oba typy koreceptorów CD4 i CD8. W efekcie selekcji przeżywają jedynie użyteczne limfocyty, które, zależnie od procesów zachodzących w grasicy, przestają syntetyzować jeden z typów koreceptorów i stają się limfocytami T_H lub T_C . Giną limfocyty, których TCR niezdolne są do rozpoznania własnych MHC I lub MHC II. Szkodliwe limfocyty, których TCR mogą rozpoznać własny antygen połączony z własnym MHC I lub MHC II są eliminowane (selekcja negatywna). Proliferacji ulegają użyteczne limfocyty, zdolne do rozpoznania antygenów związanych z MHC, lecz nie własnych antygenów (wg H. Boehmer, P. Kisielow, *Scientific American*, p. 50–59 October 1991 — zmodyf.)

Przypuszcza się, że w przypadku negatywnej selekcji delecji ulegają klony, których receptory TCR silnie wiążą się z własnym antygenem prezentowanym przez komórki grasicy, głównie makrofagi.

Jednym z fundamentalnych doświadczeń, które przekonało badaczy o istnieniu zjawiska klonalnej delecji, był eksperyment przeprowadzony na transgenicznym myszach. Otóż, użyto mutanty myszy niezdolne do prawidłowego przegrupowania genów receptorów T, a tym samym do produkcji własnych receptorów T (myszy SCID — ang. severe combined immunodeficiency syndrome — złożony ciężki zespół niedoboru odporności). Do komórek myszy SCID wprowadzono funkcjonalne geny α i β TCR, przy czym wybrano TCR wiążący peptyd HY — peptyd ten jest produkowany tylko w komórkach samców mysich. Otrzymane myszy transgeniczne produkowały tylko jeden rodzaj limfocytów T — limfocyty z transgenicznym TCR. Transgeniczny TCR

rozpoznawał peptyd HY w kompleksie z określonym białkiem MHC I — MHC D^b. Peptyd HY jest *de facto* antygenem obcym dla samic mysich, a własnym — dla samców. Teoretycznie więc, limfocyty z transgenicznym TCR byłyby szkodliwe dla samców mających MHC I D^b, bo wiązałyby własny antygen prezentowany przez własne MHC, a nieszkodliwe dla samic, które nie produkują HY. Do pozytywnej selekcji niezbędna byłaby obecność MHC I D^b, bo tylko to białko MHC może być rozpoznane przez badany TCR. Badano wytwarzanie limfocytów z transgenicznym TCR u różnych myszy i rzeczywiście przewidywania okazały się słuszne. Myszy nie mające MHC I D^b nie wytwarzały dojrzałych limfocytów z transgenicznym TCR — działało tu sito pozytywnej selekcji; samce myszy nie produkowały dojrzałych limfocytów — działała selekcja negatywna; samice wytwarzały dojrzałe limfocyty — działała selekcja pozytywna, a nie było negatywnej (tab. 11.4).

Tabela 11.4. Badanie selekcji limfocytów w grasicy używając myszy transgenicznych

Specyficzność transgenicznych TCR	Allel MHC D	Ekspresja antygeny	Selekcja		Dojrzałe limfocyty T wytwarzające TCR
			pozytywna	negatywna	
Antygen HY/MHC D ^b	D ^b	samce/HY ⁺	tak	tak	nie
Antygen HY/MHC D ^b	D ^b	samice/HY ⁻	tak	nie	tak
Antygen HY/MHC D ^b	D ^{b-}	samice/HY ⁻	nie	nie	nie

Myszy transgeniczne produkują TCR specyficzne wobec antygeny HY prezentowanego przez białko MHC I kodowane przez allel MHC I D^b. Antygen HY jest dla samic myszy antygenem obcym, a dla samców — własnym. Limfocyty T, wytwarzające transgeniczne TCR, dojrzewają u samic mających MHC D^b, a nie dojrzewają u samców (w rezultacie negatywnej selekcji przez rozpoznanie własnego antygeny) ani u samic nie mających białka MHC D^b (w efekcie braku pozytywnej selekcji wybierającej limfocyty rozpoznające MHC D^b).

Wyselekcjonowane limfocyty opuszczają grasicę, a ich receptory (TCR) nie ulegają zmianom w wyniku mutacji somatycznych, jak to się dzieje u limfocytów B — ma to sens biologiczny, ponieważ nie kontrolowane zmiany mogłyby spowodować powstanie receptorów nietolerancyjnych wobec własnych cząsteczek.

11.22. Odpowiedź immunologiczna zależna od antygeny

Komórki T_H, w odpowiedzi na związanie z antygenem, wydzielają cytokiny, substancje białkowe zwane też limfokinami lub interleukinami, które stymulują wzrost i dojrzewanie zarówno komórek T, jak i B. Poznano do tej pory wiele cytokin i lista nie jest zamknięta (tab.11.5). Wydzielanie cytokin jest krótkie i przejściowe, związane z przejściową stymulacją syntezy nietrwałego mRNA cytokiny.

Tabela 5. Niektóre cytokiny

Cytokina	Komórka wytwarzająca	Komórka docelowa	Wpływ na komórkę docelową
Interleukina 2 (IL-2)	komórki T	komórki T komórki B	wzrost, produkcja cytokin wzrost, aktywacja wydzielania przeciwciał
Interferon γ (IFN- γ)	komórki T	makrofagi wszystkie komórki komórki T komórki B	aktywacja stymulacja syntezy białek MHC I i MHC II stymulacja dojrzewania T _C stymulacja wydzielania przeciwciał
Interferon typu I (IFN- α , IFN- β)	makrofagi (α) fibroblasty (β)	wszystkie komórki	hamuje rozwój wirusów hamuje proliferację wzmaga ekspresję MHC I
Interleukina 4 (IL-4)	komórki TCD4 ⁺	komórki T komórki B makrofagi, komórki B	wzrost wzrost, aktywacja, przełączanie izotypu do IgE ekspresja Fc ϵ RIIb
Interleukina 3 (IL-3) GM-CSF	komórki T komórki T, makrofagi	niedojrzałe komórki szpiku prekursory leukocytów i in. komórek krwi	różnicowanie komórek krwi stymulacja wzrostu i różnicowania granulocytów i makrofagów
Interleukina 6 (IL-6)	makrofagi, komórki T, inne komórki	zaktywowane komórki B, inne komórki	główny czynnik wzrostowy różne efekty
Interleukina 7 (IL-7) TNF	fibroblasty, komórki szpiku makrofagi, komórki T	komórki pre-B komórki T i B neutrofile i komórki nabłonka komórki podwzgórza	wzrost i różnicowanie limfocytów B kostymulacja aktywacja w procesach zapalnych wywoływanie gorączki przez stymulację syntezy prostaglandyn
Limfotoksyna	komórki T	neutrofile, komórki nabłonka	aktywacja w procesach zapalnych

Cytokiny, jak inne polipeptydowe hormony, działają przez zwiążanie się ze specyficznymi receptorami na powierzchni docelowych komórek. Spoczynkowe komórki B i T mają niewielką liczbę tych receptorów — ich synteza jest indukowana przez zwiążanie antygeny, a także przez same cytokiny.

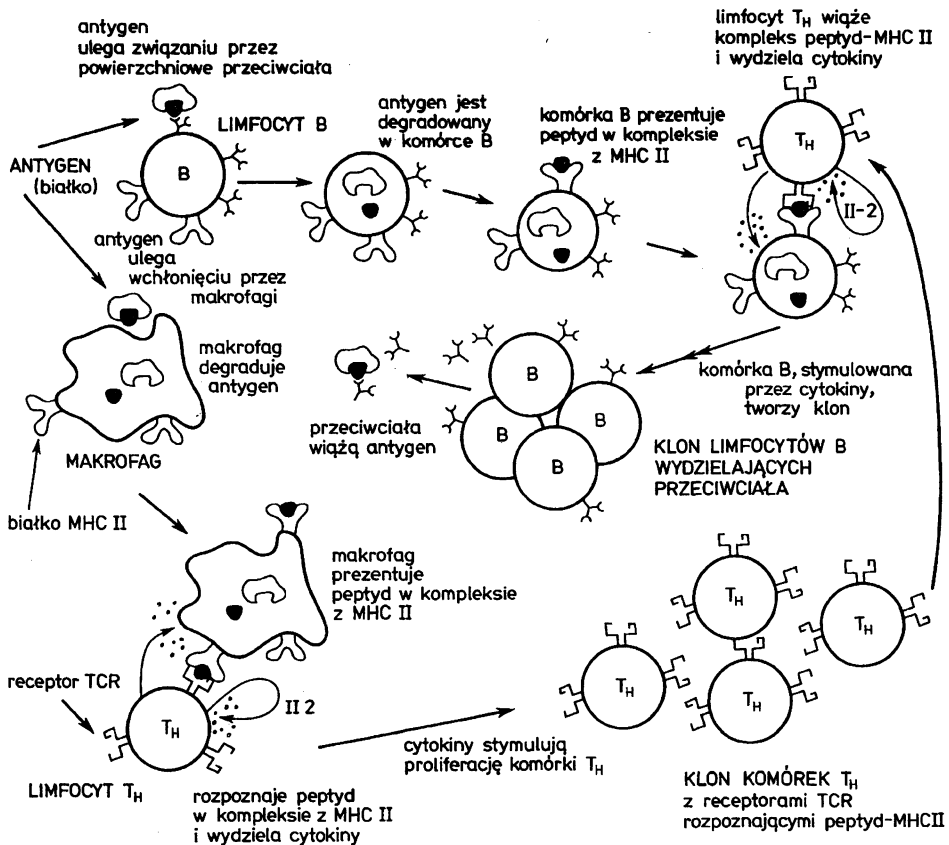
Ten sam biegun komórki T, który uczestniczy w wiązaniu docelowej komórki, wydziela cytokiny. W ten sposób limfocyty T_H głównie stymulują komórki, które prezentują rozpoznawane antygeny; bardzo istotna jest też autostymulacja — tzn. wydzielane przez limfocyt limfokiny działają na produkującą je komórkę, powodując jej wzrost i podziały (czyli proliferację) oraz syntezę receptorów. Oczywiście stymulacja przez cytokiny dotyczy także innych komórek: np. aktywacji ulegają limfocyty T_C i makrofagi.

Spotkanie limfocyta B z antygenem wywołuje wiele zjawisk, m.in. proliferację limfocyta, produkcję i wydzielanie przeciwciał, mutacje somatyczne, wytwarzanie komórek pamięci immunologicznej.

Limfocyt B, wytworzony w szpiku kostnym, dostaje się do obwodu i żyje tam zaledwie przez kilka dni, o ile nie dojdzie do interakcji jego przeciwciał powierzchniowych z antygenem. Antygeny, które wzbudzają najsilniejszą odpowiedź immunologiczną, są poliwalentne, tzn. mają wiele determinant antygenowych w swojej strukturze, dzięki czemu wiele przeciwciał na powierzchni jednej komórki B może związać się z jedną cząsteczką antygeny. Na powierzchni limfocyta tworzy się czapeczka złożona z przeciwciał usieciowanych antygenem, zlokalizowanych na biegunie komórki. Migracja przeciwciał jest możliwa dzięki płynności błony lipidowo-białkowej, w której zakotwiczone są przeciwciała. Początkowo tworzą się zgrupowania przeciwciał, które następnie zbierają się przy biegunie limfocyta, tworząc czapeczkę. Czapeczka, czyli kompleksy Ig i antygeny, jest wprowadzana do wnętrza komórki w wyniku endocytozy. Jeśli antygen jest białkiem, ulega degradacji do peptydów, po czym peptydy są prezentowane na powierzchni przez białka MHC II. Mechanizm ten bardzo przypomina działanie makrofagów, różnica jednak istnieje i to zasadnicza: makrofagi wchłaniają, degradują i prezentują wszystkie antygeny bez wyboru; komórki B prezentują tylko peptydy pochodzące ze specyficznie związanych przez własny typ Ig antygenów.

Aktywacja komórek B wymaga kooperacji limfocyta pomocniczego T_H . Komórki T_H mają receptory (TCR) rozpoznające na ogół inne rejony antygeny niż limfocyty B. Jak już wyjaśniono, komórki T_H rozpoznają peptydy pochodzące z degradacji białka antygenowego. Antygen jest degradowany przez makrofagi do peptydów, prezentowanych następnie na ich powierzchni w kompleksie z białkiem MHC II. Kompleks ten jest rozpoznawany przez TCR komórek T_H . Po związaniu antygeny następuje aktywacja limfocyta T_H i jego proliferacja (pod wpływem wydzielanych cytokin, głównie interleukiny 2), co daje w wyniku klon limfocytów T_H rozpoznających określony peptyd.

Komórka B, prezentująca peptyd w kompleksie z MHC II, zostanie rozpoznana przez taki limfocyt T_H , którego receptory TCR są zdolne do związania tego właśnie peptydu w kompleksie z MHC II. Limfocyt T_H , w efekcie związania z komórką B, ulegnie aktywacji, zacznie produkować cytokiny (głównie IL-2), które wywołają wzrost i różnicowanie komórki B. W efekcie działania cytokin dochodzi do proliferacji określonego klonu komórek B, do produkcji i wydzielania przeciwciał.



Rys. 11.32. Aktywacja komórek B z udziałem komórek T-pomocniczych. Antygen białkowy wnikający do ustroju jest rozpoznawany przez dziewicze komórki B mające specyficzny rodzaj przeciwciał. Kompleks Ig-antygen wnika do wnętrza, ulega degradacji; peptydy są prezentowane w kompleksie z MHC II na powierzchni limfocyta B. Komórki makrofagów także wchłaniają antygen, degradują go i prezentują na powierzchni w kompleksie z MHC II. Komórki pomocnicze T_H z receptorami TCR specyficznymi wobec kompleksu peptyd-MHC wiążą kompleks prezentowany przez makrofaga, co powoduje uaktywnienie komórki T_H , produkcję cytokin i receptorów cytokin na powierzchni, przy czym najsilniejszej stymulacji ulega synteza interleukiny 2 (IL2). Pod wpływem cytokin (głównie IL2) komórki T ulegają proliferacji. Klon ten rozpoznaje identyczny peptyd prezentowany przez MHC II na powierzchni limfocytów B. Związanie limfocyta T_H z komórką B powoduje aktywację komórki T, produkcję cytokin, które powodują proliferację klonu komórek B i ich dojrzewanie. W efekcie powstaje klon komórek plazmatycznych wydzielających przeciwciała (wg *Molecular Cell Biology*, ed. Darnell, Lodish, Baltimore, Scientific American Books, New York 1990 — zmodyf.)

Wydzielanie przeciwciał wymaga więc kooperacji specyficznych komórek B ze specyficznymi komórkami T_H (rys. 11.32).

Uważa się, że związanie antygeny jest momentem inicjującym aktywację limfocyta B: w efekcie działania nie wyjaśnionego mechanizmu spoczynkowa komórka B wchodzi w cykl komórkowy (przechodzi z fazy G_0 do fazy G_1) i następuje wzrost syntezy receptorów cytokin — jest to stan gotowości do

odebrania sygnałów pochodzących od komórki T_H . Główną rolę odgrywają tu interleukiny: 2, 4, 5 i 6.

W opisanym procesie jeden antygen białkowy jest rozpoznawany przez dwa rodzaje komórek: B i T_H i tylko komórki specyficzne wobec antygeny ulegają aktywacji oraz proliferacji. Jak istotną rolę w prezentowaniu antygeny odgrywają makrofagi? Sądzi się, że niezbędne są przede wszystkim w pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, kiedy organizm styka się z białkowym antygenem po raz pierwszy i kiedy liczba komórek B zdolnych do rozpoznania antygeny jest bardzo mała — wtedy do aktywacji komórek T_H potrzebne są makrofagi. We wtórnej odpowiedzi immunologicznej, kiedy istnieją powiększone pule klonów komórek B, mogą one być głównymi komórkami prezentującymi antygen.

11.23. Antygeny stymulujące syntezę przeciwciał niezależnie od komórek T

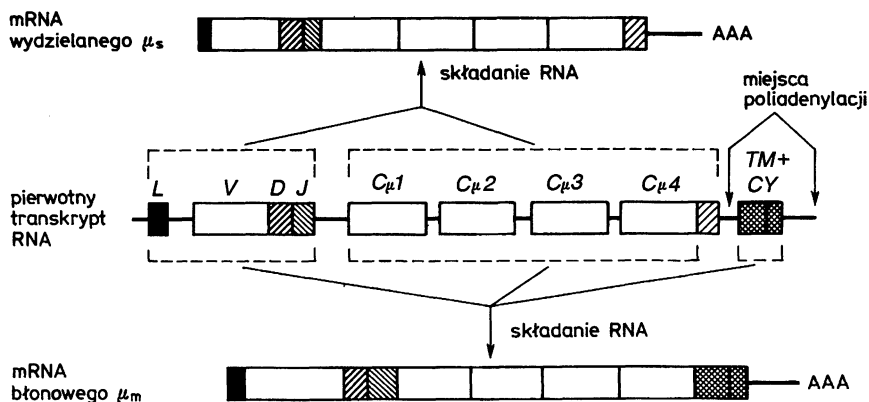
Omówiony proces stymulacji produkcji przeciwciał przez limfocyty B wymagał uczestnictwa komórek T-pomocniczych (T_H). Jest to proces typowy dla antygenów białkowych. Stwierdzono, że pewna grupa antygenów stymulowała syntezę specyficznych przeciwciał u pozbawionych grasicy (a więc i komórek T) myszy. Należy tu m.in. lipopolisacharyd (LPS), składnik błon bakterii gramujemnych. Sądzi się, że samo związanie LPS z komórką B wystarcza do jej aktywacji, z pominięciem cytokin. Również wiele polisacharydów (dekstrany, polisacharydy pneumokoków) dawało podobny efekt. Mechanizm indukcji nie jest znany. Praktyczne znaczenie tego zjawiska jest duże, ponieważ polisacharydy stanowią istotny element bakteryjnych ścian komórkowych.

11.24. Zaktywowana komórka B wydziela przeciwciała

Efektym aktywacji komórki B jest ogromna intensyfikacja syntezy przeciwciał, przy czym stwierdzono, że nie dochodzi tu do znacznego wzmożenia syntezy specyficznego dla immunoglobulin mRNA, natomiast znacznie wzrasta stabilność tego mRNA. W regulacji Ig istotna jest także kontrola na poziomie translacji. Mechanizm tych regulacji jest jeszcze słabo poznany. Finalnym efektem dojrzewania komórki B jest komórka plazmatyczna, zawierająca więcej cytoplazmy i retikulum endoplazmatycznego (siateczki śródplazmatycznej) niż komórka macierzysta, wyspecjalizowana w sekrecji białek, z dużym aparatem Golgiego — taka komórka wydziela Ig, które stanowiąc mogą do 10% wszystkich białek syntetyzowanych przez komórkę. Komórka plazmatyczna traci zdolność do proliferacji, nie ulega dalszym podziałom i ginie po wielu dniach produkcji przeciwciał.

Wydzielanie Ig wiąże się z faktem, że w zaktywowanej komórce B dochodzi do syntezy zmienionego łańcucha ciężkiego (H). Ig znajdująca się na powierz-

chni nie zaktywowanej komórki B — to związana z błoną immunoglobulina typu IgM. Związana z błoną IgM jest klasycznym monomerem (złożonym z dwu łańcuchów H i dwu L), w odróżnieniu od wydzielanej IgM, która jest pentamerem. IgM jest zakotwiczona w błonie przez hydrofobowe rejony obu łańcuchów H, znajdujące się na C-końcu. Gen kodujący łańcuch H IgM zawiera osiem egzonów: egzon peptydu liderowego, egzon rejonu V, cztery egzony kodujące cztery domeny rejonu stałego i dwa egzony rejonu transmembranowego oraz cytoplazmatycznego (rys. 11.33).



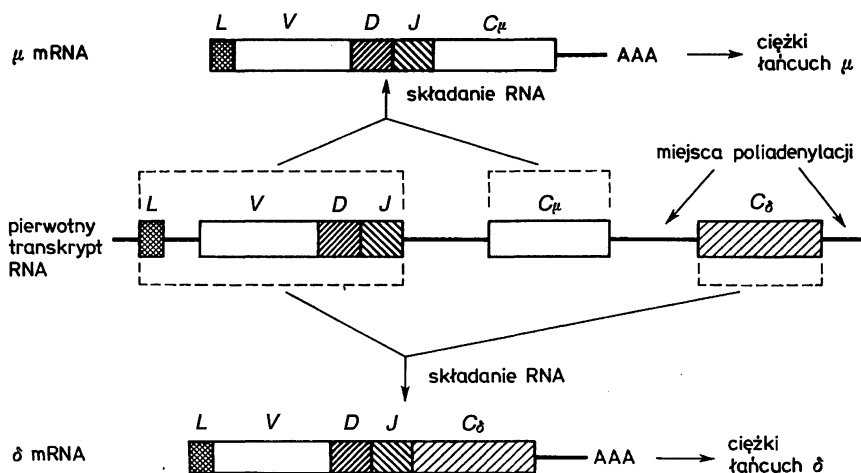
Rys. 11.33. Ekspresja formy wydzielanej oraz membranowej łańcucha H immunoglobuliny IgM. Alternatywne składanie pierwotnego transkryptu powoduje wytworzenia mRNA formy wydzielanej (μ_s) lub membranowej (μ_m) łańcucha μ . Przerywane linie wskazują te segmenty, które zostaną połączone przy składaniu RNA. TM i CY oznaczają segmenty transmembranowy i cytoplazmatyczny, odpowiednio: C μ 1–C μ 4 są czterema egzonami genu C μ (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.).

Cząsteczka mRNA kodująca łańcuch H formy błonowej (μ_m) jest poliadenylowana za ostatnim egzonem. W efekcie składania mRNA i translacji otrzymuje się białko μ_m . Koniec C-terminalny wydzielanej formy łańcucha H (μ_s) jest kodowany przez segment DNA bezpośrednio za egzonem szóstym. Cząsteczka mRNA formy μ_s ulega poliadenylacji tuż za rejonem kodującym C-koniec łańcucha μ_s , a egzony kodujące C-koniec formy μ_m ulegają odcięciu. W efekcie tego procesu, oba typy mRNA różnią się końcami 3', a więc kodują różne C-końce łańcucha H IgM. Struktura końców C-terminalnych w pełni zgadza się z różnym zachowaniem się łańcuchów μ_m i μ_s . Koniec μ_m zawiera ciąg 26 niepolarnych aminokwasów, ograniczony z obu stron grupami naładowanych aminokwasów, co tworzy klasyczną domenę transmembranową. Forma wydzielana nie ma domeny transmembranowej, natomiast zawiera resztę cysteiny, uczestniczącą w tworzeniu mostka dwusiarczkowego, który wiąże monomery (każdy złożony z czterech łańcuchów) w pentamery. Forma ta ma także miejsce glikozylacji, co przypuszczalnie czyni cząsteczkę Ig lepiej rozpuszczalną. Tak więc,

dzięki alternatywnej poliadenylacji mRNA, każda komórka B może syntetyzować zarówno formę membranową, jak i wydzielaną IgM. W miarę postępowania procesu różnicowania limfocytu wzrasta ilość formy wydzielanej. Wszystkie inne geny C_H zawierają podobne egzony kodujące część transmembranową — tak więc łańcuchy ciężkie wszystkich typów Ig mogą ulegać ekspresji jako forma związana z błoną bądź wydzielana, chociaż IgD rzadko występuje w formie wydzielanej.

Ponieważ mRNA łańcuchów μ_m i μ_s różnią się miejscem poliadenylacji, przypuszcza się, że kontrola poliadenylacji może być odpowiedzialna za przejście z formy membranowej w formę wydzielaną, mechanizm ten jednak nie jest wyjaśniony.

Synteza łańcuchów H przeciwciał w wyniku alternatywnego wykorzystania tej samej sekwencji DNA zapewnia identyczność rejonów zmiennych (V) przeciwciał membranowych i wydzielanych oraz jest tym samym kluczowym mechanizmem umożliwiającym funkcjonowanie mechanizmu selekcji klonalnej.



Rys. 11.34. Koekspresja IgM i IgD w limfocytach B. Alternatywne przekształcanie pierwotnego transkryptu prowadzi do wytworzenia μ lub δ mRNA. Przerwane linie wskazują te segmenty łańcucha H, które ulegają połączeniu w procesie składania mRNA

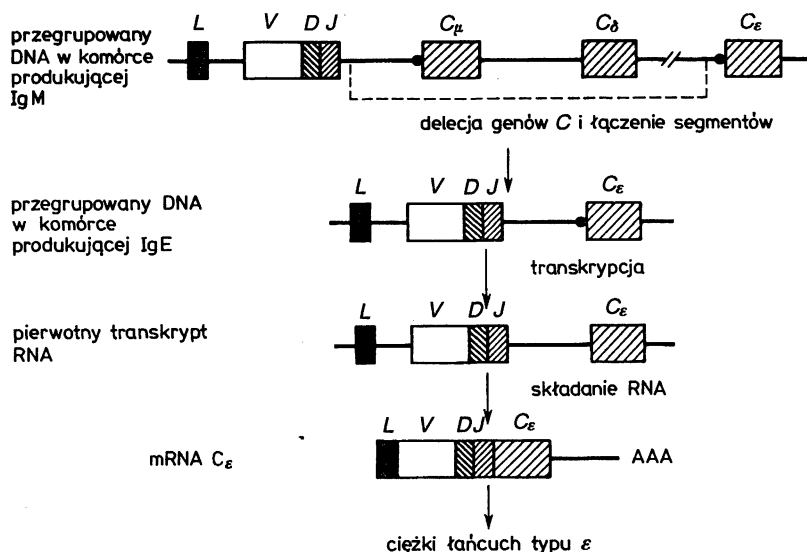
Opisany mechanizm, polegający na wykorzystaniu alternatywnego przekształcania transkryptu, nie jest ograniczony jedynie do przejścia Ig z formy membranowej do wydzielanej. Istnieją dwa rodzaje dziewiczych komórek B: jedne zawierają związane z błoną IgM, inne posiadają IgM oraz IgD. Oba typy przeciwciał różnią się tylko rejonami stałymi (C) łańcuchów ciężkich. Częścieczki mRNA IgM i IgD tworzą się przez alternatywną poliadenylację pierwotnego transkryptu (rys. 11.34).

11.25. Zaktywowany limfocyt B wytwarza wtórne przeciwciała

W efekcie stymulacji przez antygen, zaktywowane komórki B, które dotychczas wytwarzały tylko IgM lub IgM i IgD, rozpoczynają syntezę wtórnych przeciwciał, tzn. IgG, IgE lub IgA, różniących się od pierwotnych jedynie strukturą łańcuchów ciężkich. W procesie tym, określanym jako przełączanie izotypów, dochodzi więc tylko do przełączenia syntezy łańcuchów H jednego typu na syntezę łańcuchów H innego typu.

W przejściu do syntezy wtórnych Ig należy rozważyć proces rekombinacji DNA, prowadzący do przegrupowań w genie łańcucha H. W kierunku 3' od rejonu *VDJ* znajdują się kolejno segmenty kodujące rejonu stałe (*C*) różnych typów immunoglobulin: C_μ , C_γ , C_ϵ i C_α (rys. 11.17 i 11.35). Tak więc, jeśli delecji ulegną egzony od C_μ do C_γ , rejon *VDJ* połączy się z C_ϵ i syntetyzowane będą łańcuchy IgE. Uważa się, że rekombinacja DNA odbywa się w specyficznych rejonach, znajdujących się w intronach, w pobliżu końca 5' każdego (z wyjątkiem C_δ) segmentu *C*. Rejony te zawierają liczne powtórzenia krótkich sekwencji, mogących rekombinować między sobą. Efektem rekombinacji jest delecja odcinków DNA i połączenie rejonu *VDJ* z określonym rejonem *C*. Dalszym etapem będzie powstanie mRNA, który ulegnie poliadenylacji za przyłączonym rejonem *C* (rys. 11.35).

Omówiony model nie tłumaczy jednak jednoczesnego wytwarzania różnych typów łańcuchów ciężkich przez jedną komórkę B, co obserwuje się często u zwierząt oraz w hodowlach stymulowanych antygenem. Sądzi się, że oprócz



Rys. 11.35. Przełączanie izotypów: przejście od syntezy pierwotnych przeciwciał (IgM) do syntezy wtórnych przeciwciał (IgE). Przegrupowaniu ulega gen łańcucha H. Przed segmentami *C* znajdują się rejony ulegające rekombinacji (•) (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

mechanizmu polegającego na rekombinacji DNA, funkcjonuje także alternatywne przekształcanie mRNA łańcuchów ciężkich, podobnie jak w procesie umożliwiającym jednoczesną produkcję IgM i IgD, a także form membranowych i wydzielanych przeciwciał.

Zmiana typów przeciwciał, syntetyzowanych przez jedną komórkę B sprawia, że zaktywowana komórka kolejno wytwarza IgM lub IgM i IgD, a następnie dominować zaczynają przeciwciała wtórne, a więc IgG, IgE lub IgA.

Co jest niezwykle istotne z punktu widzenia selekcji klonalnej, wszystkie klasy przeciwciał produkowane przez daną komórkę B mają te same rejony zmienne (V), czyli tę samą specyficzność wobec antygeny.

Przełączanie syntezy łańcuchów ciężkich nie jest procesem przypadkowym, lecz regulowanym przez komórki wspomagające T_H i wytwarzane przez nie cytokiny. I tak np. produkcja IgE jest stymulowana przez interleukinę-4 (IL-4). Podobnie γ -interferon (IFN- γ) indukuje syntezę Ig2a u myszy. Przypuszcza się, że cytokiny specyficznie zmieniają strukturę chromatyny tak, że rejony, w których ma zajść rekombinacja oraz określone rejony C_H stają się dostępne dla czynników regulujących rekombinację i transkrypcję. Kierunek przełączania syntezy (do γ , ϵ lub α) zależy przede wszystkim od rodzaju antygeny: pasożyty skóry indukują IgE, podczas gdy pasożyty jelitowe indukują IgA. Rodzaj syntetyzowanych limfokin zależy przypuszczalnie od rodzaju patogeny.

11.26. Geny immunoglobulin ulegają somatycznym mutacjom

Rejon zmienny (V) przeciwciał, powstający w efekcie procesu rekombinacji elementów V , D i J , jest stabilny tylko do momentu aktywacji limfocyty B. Związanie antygeny i obecność komórek T indukuje proces mutacji somatycznych, występujących przede wszystkim w rejonie V , co prowadzi do jeszcze większego zróżnicowania rejonów zmiennych przeciwciał. Niektóre z tych mutacji dają w efekcie receptory (tzn. przeciwciała związane z błoną) o zwiększonym powinowactwie wobec antygeny. Komórki B produkujące takie receptory są preferencyjnie stymulowane przez antygen i komórki T_H do proliferacji, różnicowania się i wydzielania przeciwciał. W efekcie tego procesu, w trakcie odpowiedzi immunologicznej pojawiają się w obiegu przeciwciała o coraz większym powinowactwie do antygeny, co zapewnia skuteczniejszą obronę przed patogenami.

Omawiane mutacje są mutacjami punktowymi, występującymi z częstotliwością co najmniej jedna mutacja na rejon V na jedno pokolenie komórkowe, co odpowiada 10^{-3} – 10^{-4} na zasadę na pokolenie. Jest to częstość 10^6 razy wyższa niż w przypadku mutacji spontanicznych w innych genach. Mutacje te występują w obu łańcuchach, praktycznie jedynie w sekwencjach tworzących rejon V i w najbliższym sąsiedztwie. Najwyższa częstość dotyczy rejonów nadzmiennych CDR, czyli odpowiedzialnych za wiązanie antygeny.

Mutacje te zostają zachowane w komórkach pamięci immunologicznej, tak więc wtórna odpowiedź immunologiczna zawiera przeciwciała o wyższym powinowactwie wobec antygeny niż odpowiedź pierwotna.

Nie jest wyjaśniony mechanizm, który doprowadza do wysokiej częstości mutacji w tak ściśle określonym rejonie genu. Badania nad myszami transgenicznymi, którym wszczepiano różne fragmenty genów Ig, sugerują, że nawet odległe od rejonu V sekwencje (m.in. rejon położony w kierunku 3' od genu C_{κ} łańcucha lekkiego) biorą udział w regulacji omawianej mutagenyzy.

11.27. Tolerancja komórek B wobec własnych antygenów organizmu

Nadal nie jest w pełni zrozumiałe, dlaczego komórki B nie produkują przeciwciał skierowanych przeciwko własnym antygenom organizmu. Autotolerancja komórek B jest wynikiem dwu zjawisk:

(a) delecji klonalnej, czyli śmierci niedojrzałych limfocytów, które reagują z własnymi antygenami;

(b) anergii, czyli funkcjonalnej inaktywacji limfocytów, które rozpoznały własny antygen.

Klonalna delecja limfocytów B została zademonstrowana w eksperymentach z myszami transgenicznymi, u których następowała ekspresja genów kodujących przeciwciała specyficzne wobec białka MHC I typu H-2K^k. W przypadku, gdy transgeny ulegały ekspresji u takich myszy, które nie wytwarzały białka MHC typu H-2K^k, większość obwodowych limfocytów B wytwarzała transgeniczne przeciwciała (przegrupowanie własnych, endogennych genów Ig było blokowane przez wyłączenie alleliczne). Jednakże, gdy transgeny ulegały ekspresji u myszy mających MHC H-2K^k, peryferyjna tkanka limfatyczna zawierała obniżoną liczbę limfocytów B i żaden z przeżywających limfocytów B nie wytwarzał transgenicznych przeciwciał. Tak więc, interakcja rozwijających się komórek B, specyficznych wobec własnego białka MHC, z własnym MHC, prowadzi do delecji tych klonów B. Uważa się jednak, że delecja klonalna nie jest głównym mechanizmem autotolerancji limfocytów B — główną rolę odgrywa tu anergia klonów rozpoznających własny antygen.

Istotność anergii klonów zademonstrowano w przekonujących doświadczeniach z myszami transgenicznymi. Skonstruowano dwa rodzaje myszy: jeden, produkujący lizozym jaja kurzego oraz drugi, produkujący przeciwciała przeciwko lizozymowi, dzięki obecności transgenów kodujących odpowiednie łańcuchy H i L. Po skrzyżowaniu obu rodzajów myszy otrzymano potomstwo, które jednocześnie produkowało lizozym i miało geny kodujące przeciwciała przeciw lizozymowi, wykazywało jednak tolerancję wobec lizozymu. Lizozym był traktowany jako białko własne. W pokoleniu F₁ nie wykrywano przeciwciał przeciw lizozymowi, nawet po immunizacji lizozymem, mimo że wszystkie komórki B miały geny kodujące te przeciwciała. Stwierdzono, że wytwarzana

była bardzo niewielka liczba tych przeciwciał, jedynie w formie związanej z błoną. Tak więc, autoreagujące limfocyty nie są eliminowane, lecz zablokowana jest ich aktywacja — ulegają anergii. Molekularne podłoże auto-tolerancji jest nadal bardzo słabo poznane.

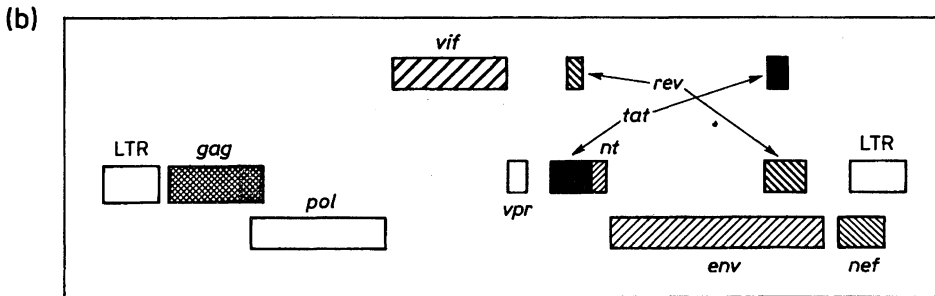
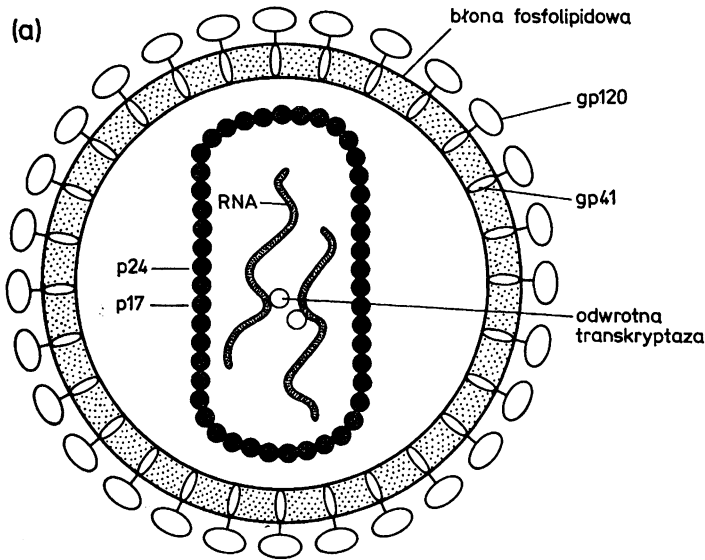
11.28. Wirus HIV wywołuje AIDS

AIDS (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*) został opisany na początku lat 80., jako zespół bardzo zróżnicowanych objawów klinicznych spowodowanych załamaniem systemu odpornościowego w efekcie zakażenia wirusem HIV (ang. *human immunodeficiency virus*). HIV infekuje limfocyty T mające receptory CD4 (czyli limfocyty pomocnicze T_H) oraz makrofagi. Ponieważ komórki te są absolutnie niezbędne w odpowiedzi immunologicznej, efekty zakażenia są dramatyczne i prowadzą do śmierci zainfekowanej osoby.

Wirus HIV należy do grupy renowirusów — jego wirion zawiera dwie identyczne nici RNA (każda ma 9,2–9,7 tysięcy par zasad), upakowane w białkowym kapsydzie otoczonym membranową otoczką. Otoczką membranowa pochodzi z komórki gospodarza, zawiera jednak kodowane przez wirus glikoproteiny: gp 120 i gp 41 (rys. 11.36(a)).

Infekujący wirus wiąże się z błoną atakowanej komórki dzięki interakcji gp120 z receptorem CD4, po czym następuje fuzja otoczki wirionu z błoną komórkową, co powoduje wniknięcie genomu wirusa do wnętrza. Odwrotna transkryptaza syntetyzuje dwuniciowy DNA na matrycy RNA, a integraza integruje DNA do chromosomu gospodarza — wirus wchodzi w fazę prowirusa. Prowirus może być nieaktywny transkrypcyjnie przez miesiące i lata — mamy wtedy do czynienia z fazą ukrytą rozwoju wirusa. Geny prowirusa mogą ulegać transkrypcji, która jest kontrolowana przez sekwencje LTR (LTR zawiera promotor i enhancery) i stymulowana prawdopodobnie przez związanie antygeny do receptorów TCR limfocytu T oraz przez cytokiny. Jak widać, rozwój wirusa jest stymulowany przez te same czynniki (tzn. antygen i cytokiny), które powodują fizjologiczną proliferację komórek T w normalnej odpowiedzi immunologicznej, czyli infekcja wywołująca reakcję obronną organizmu może pobudzać namnażanie wirusa HIV i jego wyjście z fazy ukrytej. Sądzi się, że stymulacja TCR i cytokiny powodują indukcję białek regulatorowych, które następnie wiążą się z sekwencjami w LTR. W wyniku stymulacji transkrypcji DNA prowirusa, syntetyzowane są białka wirusowe oraz cząsteczki RNA pełnej długości (genomowe), po czym dochodzi do zapakowania RNA i cząsteczek polimerazy w kapsydy białkowe. Te cząstki nukleoproteinowe są następnie otaczane błoną komórkową inkrustowaną białkami wirusa i wypączkowują z komórki. Produkcja wirusa powoduje liżę komórki (np. rys. 11.37).

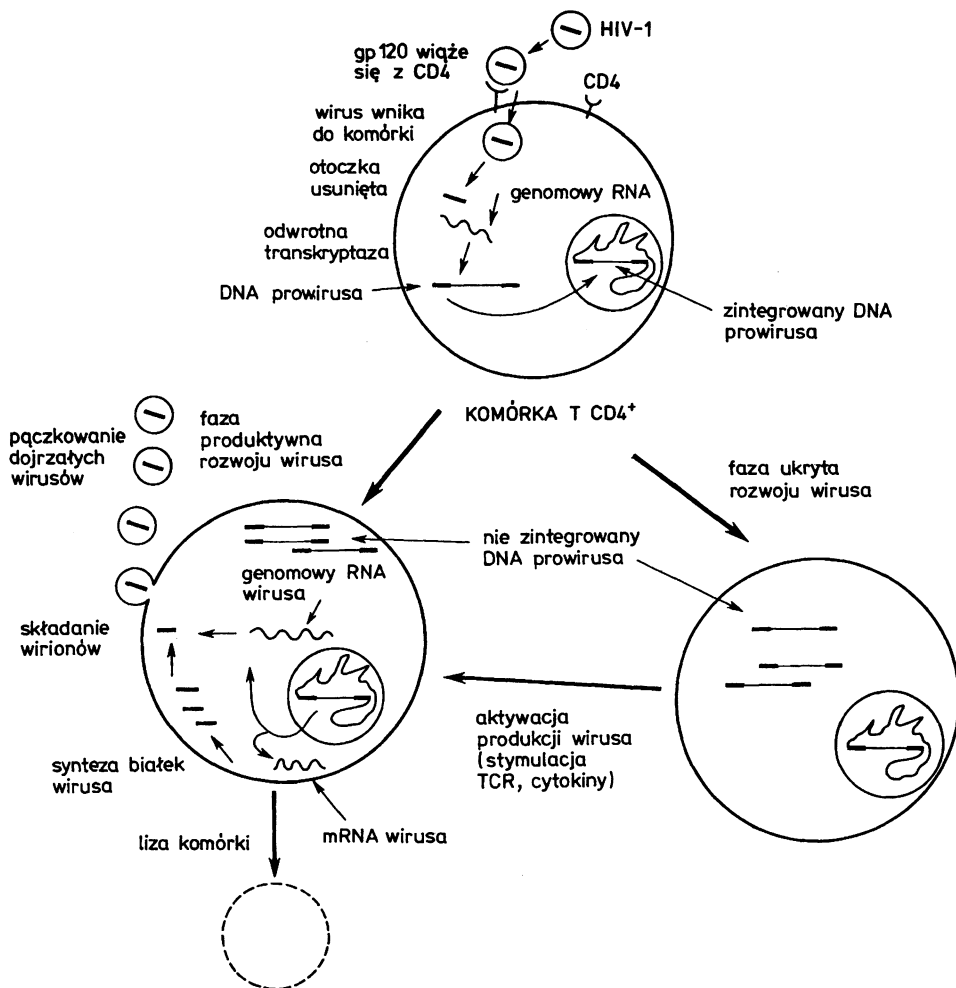
Wpływ wirusa HIV na organizm jest większy niż wynika to z liczby zainfekowanych produktywnie limfocytów T. Limfocyty, które nie uległy liżeniu, też nie funkcjonują normalnie.



Rys. 11.36 (a). Budowa wirusa HIV-1. Wirus zawiera dwie nici RNA (nici +) powiązane z odwrotną transkryptazą, umieszczone w kapsydzie z białek p24 i p17, osłoniętym otoczką membranową z wirusowymi białkami gp 41 i gp120. (b) Geny wirusa HIV. Genom HIV ma elementy typowe dla retrowirusów: *gag* kodujący białka kapsydu; *env* kodujący białka otoczki; *pol* kodujący odwrotną transkryptazę, integrację i proteazę — enzymy konieczne w rozwoju wirusa. Dodatkowo ma co najmniej sześć innych genów (*vpr*, *vif*, *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*), regulujących rozwój wirusa. Genom oflankowany jest typowymi dla retrowirusów sekwencjami LTR. Zakreskowane i pokratkowane segmenty, oznaczone strzałkami — to elementy nieciągłych genów, które łączą się w procesie składania mRNA (wg R.C. Gallo, *Scientific American*, 1987 — zmodyf.)

Makrofagi ulegają infekcji albo ze względu na posiadane przez nie receptory CD4 (mają ich mniej niż limfocyty T), albo m.in. w wyniku fagocytozy zainfekowanych wirusem komórek. Makrofagi nie ulegają lizie pod wpływem HIV, stanowią więc jego główny skład. Zainfekowane makrofagi nie mogą pełnić swojej normalnej funkcji immunologicznej. Między innymi uważa się, że upośledzona jest ich zdolność do prezentacji antygeny ze względu na obniżenie ilości białek MHC klasy II.

Dlaczego odpowiedź immunologiczna nie wystarcza do ochrony organizmu przed wirusem HIV? Po pierwsze, wirus niszczy lub inaktywuje komórki



Rys. 11.37. Cykl rozwojowy wirusa HIV. Schematycznie przedstawiono fazy infekcji ukrytej i produktywniej (wg A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991 — zmodyf.)

niezbędne w tej odpowiedzi. Po drugie, HIV wykazuje bardzo wysoką częstość mutacji punktowych, insercji i delecji, a także rekombinacji między szczepami. To wywołuje jego zmienność antygenową, utrudniającą ochronę. Ponadto odpowiedź immunologiczna przeciw wirusowi może niszczyć własne, nie tylko zainfekowane komórki. Do tej pory nie udało się uzyskać skutecznej szczepionki. Niestety, okazało się, że najbardziej immunogenne elementy cząsteczek są funkcjonalnie mało istotne (przeciwciała nie hamują rozwoju wirusa) i ponadto bardzo zmienne.

12. UDZIAŁ GENÓW W PROCESIE NOWOTWORZENIA

Nowotwory złośliwe można zaliczyć do swoistego rodzaju choroby genetycznej. W historii nowotworów od momentu zapoczątkowania do końcowej fazy progresji występuje głębokie rozchwianie genomu i pojawiają się mutacje w wielu genach.

Proces nowotworowy ma wieloletni przebieg, a jego faza kliniczna może mieć niekiedy gwałtowny przebieg. Etiologia chorób nowotworowych jest złożona. Szacuje się, że ok. 70–80% wszystkich nowotworów powstaje w wyniku działania na organizm wielu czynników środowiskowych (w tym również nawyków, takich jak np. palenie tytoniu).

Nowotwory złośliwe pojawiają się w każdej grupie wiekowej. Najczęściej jednak dotyczą ludzi starszych (powyżej 30–40 lat życia).

W tym rozdziale omówimy wybrane grupy genów, których udział w powstaniu i rozwoju nowotworów wydaje się istotny. Zdajemy sobie sprawę, że przy szybkim postępie wiedzy, omówienie to jest wycinkowe i nie zamknięte, ale wskazuje kierunek i hierarchię badań prowadzonych w tej dziedzinie.

12.1. Komórki nowotworowe różnią się od komórek prawidłowych wieloma cechami biologicznymi

Nowotwór złośliwy jest populacją zmienionych komórek somatycznych w wielokomórkowym organizmie i wykazuje charakterystyczne cechy biologiczne, takie jak:

- (a) niekontrolowane i nadmierne namnażanie nienormalnych odmian własnych komórek organizmu połączone z utratą funkcjonalnej specjalizacji;
- (b) narastające zezłośliwienie „odróżnicowanych” komórek, objawiające się zdolnością do infiltracji i niszczenia sąsiednich prawidłowych tkanek;

(c) zdolność do tworzenia przerzutów do tkanek i narządów odległych od ogniska pierwotnego;

(d) nieodwracalność procesu nowotworowego.

Cechy te odnoszą się do procesu nowotworowego w pełni jego rozwoju w zaawansowanej, dostrzegalnej klinicznie fazie. Początkowe fazy rozwoju nowotworu przebiegają jednak w sposób skryty, niedostępny dla obserwacji klinicznej i zajmują zwykle długi czas (okres utajenia).

12.2. Proces nowotworowy rozwija się w ciągu długiego czasu i jest procesem wieloetapowym obejmującym fazę inicjacji, promocji i progresji

Niekiedy udaje się określić czas utajenia, zwłaszcza jeśli zachodzi wyraźny związek między pojawieniem się nowotworu a jednorazową lub ostatnią ekspozycją na znany czynnik rakotwórczy (napromieniowanie, kontakt z czynnikiem chemicznym). U człowieka czas utajenia zawiera się w granicach od kilku lat (np. białaczki u ludzi napromieniowanych w czasie wybuchu bomb atomowych) do 20–30 lat (nowotwory u ludzi eksponowanych na chemiczne czynniki rakotwórcze).

Proces powstawania nowotworu złośliwego jest procesem długotrwałym i wieloetapowym. Koncepcja wieloetapowego rozwoju nowotworu oparta jest na badaniach nad chemiczną indukcją raka skóry u myszy i rakowacenia brodawczaków skóry u królika.

Postuluje się, że pierwszą fazą w naturalnym rozwoju nowotworu złośliwego jest inicjacja (zapoczątkowanie). U myszy i królików fazę inicjacji można indukować działając na skórę chemicznymi czynnikami rakotwórczymi. Faza ta odnosi się do pojedynczej komórki, która zostaje trwale zmieniona przez czynnik rakotwórczy. Komórka zachowuje piętno tej zmiany, może pozostać przez długi czas w stanie „uśpienia” Zmiany te mają charakter zmian nieodwracalnych, przekazywanych komórkom potomnym. Natura tych zmian nie jest w pełni poznana. Sądzi się, że polegają one głównie na indukowaniu przez czynnik rakotwórczy mutacji, która powoduje, że komórka dzieli się w sposób nie kontrolowany i jednocześnie ogranicza zdolność do realizacji programu różnicowania. Morfologicznym przejawem fazy inicjacji mogą być tzw. stany przedrakowe (hiperplazja, czyli rozrost, tj. powiększenie masy tkanki wskutek zwiększenia liczby komórek) i dysplazja, czyli nieprawidłowość w budowie tkanki. Morfologicznie faza ta ujawnia się w postaci wybujałych narośli skóry, zwanych brodawczakami. Tylko niektóre z komórek dysplastycznych noszą piętno inicjacji. Tak zmieniona komórka może wejść w kolejną fazę promocji. W modelowym systemie indukcji raka skóry u myszy czynnikiem promocyjnym był olej krotonowy, a ściślej mówiąc zawarte w nim estry forbolu. W fazie promocji komórka z piętnem inicjacji zostaje pobudzona do podziałów. Jednocześnie pojawiają się pierwsze cechy „złośliwego” fenotypu:

zwiększona ruchliwość komórek, utrata funkcjonalnej łączności z sąsiednimi komórkami prawidłowymi, inwazyjność (naciekanie sąsiednich zorganizowanych tkanek) i utrata swoistych funkcji enzymatycznych. Do tej pory nie wiadomo, czy na etapie promocji mamy do czynienia z wieloma nowymi mutacjami, czy też obserwowane zmiany fenotypowe są spowodowane mechanizmami epigenetycznymi. W fazie promocji czasem pojawiają się zmiany w strukturze i liczbie chromosomów. W fazie promocji niektóre cechy fenotypowe (np. zahamowanie różnicowania i inwazyjność) mogą zostać odwrócone. Fakt ten wykorzystuje się nawet w praktyce, stosując np. w zmianach przedrakowych, takich jak rogowacenie białe śluzówek, różne czynniki antypromocyjne: retinoidy, niektóre hormony, cykliczne nukleotydy i inne.

Chociaż w procesie powstawania nowotworów przejścia między poszczególnymi fazami są płynne, wielostopniowy charakter rozwoju nowotworów w wielu typach nowotworów złośliwych jest wyraźnie widoczny.

Końcową fazą rozwoju nowotworu złośliwego jest progresja. Termin ten określa postępujące i nasilające się „zezłośliwienie” komórek. Komórki nowotworowe przechodzą w fazę coraz to intensywniejszego wzrostu (podziałów).

12.3. W fazie progresji postępuje proces utraty kontroli nad podziałami komórek nowotworowych

W fazie progresji wzrost komórek staje się autonomiczny, to jest niezależny od regulacji hormonalnej i od czynników wzrostowych i innych regulatorowych sygnałów wytworzonych przez inne komórki. Niektóre komórki nowotworów (zwłaszcza guzów litych) zaczynają wytwarzać czynniki angiogenne, niezbędne do tworzenia się sieci naczyń krwionośnych. Proces unaczynienia (angiogeneza) odgrywa ważną rolę we wzroście nowotworów: nie mające odpowiedniego unaczynienia nowotwory osiągają wielkość zaledwie kilku milimetrów sześciennych i często giną. Komórki nowotworowe zaczynają wydzielać czynniki wzrostowe, które działają autokrynnie, prowadząc do jeszcze bardziej intensywnego namnażania się. Geny kodujące enzymy proteolityczne (np. kolageneza IV) ulegają ekspresji. Ekspresja nowych antygenów na powierzchni komórek rakowych indukuje wiele oddziaływań ze strony systemu obronnego gospodarza. Sekrecja czynników peptydowych przez komórki nowotworowe pobudza sąsiadujące komórki prawidłowe do wydzielania swoistych peptydów (ang. scatter factor), które z kolei potęgują mobilność i inwazyjność komórek nowotworu. W fazie progresji powstają liczne mutacje i aberracje chromosomalne. Pojawia się aneuploidia. Rozchwianie i dezorganizacja genomu komórek nowotworowych jest w tym okresie wyraźna. W fazie tej przejawia się działanie selekcji, prowadzące do powstawania klonów najbardziej przystosowanych do autonomicznego wzrostu.

Ostatnią fazą w rozwoju nowotworów złośliwych jest faza tworzenia przerzutów (metastaz). Komórki nowotworowe odrywają się od głównej masy

nowotworu i przenikają do układu naczyń krwionośnych lub limfatycznych. Krążące w krwiobiegu komórki zasiedlają inne tkanki oraz narządy i tworzą nowe skupiska komórek nowotworowych, zwane przerzutami.

Nieodwracalność procesu nowotworowego i fakt, że z komórki nowotworowej po podziale powstają zawsze dwie potomne komórki nowotworowe wskazuje, że istota procesu rakowacenia polega na trwałym uszkodzeniu informacji genetycznej.

12.4. Nowotwory złośliwe u człowieka są skutkiem działania wielu czynników etiologicznych

Doświadczenia na zwierzęcych modelach wskazują, że wiele różnorodnych czynników może indukować nowotwory złośliwe i pobudzać promocję oraz progresję procesu nowotworowego. Czynniki inicjujące nazywamy ogólnie czynnikami rakotwórczymi lub kancerogennymi, a te które pobudzają promocję — promotorami. Problematyka doświadczalnej kancerogenezy jest niezwykle złożona, a efektywność procesu zależy od wielu elementów, nie tylko takich, jak rodzaj czynnika rakotwórczego, ale również — gatunek zwierzęcia użytego do doświadczenia, tkanka lub narząd docelowy, aktywność enzymatyczna gospodarza (np. zdolność do metabolizowania i wydalania chemicznego kancerogenu, zdolność reperacji uszkodzeń materiału genetycznego itd.), współdziałanie czynnika rakotwórczego z innymi czynnikami takimi, jak mitogeny, promotory itp. Efekt zależy również od drogi wprowadzenia czynnika rakotwórczego, czasu i rytmu podawania, dawki i wielu innych parametrów. Ostatecznym sprawdzianem czy określony związek chemiczny, promieniowanie jonizujące lub zakażenie wirusowe może być zaliczone do kategorii czynników rakotwórczych u ludzi są obserwacja kliniczna i badania epidemiologiczne populacji ludzi ekspozowanych w naturalnych warunkach na określone czynniki szkodliwe. Wiele obserwacji wskazuje na złożoną etiologię chorób nowotworowych. W powstawaniu nowotworów u ludzi odgrywają rolę:

(a) czynniki środowiskowe (narażenie na czynniki rakotwórcze związane z wykonywaniem zawodu, palenie tytoniu, skażenie środowiska związkami chemicznymi, skażenie żywności, dieta);

(b) infekcje niektórymi wirusami, np. wirusem Epsteina-Barr, wirusami grupy brodawczaków (ang. papilloma), wirusami zapalenia wątroby oraz wirusem białaczki limfocytów T typu 1 (ang. human T cell leukemia virus type 1, TLV-1);

(c) dysfunkcje hormonalne;

(d) predyspozycje genetyczne.

Przypuszcza się, że czynniki środowiskowe przyczyniają się do powstawania ok. 80% ogólnej liczby przypadków nowotworów, infekcje wirusowe — do ok. 20%, a predyspozycje genetyczne, do 1–2%.

Wśród zwierząt (gryzonie, ptaki, naczelne) występują nowotwory związane niewątpliwie z zakażeniem wirusami, głównie typu RNA (retrowirusami). U zwierząt wyróżnia się dwie podstawowe grupy wirusów onkogennych: wirusy łagodne — indukujące nowotwory, zwykle białaczki u mniejszości zakażonych zwierząt i po bardzo długim okresie utajnienia, oraz wirusy ostre — wywołujące nowotwory złośliwe (mięsaki, raki) u większości zakażonych zwierząt i po krótkim okresie utajenia.

U ludzi infekcje wirusem Epsteina-Barr (należącym do grupy herpeswirusów) prowadzą do powstawania nowotworów typu chłoniaków (np. chłoniak Burkitta). Wirusy należące do grupy papilloma sprzyjają powstawaniu niektórych nowotworów zewnętrznych narządów płciowych, a ludzki wirus zapalenia wątroby HBV (ang. hepatitis B virus) sprzyja powstawaniu raków wątroby. Wirus białaczki limfocytów T typ 1, HTLV-1, jest przyczyną białaczek u mieszkańców niektórych regionów Japonii oraz Ameryki Środkowej. Wirusy opryszczki zwykłej (HSV II) podejrzewa się o udział w powstawaniu raka szyjki macicy, a niektóre adenowirusy mogą przyczyniać się do powstawania nowotworów nosogardzieli.

12.5. Immortalizacja komórek jest pierwszym zdarzeniem w procesie nowotworzenia *in vitro*, ale nie jest jednoznaczna z transformacją nowotworową

Infekcje wirusami zawierającymi DNA, jako materiał genetyczny, a więc wirusem Epsteina-Barr, brodawczaków czy HBV, nie są bezpośrednią przyczyną nowotworów. Wiele danych wskazuje, że to raczej przebyte infekcje sprzyjają powstawaniu nowotworów. Materiał genetyczny wirusów Epsteina-Barr i brodawczaków (ale nie HBV) zawiera geny, których białkowe produkty mogą prowadzić jedynie do immortalizacji komórek, ale nie do transformacji nowotworowej. Immortalizacja polega na zdolności komórek do nieograniczonego wzrostu w warunkach hodowli pozaustrojowej. Prawidłowe komórki przeniesione do kultur dzielą się i dają ok. 20–50 generacji, a następnie giną. Wśród prawidłowych komórek hodowlanych w kulturze może pojawić się linia komórek o nieograniczonym potencjale przeżywania, jeżeli zostaną zapewnione odpowiednie warunki wzrostu. Cechę tę nazywamy nieśmiertelnością komórek. Cecha ta powstaje w wyniku mutacji genów kontrolujących liczbę podziałów komórkowych (ang. senescence genes). Komórki tracą zdolność do kontrolowania liczby podziałów i zaczynają się dzielić w sposób nieograniczony. Stają się „nieśmiertelne”, ale nie mają cech komórek nowotworowych. Sądzi się, że komórki prawidłowe mają genetycznie zaprogramowany kres swojej egzystencji. Taki program śmierci komórkowej (apoptoza) ulega zaburzeniu we wczesnych okresach procesu rakowacenia (w fazie inicjacji?). Transformacja nowotworowa jest procesem trwałego przekształcenia komórki prawidłowej w komórkę nowotworową, czyli jest to „zezłoś-

liwienie” (zrakowacenie) komórki prawidłowej. Transformowane nowotworowo komórki mają zmieniony typ wzrostu w hodowlach komórkowych, a przeszczepione na myszy bezgraniczne dają wzrost typowy dla komórek nowotworowych. Oba pojęcia „immortalizacja” i „transformacja nowotworowa” znaczą więc co innego. Znamy nowotwory, które prawie zawsze są immortalizowane (np. u gryzoni), oraz nowotwory, które nie są immortalizowane (niektóre nowotwory u ludzi). Znamy również komórki, które są immortalizowane, ale nie mają cech komórek nowotworowych.

Infekcje wirusami zawierającymi DNA, a więc wirusami Epsteina-Barr, papilloma, HBV i innymi prowadzą często do zwiększonej destabilizacji aparatu genetycznego (genomu) gospodarza, stanu, który odgrywa ważną rolę w powstawaniu nowotworów (będzie o nim mowa w dalszej części rozdziału). Wirus HTLV-1, którego aparat genetyczny zawiera RNA, jest jedynym, do tej pory poznanym ludzkim wirusem onkogennym, wirusem wywołującym nowotwory (w tym przypadku białaczki).

12.6. Nowotwory u ludzi mogą się rozwijać na tle wrodzonych predyspozycji, ale stanowią one mały odsetek wszystkich nowotworów

Pojęcie predyspozycji genetycznych określa stan zwiększonego ryzyka zapadania na chorobę nowotworową. Jeśli przyjmiemy, że ryzyko u zdrowych osobników wynosi 1 : 1000, to u osób z „predyspozycją” ryzyko wynosi 1 : 10. Predyspozycje genetyczne są dziedziczne, innymi słowy są przekazywane potomstwu. Należy do nich zaliczyć:

(a) zespół predyspozycji do zapadania na niektóre choroby nowotworowe występujące w rodzinach, a więc nowotwory, takie jak siatkówczak oka (retinoblastoma), gruczolakowatość (polipowatość) rodzinna jelita grubego, gruczolakowatość mnoga wewnątrzwydzielnicza, guz Wilmsa;

(b) zespół predyspozycji, zwany umownie zespołem Li-Fraumeni (w tym przypadku predyspozycje są słabiej zaznaczone niż w przypadku pierwszym); w rodzinach, w których występuje zespół Li-Fraumeni obserwuje się zwiększoną skłonność do zapadania na niektóre nowotwory, w tym na raka sutka u kobiet;

(c) dziedziczny zespół predyspozycji, określony jako zespół wpływający na metabolizm związków rakotwórczych, dotyczy uszkodzeń enzymów biorących udział w metabolizmie związków rakotwórczych;

(d) zespół defektywnej reperacji uszkodzeń materiału genetycznego; należy do nich np. *xeroderma pigmentosum*, *ataxia-telangiectasia*; chorzy z tymi defektami genetycznymi wykazują zwiększoną skłonność do zapadania na choroby nowotworowe.

Konstytucja genetyczna (ang. genetic make-up) odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w indywidualnej „wrażliwości” na proces nowotworowy. U ludzi

znamy niewiele cech genetycznie uwarunkowanych, które odpowiadają za osobniczą podatność lub oporność na indukcję procesu nowotworowego. U zwierząt doświadczalnych, zwłaszcza u myszy, konstytucja genetyczna i genetyczne różnice międzyszczepowe są od dawna znane jako czynniki wpływające w sposób zdecydowany na indukcję i przebieg procesu nowotworowego. U ludzi nowotwory uwarunkowane predyspozycją genetyczną stanowią niewielki odsetek (kilka procent) wszystkich nowotworów złośliwych.

12.7. Molekularnym podłożem procesu nowotworowego są mutacje genetyczne komórek somatycznych

Czynniki kancerogenne, zdolne do indukowania nowotworów i to zarówno czynniki fizyczne (np. promieniowanie ultrafioletowe, rentgenowskie), jak i chemiczne (różnego typu związki chemiczne) czy też biologiczne (wirusy onkogenne typu DNA lub RNA, czyli retrowirusy) cechuje zdolność do oddziaływania i swoistego modyfikowania materiału genetycznego komórki. Badania doświadczalne, obserwacje kliniczne i epidemiologiczne dowodzą, że nowotwory są wynikiem zmian mutacyjnych pewnych grup genów.

Fenotyp nowotworowy, czyli zespół charakterystycznych cech strukturalno-funkcjonalnych komórek nowotworowych, powstaje i uwidacznia się w wyniku dwóch różnych typów mutacji: mutacji o charakterze dominującym i mutacji o charakterze recesywnym.

Geny, których dominujące mutacje prowadzą do nowotworzenia, identyfikuje się w teście transformacji nowotworowej. Wyizolowany z nowotworu ludzkiego DNA wprowadza się do nienowotworowych, immortalizowanych komórek mysich (np. linia NIH 3T3) i obserwuje się pojawianie ognisk (foci) złożonych z komórek, które mają zdolność do tworzenia nowotworów po przeszczepieniu na myszy bezgrasiczne — tzw. myszy nagie (ang. nude). U takich zwierząt ze zniesioną odpornością komórkową przeszczepiona obcogatunkowa tkanka nowotworowa rozrasta się w sposób autonomiczny, agresywny i doprowadza do śmierci gospodarza. Inny, niezwykle ważny sposób identyfikacji genów dominujących polega na analizie genów przenoszonych za pośrednictwem wirusów onkogennych typu RNA — retrowirusów u gryzoni i ptaków.

Udział mutacji o charakterze recesywnym w powstawaniu nowotworów ujawniono po raz pierwszy w badaniach, w których przeprowadzono fuzję (hybrydyzację) komórek prawidłowych z komórkami nowotworowymi. Zaobserwowano wówczas wyraźną rewersję fenotypu nowotworowego u powstałej hybrydy komórkowej. Wprowadzenie do komórki nowotworowej nie zmutowanych genów komórki prawidłowej powodowało wyraźną supresję fenotypu nowotworowego: zmutowane geny komórki nowotworowej nie były w stanie

ujawnić swoich aktywności. Geny, których mutacje recesywne prowadzą do nowotworzenia, nazwano również genami supresorowymi transformacji nowotworowej lub antyonkogenami. Wprowadzone do ludzkich komórek nowotworowych prawidłowe, nie zmutowane geny supresorowe likwidują skutki innych mutacji prowadzących do powstania transformacji nowotworowej.

W przeciwieństwie do identyfikacji genów dominujących biorących udział w nowotworzeniu, identyfikacja genów recesywnych przysparza więcej trudności. Opiera się ona przede wszystkim na założeniu, że domniemany gen recesywny znajduje się w tym miejscu chromosomu, które podczas nowotworzenia ulega uszkodzeniu, np. delecji, dalej na skomplikowanej mapowaniu fragmentów DNA ulegających uszkodzeniom oraz na teście rewersji fenotypu nowotworowego po wprowadzeniu do komórek nowotworowych analizowanego fragmentu DNA.

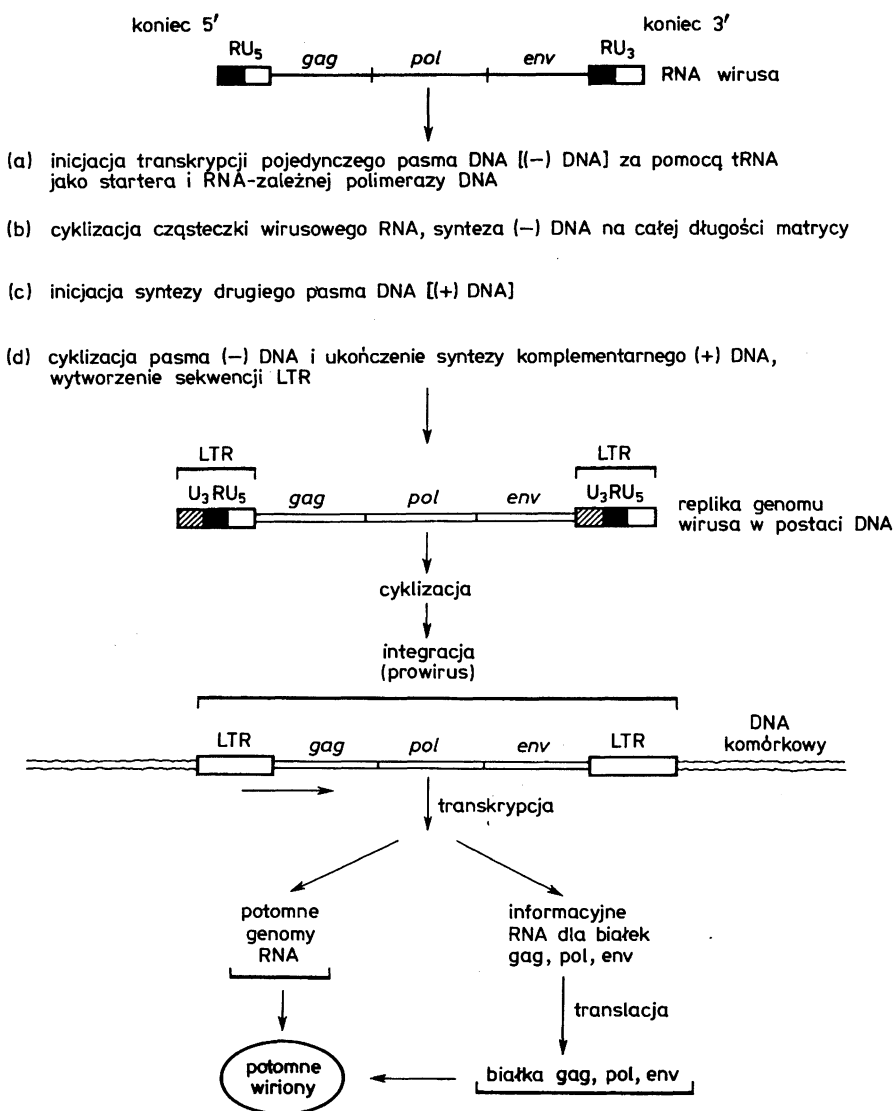
12.8. Wirusy onkogenne typu RNA należące do grupy retrowirusów

Wszystkie wirusy typu RNA mające potencjał onkogenny są retrowirusami. Genom (RNA) tych wirusów w cyklu życiowym ulega przepisaniu (retranskrypcji) na dwuniciowy DNA, który zostaje następnie włączony w wyniku rekombinacji do genomu zakażonej komórki. Zintegrowany genom retrowirusa w postaci DNA nazywamy prowirusem. Prowirusowy DNA replikuje się razem z DNA komórki.

Krótkie omówienie biologii retrowirusów onkogennych jest pomocne w zrozumieniu roli komórkowych genów *onc* (*c-onc*) w kancerogenezie.

12.9. Wirusy typu RNA przechodzą złożony cykl życiowy w zainfekowanej komórce

Po wnikięciu cząsteczki retrowirusa do komórki następuje usunięcie otoczki wirusa i uwolnienie wirusowego RNA. Kodowana przez RNA wirusa RNA-zależna polimeraza DNA (rewertaza) kopiuje jednoniciowe cząsteczki RNA wirusa na dwuniciowy prowirusowy DNA. Swoiste sekwencje na obu końcach cząsteczki RNA wirusa są absolutnie niezbędne do skutecznego i wiernego odtworzenia całego genomu wirusa w postaci DNA. Sekwencje te przyjmują postać 2 identycznych bloków, zwanych LTR, flankujących prowirusa. Zsyntetyzowany prowirusowy DNA wchodzi do jądra komórki i integruje się z chromosomalnym DNA. Geny zintegrowanego prowirusa ulegają transkrypcji i translacji. W cytoplazmie zakażonej komórki gromadzą się ostatecznie wszystkie komponenty, umożliwiające wytworzenie potomnych wirionów retrowirusa (rys. 12.1).



Rys.12.1. Schemat cyklu życiowego renowirusów. Wstępne etapy oznaczone symbolami (a)–(d) do momentu cyklizacji zachodzą w cytoplazmie komórki zakażonej. Replika renowirusa w postaci cyklicznego, dwupasmowego DNA przemieszcza się do jądra komórki, która ulega integracji z chromosomalnym DNA przyjmując formę prowirusa. Transkrypty prowirusa stanowią z jednej strony genomowe cząsteczki RNA dla potomnych wirionów, a z drugiej — służą jako mRNA do transkrypcji białek niezbędnych do odtworzenia potomnych wirionów (wg M. Chorąży, „Współczesne poglądy na powstawanie nowotworów układu krwiotwórczego”, w: *Hematologia kliniczna*, red. K. Janicki, PZWL, Warszawa 1991, t. 1, s. 303 — za zgodą)

12.10. Retrowirusy o ostrym działaniu onkogennym zawierają gen transformujący (onkogen wirusowy *v-onc*)

Występujące u zwierząt retrowirusy onkogenne to głównie:

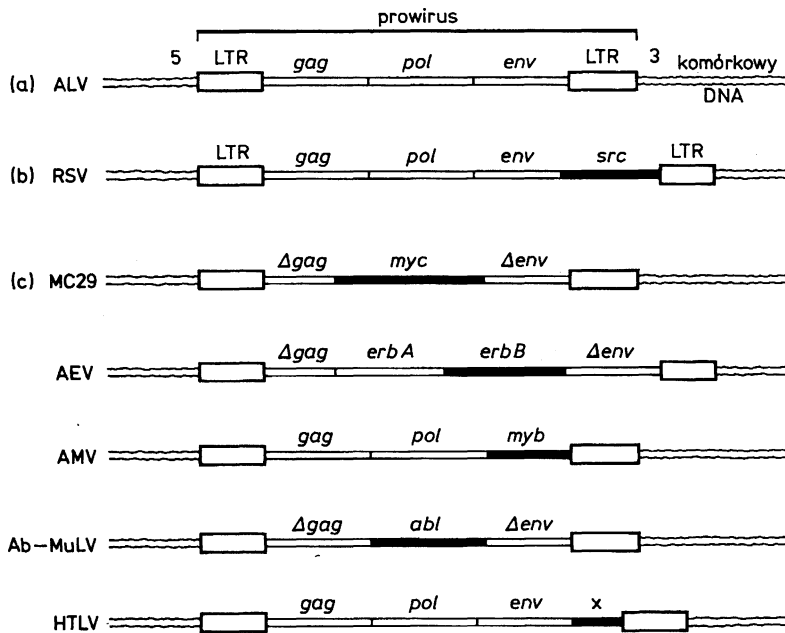
- (a) łagodne wirusy transformujące;
- (b) ostre wirusy transformujące.

Łagodne retrowirusy transformujące są prototypem wirusów ostrych. Ich genom stanowi mała cząsteczka RNA, zwykle zawierająca poniżej 9000 nukleotydów. Każdy wirion zawiera dwie kopie RNA złączone u końców 5' wiązaniami wodorowymi. Genom łagodnego, zdolnego do replikacji wirusa zawiera trzy geny: *gag*, *pol* oraz *env* i jest ograniczony od końca 5' i 3' swoistymi sekwencjami nie kodującymi (w fazie prowirusa sekwencje te oznaczone są symbolem LTR; ang. long terminal repeats) (rys. 12.1). Geny *gag* i *env* kodują białka strukturalne i otoczkowe wirionu, gen *pol* koduje RNA-zależną polimerazę DNA (odwrotną transkryptazę) — enzym niezbędny do przepisania RNA wirusa na DNA prowirusa. Sekwencje flankujące są niezbędne do syntezy DNA prowirusa. Łagodne wirusy transformujące nie zawierają genu *onc*. Ich efekt transformujący wywołany jest mechanizmem „insercji promotora”.

12.11. Ostre wirusy onkogenne są zwykle niezdolne do replikacji wskutek utraty części genomu i wymagają obecności wirusów wspomagających

Prototypowym i jedynym zdolnym do replikacji ostrym retrowirusem transformującym jest wirus mięsaka Rousa (RSV). Wirus ten, oprócz trzech wspomnianych wyżej genów, zawiera transformujący onkogen o symbolu *v-src* zlokalizowany między genem *env* i swoistą sekwencją LTR końca 3'. Gen *v-src* jest odpowiedzialny za indukcję mięsaków u ptaków. Komórki mięsaka powstają wskutek transformacji nowotworowej prawidłowych fibroblastów. Mutacja genu *v-src* znosi zdolność wirusa RSV do indukcji mięsaków.

Pozostałe ostre wirusy transformujące są niezdolne do replikacji wskutek utraty w całości lub części „własnych” genów. Wirusy tej klasy wymagają do przeniesienia infekcji z komórki do komórki i przejścia swojego cyklu życiowego obecności wirusów „wspomagających” (ang. helper viruses), dysponujących pełnym zestawem trzech genów niezbędnych do wejścia w fazę prowirusa i syntezy białek stanowiących składowe części wirionu. Schemat organizacji „łagodnych” retrowirusów, „ostrego” kompetentnego do replikacji retrowirusa RSV oraz innych „ostrych”, ale niekompetentnych do replikacji retrowirusów pokazuje rysunek 12.2.



Rys.12.2. Schemat organizacji „łagodnego” (a) i „ostrego” (b) wirusa transformującego oraz kilku ostrych wirusów transformujących, defektywnych pod względem zdolności do replikacji (c). Utrata zdolności do replikacji powstaje na skutek utraty jednego z genów własnych (por. np. AMV i ALV) lub częściowej jego (ich) delecji (Δ) (por. up. MC29 i ALV) (wg M. Chorąży, „Współczesne poglądy na powstawanie nowotworów układu krwiotwórczego”, w: *Hematologia kliniczna*, red. K. Janicki, PZWL, Warszawa 1991, t. 1, s. 304 — za zgodą)

12.12. Występujące w ostrych retrowirusach geny transformujące (geny *v-onc*) pochodzą z komórek eukariotycznych

Transformujące onkogeny występujące w genomie ostrych onkogennych retrowirusów (czyli geny *v-onc*) nie są konieczne do replikacji i cyklu życiowego wirusa. Są one niezbędne do transformacji nowotworowej zakażonej, kompetentnej komórki zwierzęcej. Genom retrowirusów zawiera zwykle jeden gen transformujący, rzadziej dwa. Każdy gen *v-onc* indukuje zwykle jeden typ nowotworu, chociaż znane są przykłady indukcji dwóch lub więcej typów nowotworów. W końcu lat 70. Bishop i Varmus wykazali, że radioaktywna sonda genu *v-src* hybrydyzowała z DNA nie zakażonych wirusem RSV komórek kurczęcia. Analogiczne doświadczenia wykonano z zastosowaniem sond innych onkogenów znalezionych w ostrych retrowirusach i DNA izolowanych z różnych, nie zakażonych komórek wielu gatunków zwierząt. Okazało się, że wszystkie prawidłowe DNA zawierały sekwencje homologiczne do wirusowych genów *onc*. Te komórkowe homologi *v-onc* nazwano protoonkogenami lub komórkowymi genami *onc* (*c-onc*). Na podstawie tych badań

wysunięto hipotezę, że łagodne renowirusy w trakcie zakażenia komórek eukariotycznych pobrały w wyniku transdukcji komórkowe geny *onc*, co nadało tym wirusom silny potencjał transformacyjny. Geny *c-onc*, które uległy transdukcji, akumulują pewne zmiany strukturalne, które odpowiadają za efekt transformacyjny. Ponadto sekwencje *onc* wprowadzone w genom renowirusa znajdują się pod wpływem aktywnych sekwencji promotorowych zlokalizowanych we fragmentach LTR prowirusa. W procesie infekcji sekwencje *v-onc* ulegają silnej ekspresji, dając duży nadmiar białek onkogennych.

12.13. Komórkowe protoonkogeny są przekształcane w onkogeny w wyniku różnych mutacji

Do tej pory w organizmach eukariotycznych zidentyfikowano ok. stu protoonkogenów (*c-onc*). Zmutowane formy tych genów — onkogeny (geny transformacyjne) biorą udział w procesie nowotworzenia. Protoonkogeny występujące w komórkach eukariotycznych oznaczamy symbolem *c-onc*, w odróżnieniu od onkogenów występujących w renowirusach (*v-onc*). Przejście protoonkogenu w onkogen polega najczęściej na różnych formach mutacji zmieniających strukturę kodowanego białka, a zatem i jego swoistą aktywność bądź też zmieniających ilość białka prawidłowego lub jego ekspresję w nieodpowiednim miejscu i czasie. Aktywacja protoonkogenu nie zawsze jest spowodowana mutacją (np. mutacją punktową) zmieniającą strukturę kodowanego białka. Aktywacja protoonkogenu wiąże się niekiedy z procesem translokacji protoonkogenu w miejsca, w których znajdują się sekwencje DNA wzmacniające transkrypcje genów (ang. enhancer). Przykładem może być przeniesienie protoonkogenu *c-myc* w sąsiedztwo genów kodujących ciężki łańcuch immunoglobuliny. Translokację taką stwierdza się w przypadku chłoniaków Burkitta. Aktywacja protoonkogenu może zajść przez zwielokrotnienie liczby kopii genu (amplifikacja genu). W obu ostatnich przypadkach produkt genu jest prawidłowy, ale ilość produktu (białka) dramatycznie zwiększa się.

Wydaje się, że aktywacja protoonkogenów jest niezwykle swoista dla poszczególnych genów oraz kodowanych przez nie białek oraz, że niektóre geny aktywowane są wyłącznie w wyniku mutacji punktowych, inne za pośrednictwem translokacji, a jeszcze inne przez amplifikację lub fuzję z określonymi genami.

12.14. Białka kodowane przez protoonkogeny spełniają kluczowe funkcje biologiczne w komórce

W tabeli 12.1 podano najważniejsze grupy onkogenów oraz kodowanych przez nie białek. Wśród nich do najlepiej zbadanych należą geny kodujące czynniki wzrostowe, receptory czynników wzrostowych, enzymy typu kinaz,

Tabela 12.1 Rodzaje białek kodowanych przez niektóre protoonkogeny

1. Czynniki wzrostu: Sis — łańcuch β płytkowego czynnika wzrostu PDGF Hst, Int-2 — białka podobne do czynnika wzrostu fibroblastów FGF Int-1 — czynnik wzrostu?
2. Receptory oraz białka wykazujące aktywność kinazy tyrozynowej: Src — związane z błonami komórkowymi, niereceptorowe białka o aktywności kinazy tyrozynowej Erb B — skrócony receptor EGF z aktywnością kinazy tyrozynowej Neu — białko mające charakter receptora z aktywnością kinazy tyrozynowej Fms — mutant receptora CSF-1 z aktywnością kinazy tyrozynowej Abl — kinaza tyrozynowa
3. Receptory nie wykazujące aktywności kinazowej: Mas — receptor angiotensyny
4. Białka G — białka wiążące GTP, wykazujące aktywność GTPazową, związane z błonami komórkowymi: H-Ras } K-Ras } — białka związane z błonami, wiążące GTP i wykazujące aktywność GTPazy N-Ras }
5. Białka cytoplazmatyczne wykazujące aktywność kinazy serynowo-treoninowej: Pim-1 } Mos } — cytoplazmatyczne białka o aktywności kinazy serynowej Raf }
6. Regulatory cytoplazmatyczne: Crk — SH-2/3 białko wiążące się do białek zawierających fosfotyrozynę
7. Jądrowe czynniki transkrypcyjne: Myc } Myb } — białka wiążące się ze swoistymi sekwencjami DNA Fos } Jun — białko wchodzące w skład czynnika transkrypcyjnego AP-1 Erb A — recesywnie dominujący mutant receptora tyroksyny (t3) Rel — recesywnie dominujący mutant białka NF- κ B Ets — białko wiążące się z DNA Ski — czynnik transkrypcyjny Pbx — białko chimeryczne E2A — homeobox Scl — czynnik transkrypcyjny ? Lyl-1 — czynnik transkrypcyjny ? Myl/RAR α — czynnik transkrypcyjny ?
8. Białka nie sklasyfikowane (różne): Dbf-C — cytoplazmatyczne białko szkieletowe ? Bcl-2 — białko mieszczące się w błonie plazmatycznej ?

geny kodujące białka wiążące GTP i wykazujące aktywność GTPazową oraz geny kodujące białka, które biorą udział w regulacji transkrypcji.

Białka kodowane przez protoonkogeny mają wiele funkcji, z których wymienimy trzy główne funkcje biologiczne.

1) Białka onc o funkcji receptorów oraz wykazujące aktywność fosfokinazową. Fosforylacja białek zachodzi pod wpływem dwóch typów kinaz: swois-

tych dla seryny lub treoniny oraz swoistych dla tyrozyny. Białka onc kodujące receptory czynników wzrostowych ulegają autofosforylacji po związaniu receptora z czynnikiem wzrostowym. Fosforylacja dotyczy reszt tyrozynowych w wewnątrzkomórkowej (podbłonowej) części cząsteczki receptora. Inne białka onc wykazują aktywność kinazową w stosunku do białek cytoplazmatycznych i jądrowych.

2) Białka G biorące udział w transmisji sygnału. Najlepiej poznanym białkiem jest białko Ras, wiążące GTP i hydrolizujące GTP do GDP w obecności białka GAP (ang. GTPase — activating protein). Mutanty p21^{ras} nie są w stanie hydrolizować GTP do GDP. Przypuszcza się, że hydroliza GTP do GDP odgrywa ważną rolę w transmisji sygnału mitogennego i proliferacji komórek.

3) Regulacja transkrypcji genów. Najlepiej poznano klasyczne czynniki transkrypcyjne typu Rel, Jun, Fos, Myc. Czynniki transkrypcyjne Myc i Fos mogą brać udział w replikacji DNA. Stosunkowo dobrze poznano heterodimer Jun-Fos mający funkcję plejotropowego aktywatora transkrypcji.

12.15. Niektóre protoonkogeny kodują białka spełniające funkcję receptorów i mające swoistą aktywność fosfokinaz

Ze względu na lokalizację w komórce kinazy tyrozynowe, biorące udział w fosforylacji białek, można podzielić na trzy kategorie:

1) Kinazy, które znajdują się w błonach komórkowych. Zawierają dużą część zewnątrzkomórkową, domenę transmembranową oraz domenę wewnątrzkomórkową. Są to typowe receptory czynników wzrostu, np. receptor dla płytkowego czynnika wzrostu PDGF, (ang. platelet derived growth factor), EGF, GF itp.

2) Kinazy, które mieszczą się na terenie cytoplazmy, związane z błonami (np. kinaza Src).

3) Kinazy występujące na terenie jądra komórkowego (kinaza Abl).

Do grupy kinaz serynowo-treoninowych zalicza się cztery kinazy odgrywające ważną rolę w proliferacji komórkowej: Mos, Raf, kinazę białkową C (PKC, ang. protein kinase C) oraz białkową kinazę stanowiącą składnik czynnika MPF (ang. maturation-mitosis promoting factor), której odpowiednik u drożdży nosi nazwę *cdc2/CDC28* i fosforyluje cykliny.

Kinaza kodowana przez gen *c-raf* bierze udział w przekazywaniu sygnału mitogennego od receptora błonowego do jądra i fosforyluje niektóre czynniki transkrypcyjne.

Białkowa kinaza C (PKC) jest enzymem, w którego aktywacji ważną rolę odgrywają metabolity hydrolizy fosfatydyloinozytolu 4,5-difosforanu. PKC jest enzymem aktywowanym również przez wiele czynników, zwanych czynnikami promującymi transformację nowotworową, np. estrami forbolu.

Fosforylacja, w której biorą udział kinazy typu cdc2 w kompleksie z różnymi cyklinami odgrywa ważną rolę w procesach mitozy. Sądzi się, że biorą one bezpośredni udział w przejściu komórek z fazy G1 do S i z G2 do M. Podczas cyklu mitotycznego kompleksy kinaza – cyklina fosforylują p53 oraz kinazy kodowane przez geny *c-src* i *c-abl*. Funkcjonalne konsekwencje takich fosforylacji nie są jednak w pełni znane.

12.16. Protoonkogeny z rodziny *ras* kodują białko o aktywności GTPazy

Dwa rodzaje GTPaz biorą udział w proliferacji komórkowej:

- (a) białko G składające się z trzech różnych podjednostek;
- (b) monomeryczne białko Ras (oraz białka kodowane przez rodzinę genów podobnych do *ras*).

W wyniku hydrolizy GTP do GDP aktywowane zostają dwa białka: cyklaza adenylowa i fosfodiesteraza. Do tej pory nie zostało jednak poznane białko, które zostaje pobudzone („białko efektorowe”) w wyniku hydrolizy GTP przez białka Ras. Niemniej jednak białko Ras odgrywa ważną rolę w transformacji nowotworowej. Inaktywacja białka Ras przez przeciwciała hamuje mitogenną aktywność innych onkogenów oraz ich właściwości transformacyjne. Sugeruje to, że w ciągu reakcji biochemicznych, które biorą udział w przekazywaniu sygnałów mitogennych Ras leży poniżej kinaz tyrozynowych, ale powyżej lub obok Raf (kinazy serynowo-treoninowej). Białko GAP (ang. GTPase activating protein) wzmacnia aktywność GTPazową białka Ras i pośrednio wpływa na proliferację komórkową.

12.17. Niektóre czynniki transkrypcyjne są produktami protoonkogenów

Wśród czynników transkrypcyjnych stosunkowo najlepiej poznane są białka transkrypcyjne Jun i Fos, które jako heterodimer Jun–Fos tworzą czynnik AP-1. Czynniki AP-1 rozpoznaje krótką sekwencję TGACT(C/A)A, która znajduje się w promotorach i sekwencjach wzmacniających wielu genów. AP-1 odgrywa rolę w indukcji transkrypcji przez estry forbolu (substancje promujące transformację nowotworową).

Czynnik transkrypcyjny NF- κ B składa się z dwóch podjednostek 65kDa i 50kDa, z których mniejsza jest homologiczna do białka Rel (kodowanego przez onkogen *c-rel*). Zdolność wiązania się z DNA wykazuje jednostka mniejsza. NF- κ B w postaci nieaktywnej znajduje się w cytosolu. Sądzi się, że obie jednostki 65kDa i 50kDa wiążą dodatkowo białko I κ B, o charakterze inhibitora. Po fosforylacji białka I κ B następuje dysocjacja ufosforylowanego inhibitora i białko NF- κ B przemieszcza się do jądra, wiążąc się z określonymi promotorami.

Do swoistych czynników transkrypcji zalicza się także ErbA — białko stanowiące receptor hormonu tyroksyny. Receptor ten, znajdujący się zawsze

w jądrze, po związaniu hormonu przyłącza się do DNA w ściśle określonych miejscach, w promotorach zawierających miejsce TRE (ang. thyroid hormone response element).

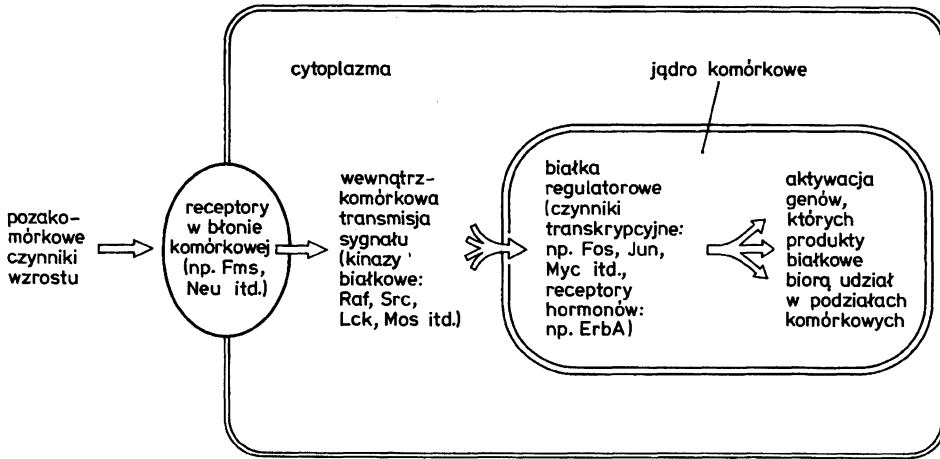
Białkami mającymi wszelkie właściwości czynników transkrypcyjnych są Myc i Myb. Sądzi się, że białko Myc dopiero po utworzeniu heterodimeru z białkiem Max staje się właściwym czynnikiem transkrypcyjnym. Białko Max jest małą cząsteczką wykazującą homologię z C-terminalnym odcinkiem białka Myc. Region homologii obu białek ma charakterystyczną organizację (motyw) w sekwencji aminokwasów: 5' — region zasadowy — heliks–skręt–heliks — suwak leucynowy — 3'. Struktura ta umożliwia prawdopodobnie wiązanie się Myc/Max z DNA.

12.18. Produkty białkowe protoonkogenów biorą udział w transmisji sygnału do komórki

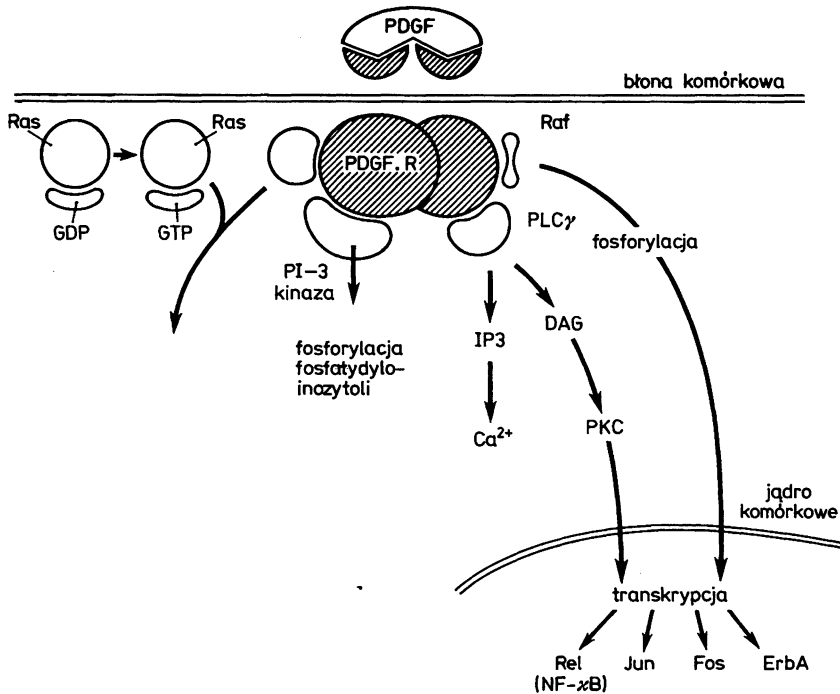
Kilka nowych genów, które kodują białka mające właściwości czynników transkrypcyjnych odkryto analizując sekwencje DNA, które podczas powstawania białaczek ulegały translokacji w pobliżu genu kodującego receptory dla limfocytów T. Są to geny o symbolu *scf*, *lyl-1*. W rzadko spotykanej białaczce pre B-ALL (ang. pre B-acute lymphoblastic leukaemia) stwierdzono obecność translokacji (1:19), w wyniku której powstawało fuzyjne (chimeryczne) białko (pbx) o cechach czynnika transkrypcyjnego. Część N-końcowa białka składała się z białka E2A, część C-końcowa — z homeodomeny genu o symbolu *prl*. W ostrej białaczce promielocytarnej zidentyfikowano translokację t(15:17), w wyniku której powstaje nowy gen fuzyjny (*myl/RAR α*), składający się z części receptora dla kwasu retinowego α (RARA) oraz genu mieszczącego się w chromosomie 15.

Kodowane przez wymienione grupy onkogenów białka biorą udział w procesach regulacji podziałów komórkowych. Kodowane przez prawidłowe geny białka biorą udział w transmisji sygnału mitotycznego od receptora czynnika wzrostowego, mieszczącego się w błonie komórkowej, poprzez cytoplazmę do jądra komórkowego, gdzie następuje aktywacja białek regulacyjnych odgrywających rolę w transkrypcji genów cyklu komórkowego (rys. 12.3). Przypuszcza się, że rozregulowanie podziałów komórkowych podczas nowotworzenia polega głównie na „prowokowaniu” komórki przez zmutowane białka do stałych podziałów. Komórki nowotworowe nie reagują na zewnątrzkomórkowe sygnały regulujące jej podziały, ani na sygnały do różnicowania się. Nie reagują zarówno na sygnały pozytywne, jak i na negatywne. Wchodzą jednak w podziały mitotyczne w wyniku „fałszywych” sygnałów mitogennych wytworzonych przez zmutowane geny.

Szczegółowe badania wykazują jak złożona jest droga recepcji i przekazywania sygnału mitogennego (rys. 12.4). Związanie przez receptor sygnału mitogennego (w tym przypadku płytkowego czynnika wzrostu — PDGF)



Rys.12.3. Rozmieszczenie i występowanie na terenie komórek białek kodowanych przez niektóre protoonkogeny. Pokazano tylko najbardziej znane białka i tylko te, które biorą udział w transmisji sygnału związanego z podziałami komórkowymi. Strzałki wskazują kierunek przesyłania sygnału (wg S. Szala, Nowotwory i geny, *Kosmos*, 40, 1991, 311–317 — za zgodą)



Rys.12.4. „Aktywny” kompleks receptora czynnika wzrostu i transmisja sygnału mitogennego. Strzałki wskazują kierunek prawdopodobnych reakcji biochemicznych. PDGF — płytkowy czynnik wzrostu; PDGF.R — receptor PDGF; Raf — kinaza serynowo-treoninowa; Ras — białko o aktywności GTPazowej; PLC γ — fosfolipaza C γ ; PI-3 kinaza — 3-kinaza fosfatydyloinozytoli; GTP — białko aktywujące GTPazę; DAG — diacyloglicerol; PKC — kinaza białkowa C; IP3 — 1,4,5-trifosforan inozytoli; Rel, Jun, Fos, ErbA — czynniki transkrypcyjne kodowane przez protoonkogeny

pociąga za sobą wiele reakcji. Dimeryczny receptor ze związanym czynnikiem wzrostu przyłącza wiele białek, tworząc swojego rodzaju „kompleks aktywny”. W skład tego kompleksu wchodzi enzymatyczne białko Raf (o aktywności swoistej kinazy serynowo-treoninowej), fosfolipaza C γ (PCL γ) biorąca udział w metabolizmie fosfatydyloinozytolu, kinaza fosfatydyloinozytolu (kinaza PI-3) oraz białko GAP (białko aktywujące GTPazową funkcję białka Ras). „Kompleks aktywny” receptora inicjuje wiele reakcji:

- (a) reakcję związaną z aktywacją białka Ras;
- (b) reakcję fosforylacji inozytolu;
- (c) reakcję aktywacji kinazy C, biorącej udział m.in. w fosforylacji czynnika transkrypcyjnego, który należy do rodziny onkogenów Rel (NF- κ B);
- (d) bezpośredniej fosforylacji jednego z czynników transkrypcyjnych Jun przez kinazę Raf.

Końcowym etapem transmisji sygnału mitogennego jest aktywacja czynników transkrypcyjnych. Czynniki te mają działanie pleiotropowe i biorą udział w regulacji transkrypcji genów, których produkty są niezbędne do procesów podziału i namnażania.

12.19. Wzrost i różnicowanie komórek są w stanie wzajemnej równowagi

Wiele badań wskazuje jak ważną i złożoną rolę odgrywają czynniki wzrostowe w regulacji proliferacji komórek i w ich różnicowaniu. W większości przypadków czynniki wzrostowe wykazują dużą swoistość tkankową, ale ich wiązanie i reakcje, jakie prowokują w komórkach zależą od tzw. kontekstu metabolicznego, w jakim znajdują się komórki (ta sama komórka, będąca w różnej fazie swojego życia może w różny sposób reagować na dany czynnik wzrostowy). Niektóre czynniki wzrostowe są wielofunkcyjne: w zależności od typu komórek mogą bądź hamować wzrost komórek, bądź stymulować ich podziały.

Szczególnie interesująca wydaje się rola czynników wzrostu w procesach różnicowania komórkowego. Można przytoczyć dane, które wskazują, że czynniki wzrostowe (ich kombinacje, czas pojawienia się itd.) determinują określoną liczbę podziałów komórkowych (swojego rodzaju zegar mitotyczny), po przejściu których komórki ulegają końcowemu zróżnicowaniu. Wydaje się, że liczba podziałów komórkowych zależy od puli dostępnych czynników wzrostowych oraz ich stopnia wyczerpywania (zaniku). Zmniejszanie się potencjału proliferacyjnego komórek powoduje ich różnicowanie. Całkowity brak czynników wzrostowych prowadzi do kontrolowanej samodestrukcji komórek (*apoptosis*). Warto dodać, że jeden z onkogenów *bcl-2* może odgrywać ważną rolę w zahamowaniu kontrolowanej samodestrukcji komórek. W niektórych typach chłoniaków *bcl-2* ulega translokacji w pobliżu genu ciężkiego łańcucha immunoglobuliny i ulega ciągłej transkrypcji. Sądzi się, że wzmożona synteza białek Bcl-2 zapobiega programowanej śmierci komórek B (limfocytów B).

Bcl-2 działa więc nie tyle jak czynnik zmuszający komórki B do podziałów, co raczej jako swoisty czynnik immortalizujący komórki B.

W procesie nowotworzenia dochodzi do zaburzenia subtelnej równowagi między proliferacją a różnicowaniem. W procesach nowotworzenia komórki dzielą się w sposób nie kontrolowany i nie osiągają stanu finalnego różnicowania funkcjonalnego. Wydaje się zatem, że komórki nowotworu zaczynają produkować, wytwarzać własne czynniki wzrostowe i w ten sposób coraz bardziej autonomizują własne podziały komórkowe (tzw. autokrynną regulacją wzrostu). Z drugiej strony wiele mutantów białkowych, odgrywających rolę w transmisji sygnału mitogennego, sprzyja powstawaniu „fałszywych” sygnałów mitogennych prowokujących komórki nowotworu do stałych, permanentnych podziałów komórkowych.

12.20. Geny supresorowe transformacji nowotworowej

Do grupy genów supresorowych transformacji nowotworowej zalicza się te geny, których białkowe produkty mogą hamować powstawanie fenotypu nowotworowego. Mutacje genów supresorowych (często typu delecji) są związane z pojawianiem się fenotypu nowotworowego i występują w wielu rodzajach nowotworów złośliwych.

Punktem wyjścia do identyfikacji tych genów były doświadczenia nad hybrydyzacją komórek somatycznych prawidłowych z komórkami nowotworowymi. Prowadzono hybrydyzację komórek nowotworowych z komórkami prawidłowymi tego samego (np. mysz \times mysz) lub różnych gatunków (np. mysz \times człowiek). Głównym efektem fuzji komórkowych było stłumienie fenotypu nowotworowego. Wprowadzenie do komórek nowotworowych pojedynczych (zwykle obcogatunkowych) chromosomów pozwoliło następnie na wskazanie tych chromosomów, które były odpowiedzialne za efekt supresyjny. Genetyczna analiza populacyjna nowotworów dziedzicznych, zwłaszcza dwóch postaci retinoblastoma u dzieci (dwu- i jednostronny nowotwór gałki ocznej — siatkówczak) wykonana przez Knudsona przyczyniła się do sformułowania hipotezy o dwustopniowej mutacji w obrębie tego samego locus (Rb) mającego funkcje supresorowe. Analogiczne analizy populacyjne w przypadku innych nowotworów uwarunkowanych dziedzicznie (guz Wilmsa, niektóre postaci raka sutka) potwierdziły hipotezę o genach supresorowych. Wyniki analizy cytogenetycznej, a następnie analizy molekularnej loci w przypadku nowotworów występujących w rodzinach o wyraźnej predyspozycji genetycznej potwierdziły hipotezę dwustopniowej mutacji. Predyspozycja polega na dziedzicznym przekazaniu mutacji w obrębie pojedynczego allelu (np. w locus Rb w przypadku siatkówczaka). W komórkach somatycznych potomka mamy więc stan heterozygotyczności. Proces nowotworowy może pojawić się, gdy nastąpi eliminacja funkcji pozostałego, normalnego allelu, czyli zajdzie utrata heterozygotyczności (ang. LOH — loss of heterozygozity). Utrata heterozygotyczności może zajść w wyniku nondysjunkcji (powstaje wówczas stan

Tabela 12.2. Niektóre z lepiej poznanych genów supresorowych odgrywających rolę w powstawaniu nowotworów u ludzi

Symbol genu	Miejsce w chromosomie (locus)	Typ nowotworu
<i>Rb1</i>	13q14	siatkówczak (retinoblastoma), kostniakomięsak (osteosarkoma), rak sutka, pęcherza, płuc
<i>p53</i>	17q12–13.3	gwiazdziak (astrocytoma), rak sutka, okrężnicy, płuc, kostniakomięsak (osteosarkoma)
<i>WT1</i>	11p13	guz Wilmsa (nerki) u dzieci
<i>DCC</i>	18q21	rak okrężnicy
<i>MCC</i>	5q21	rak okrężnicy
<i>APC</i>	5q21	rak okrężnicy
<i>MEN-1</i>	11q13	nowotwory przytarczyc, trzustki, przysadki i nadnerczy
<i>NF1</i>	17q11.2	neurofibromatoza, typ 1
<i>PTPγ</i>	3p21	rak płuca, rak nerki
<i>LCFS2</i>	2	rak okrężnicy
<i>BRCA1</i>	17q21	rak sutka, rak jajnika
<i>VHL</i>	3p25	rak nerki, naczyniak płodowy, barwiak nadnerczowy

hemizygotyczności), nondysjunkcji i duplikacji, rekombinacji mitotycznej albo miejscowej aberracji.

Te doświadczenia pozwoliły ujawnić grupę genów supresorowych u ludzi (tab. 12.2). Mutacje w tych genach związane są z występowaniem różnych typów nowotworów.

12.21. W następstwie pre- lub postzygotycznej mutacji genu supresorowego *Rb* rozwija się siatkówczak (retinoblastoma) oka

Z grupy genów supresorowych najlepiej poznany jest gen o symbolu *Rb*, którego mutacje i delecje odpowiedzialne są za nowotwór siatkówki oka (siatkówczak — retinoblastoma) u dzieci. Nowotwór obu gałek ocznych, często wieloogniskowy, jest zawsze nowotworem dziedzicznym, występującym we wczesnym okresie dzieciństwa. Predysponowane są te dzieci, którym przekazano dziedzicznie jeden zmutowany allel genu *Rb* (mutacja prezygotyczna). Do powstania nowotworu niezbędna jest utrata funkcji drugiego allelu *Rb*, np. przez następną mutację w drugim allelu *Rb* lub jego delecję. Rzadziej występującą postacią siatkówczaka jest guz jednostronny, rozwijający się u dzieci starszych. Guz ten powstaje również w wyniku dwóch mutacji w obu allelach *Rb*, ale mutacje te mają miejsce już w życiu osobniczym (mutacje postzygotyczne). Retinoblastoma jest chorobą recesywną. Tak długo, jak jeden z alleli genu *Rb* jest nie uszkodzony, choroba nie pojawia się. Gen *Rb* zlokalizowany jest w chromosomie 13 (13q14).

W warunkach eksperymentalnych produkt białkowy genu *Rb* w specyficzny

sposób wiąże się z białkami transformacyjnymi niektórych wirusów onkogenych (np. z dużym antygenem T wirusa SV40, białkiem E1A adenowirusa, białkiem E7 brodawczaka HPV).

Przypuszcza się, że produkt genu *Rb* bierze udział w regulacji podziałów komórki, a jego mutacje czy też delecja powodują, że produkty białkowe zmutowanych genów *onc* — „białka transformacyjne” — zaczynają ujawniać swoją aktywność, doprowadzając do niekontrolowanych podziałów komórkowych.

Białko *Rb* o masie cząsteczkowej 105 kDa znajduje się w jądrze komórkowym i ulega fosforylacji i defosforylacji. Stan fosforylacji białka *Rb* jest precyzyjnie kontrolowany podczas cyklu życiowego komórki: w fazie S białko jest fosforylowane, a defosforylowane — podczas mitozy i wejścia w G_1 . Wydaje się więc, że defosforylowana postać białka *Rb* hamuje proliferację komórkową.

W fosforylacji białka *Rb* w fazie G_1/S biorą udział kinazy *cdc2*. Interesujące, że jeden z czynników wzrostowych $TGF\beta$ (działający na niektóre komórki, np. komórki nabłonkowe, jako inhibitor wzrostu hamuje fosforylację białka *Rb* w późnej fazie G_1 . Białko *Rb* hamuje również aktywację czynnika transkrypcyjnego Fos.

Mutacje i głębsze zmiany strukturalne genu *Rb* spostrzegano także w kostniakomięsaku, raku sutka i innych nowotworach. Prawidłowy gen *Rb* wprowadzony do komórek siatkówczaka i kostniakomięsaka powoduje supresję fenotypu nowotworowego.

12.22. Mutacje genu supresorowego *p53* towarzyszą wielu typom nowotworów złośliwych

Do grupy genów supresorowych należy zaliczyć również gen o symbolu *p53*. Prawidłowy gen *p53* ma właściwości supresorowe zbliżone do genu *Rb*. W warunkach doświadczalnych blokuje aktywność białek transformacyjnych wirusów onkogenych (np. dużego antygeny T wirusa SV40). Przeważająca część nowotworów u ludzi cechuje się mutacjami w genie *p53*. Zmutowany gen *p53* występuje też u członków rodzin opisanych jako „rodziny Li-Fraumeni” (o rodzinach tych wspomniano przy omawianiu predyspozycji genetycznych do zapadania na choroby nowotworowe). Obecność zmutowanego genu *p53* u członków tych rodzin może więc tłumaczyć zwiększoną predyspozycję do zapadania na choroby nowotworowe (występuje tu podobieństwo do predyspozycji do zapadania na siatkówczaka związanej z obecnością zmutowanego genu *Rb*). Gen *p53* zlokalizowany jest u człowieka w krótkim ramieniu chromosomu 17. Utratę fragmentu chromosomu 17 spostrzegano często w różnych typach nowotworów u ludzi (rak sutka, płuc, jelita grubego, gwiazdziak i chroniczna białaczka mielocytarna. Białko *p53* jest fosfoproteiną występującą w jądrze komórkowym. Mimo iż sugeruje się jego rolę w regulacji proliferacji komórkowej, funkcje biochemiczne tego białka nie są w pełni poznane. Pewne dane strukturalne

sugerują, że jest ono być może czynnikiem transkrypcyjnym (lub najogólniej: białkiem biorącym udział w regulacji transkrypcji).

Tylko zmutowany gen *p53* wykazuje aktywność transformującą po transfekcji i może komplementować aktywność genu *c-ras*. Dzięki gen *p53* nie ma tych właściwości. Nie zmutowany *p53* znosi transformację nowotworową spowodowaną transfekcją onkogenami *ras* i *myc*. Być może, że *p53* kontroluje ekspresję genów hamujących proliferację komórkową. Istnieją dane, że *p53* może odgrywać pewną rolę w regulacji replikacji DNA kontrolując np. oddziaływanie polimerazy DNA α z innymi komponentami tzw. kompleksu replikacyjnego podczas replikacji.

12.23. Ostatnio wykryto nowe geny supresorowe mające udział w procesie nowotworowym

Gen wyizolowany z guza Wilmsa, nowotworu nerki u dzieci, ma charakter genu supresorowego. Gen ten, o nazwie *WT*, koduje białko mające wszelkie cechy strukturalne białka biorącego udział w regulacji transkrypcji innych genów. Gen ulega silnej ekspresji w wątrobie embrionalnej. Przypuszcza się, że jego produkt białkowy jest niezbędny w różnicowaniu nefroblastów do nefronów.

Gen supresorowy o symbolu *DCC* (ang. deleted in colorectal carcinoma) zidentyfikowano w raku okrężnicy i odbytu. Gen ten koduje białko (liczące 750 aminokwasów) zbliżone swoimi właściwościami do białek adhezyjnych.

Dane cytogenetyczne wskazują, że mutacje genu *MCC* (ang. mutated in colorectal cancer) są odpowiedzialne za powstawanie polipowatości jelita grubego u niektórych rodzin. Gen ten, zlokalizowany w chromosomie 5q21, koduje białko liczące 829 aminokwasów. Białkowy produkt tego genu może wiązać się z białkiem G i hamować w ten sposób jego aktywność. W locus 5q21 znajduje się również gen, zwany *APC* (ang. adenomatous polyposis coli), który odgrywa ważną rolę w powstawaniu polipowatości o podłożu rodzinnym. Gen ten koduje wielką cząsteczkę białkową liczącą 2843 aminokwasów.

Gen *NF1* (ang. neurofibromatosis type 1) koduje białko liczące 2485 aminokwasów. Białko to zawiera region liczący ok. 350 aminokwasów, wykazujący wysoką homologię do katalitycznej domeny białka GAP, aktywującego funkcję GTPazową białka Ras. Wzajemne relacje obu białek NF1 i GAP nie są jednak znane. Nie wyklucza się jednak możliwości, że NF1 jest efekтором reakcji pobudzonego białka Ras i bierze udział w transmisji sygnałów różnicowania i zahamowania proliferacji. W locus 3p21 chromosomu 3, który często ulega delecji w rakach płuc i nerek, znajduje się gen kodujący białko defosforylujące reszty tyrozynowe (ang. protein-tyrosine phosphatase γ — PTP γ). PTP γ jest białkiem o stosunkowo dużej masie, mieszczącym się w błonie komórkowej. Jego aktywność enzymatyczna wiąże się z regulacją procesów fosforylacji w transmisji sygnałów mitogennych. Geny kodujące tyrozynoswoiste fosfatazy stanowią grupę genów wzbudzających duże zainteresowanie, gdyż te swoiste fosfatazy mogą mieć kluczowe funkcje w procesie onkogenezy.

Geny supresorowe procesu nowotworowego zidentyfikowano także u *D. melanogaster*. Homozygotyczne mutacje w obrębie jednego z tych genów *l(2)gl* (lethal(2)giant larvae) indukują pojawienie się m.in. rozrostów nowotworowych w obrębie ośrodków wzrokowych mózgu larwy.

W tzw. zespole von Hippela–Lindau (nowotwory wieku dziecięcego występujące rodzinie, np. naczyniak płodowy, barwiak nadnerczowy) oraz w raku nerek zidentyfikowano gen supresorowy VHL (ang. von Hippel–Lindau), który koduje białko powierzchniowe biorące udział w adhezji komórek.

W zespole Lyncha (niektóre nowotwory występujące rodzinie, w tym także nowotwory okrężnicy) stwierdzono występowanie genu supresorowego zlokalizowanego w chromosomie 2 (gen *LCFS2*, ang. lynch cancer family syndrome type 2). Gen ten prawdopodobnie koduje białko, które wpływa na rearanżację tzw. krótkich sekwencji mikrosatelitarnych oraz destabilizację genomu. Przypuszcza się, że w ten sposób gen *LCFS2* wpływa na szybkość pojawienia się mutacji w genach *APC*, *p53* i *DCC*, a tym samym na tworzenie się polipów i ich nowotworowej transformacji.

12.24. W procesie nowotworzenia biorą udział nie tylko onkogeny i geny supresorowe

W złożonym i wieloetapowym procesie nowotworzenia, oprócz genów zwanych onkogenami i genów supresorowych, bierze udział również wiele innych genów (tab. 12.3).

Tabela 12.3. Geny, których zmutowane formy odgrywają rolę w nowotworzeniu

Rodzaj genów	Funkcja w komórkach prawidłowych	Rodzaj mutacji	Udział w nowotworzeniu
Onkogeny	prolifercja komórkowa, programowana samodestrukcja (<i>apoptosis</i>)	dominujący	nie kontrolowana proliferacja, zahamowanie różnicowania
Supresory transformacji nowotworowej	prolifercja	recesywna	stała proliferacja
Geny związane z angiogenezą	unaczynienie	recesywna	wzrost unaczynienia
Geny związane z inwazywnością	adhezja komórek, komunikacja międzykomórkowa	dominująca	inwazywność, ruchliwość komórek
Geny związane z przerzutowaniem	komunikacja międzykomórkowa	recesywna	zmniejszenie reaktywności na sygnały międzykomórkowe, autonomizacja komórek
Geny <i>MHC</i>	kontrola immunologiczna	recesywna	zmniejszenie kontroli immunologicznej
Antygeny powierzchniowe	?	dominująca	?

W trakcie nowotworzenia, w komórce, w której została zainicjowana transformacja nowotworowa, w wyniku różnych zmian mutacyjnych, dochodzi do ujawnienia bądź też wzrostu aktywności genów biorących udział w produkcji czynników angiogenetycznych, ułatwiających unaczynienie nowotworu. Mogą też być uszkodzone recesywne geny kodujące inhibitory angiogenezy. Proces unaczynienia może być inicjowany wyłącznie przez komórki nowotworów złośliwych, a nie przez komórki nowotworów łagodnych, które takich właściwości nie mają.

12.25. Niektóre geny biorą udział w progresji procesu nowotworowego i przerzutowaniu

Progresja procesu rakowacenia wiąże się z mutacją i uaktywnieniem genu kodującego kolagenazę IV, enzymu proteolitycznego, biorącego udział w degradacji błony podstawowej nabłonków oraz macierzy zewnątrzkomórkowej. W komórkach nowotworów złośliwych obserwuje się również zwiększoną aktywność genów kodujących inne enzymy proteolityczne.

Powstawanie komórek mających zdolności do tworzenia przerzutów wiąże się z mutacjami recesywnymi genów, określanymi niekiedy jako geny supresorowe przerzutowania. O obecności takiego genu (czy też genów) świadczą dane pochodzące z hybrydyzacji komórek prawidłowych oraz komórek nowotworu złośliwego dającego przerzuty. Powstały hybryd komórkowy miał cechy nowotworu złośliwego, ale nie dawał przerzutów. Stosunkowo dobrze przebadanym genem przerzutowania jest gen o symbolu *nm23*. Wydaje się, że gen ten, wykazujący znaczną homologię do genu kodującego kinazę nukleotydu difosforanu, ma wszelkie cechy genu supresorowego przerzutowania. Jest nieaktywny w komórkach przerzutujących. Natomiast występuje i jest aktywny w komórkach nowotworów złośliwych, nie dających przerzutów. Wydaje się, że kinazy NDP biorą udział w tworzeniu agregatów mikrotubul oraz w transmisji sygnału z udziałem białek G. Możliwe, że dzięki specjalnej strukturze (suwak leucynowy) występującej w białku kodowanym przez gen *nm23*, działa on także jako czynnik transkrypcyjny. Gen *nm23* wprowadzony do komórek nowotworu dającego przerzuty powoduje zniesienie niektórych właściwości komórek przerzutujących: zdolności tworzenia przerzutów oraz reaktywności na czynnik wzrostowy typu TGF β .

W komórkach nowotworowych obserwuje się również mutacje recesywne genów warunkujących stałą liczbę podziałów komórkowych (ang. senescence genes). U człowieka geny te są zlokalizowane w chromosomie 1. Mutacje tych genów prowadzą do powstania stanu tzw. immortalizacji, czyli zdolności komórek do nieograniczonej liczby podziałów komórkowych, czego wynikiem jest nieograniczony wzrost komórek w hodowli.

W komórkach nowotworowych, zwłaszcza tych dających przerzuty, spotyka się także defekty genetyczne prowadzące do zmniejszonej ekspresji

genów klasy I zgodności tkankowej (ang. MHC class I). Klasa tych antygenów odgrywa ważną rolę w rozpoznaniu obcych antygenów przez cytotoksyczne limfocyty T. Przypuszcza się, że defekty genetyczne tej klasy genów odpowiedzialne są między innymi za wymykanie się komórek nowotworowych spod kontroli immunologicznej organizmu gospodarza.

Komórka nowotworowa indukuje odczyny ze strony sąsiadujących komórek oraz tkanek prawidłowych i chociaż odczyny te nie są w pełni poznane, z pewnością mają one fundamentalne znaczenie dla progresji nowotworów. Na przykład warto wspomnieć o indukcji w fibroblastach znajdujących się w otoczeniu komórki rakowej tzw. czynnika rozpraszania (ang. scatter factor), który jest identyczny z czynnikiem wzrostu hepatocytów. Czynnikiem rozpraszania wpływa na zmianę fenotypu komórek rakowych: te ostatnie stają się bardziej ruchliwe, tj. przyjmują fenotyp „inwazyjny”. Komórka nowotworowa reaguje na obecność czynnika rozpraszania ekspresją powierzchniowego receptora dla tego czynnika kodowanego przez onkogen *c-met*.

12.26. Procesowi postępującego złośliwienia komórek towarzysząca postępująca destabilizacja genomu

Powstawanie nowotworu jest złożonym procesem wykazującym zadziwiającą kierunkowość i sekwencję niektórych zdarzeń: od komórki, w której zaszedł proces inicjacji (uchwytny jedynie na poziomie molekularnym) poprzez promocję, gdzie następują dalsze mutacje, aż do stopniowego pojawiania się cech „zezłośliwienia” i przerzutowania. Pochodzące z różnych tkanek i narządów nowotwory wykazują podobne tendencje: postępujące zezłośliwienie.

Zjawisko progresji ma swoje odzwierciedlenie w stopniowym pojawianiu się w komórce nowotworowej coraz większej liczby zmutowanych genów, innymi słowy: kumulacji w komórkach nowotworowych coraz to większej liczby mutacji. Zdarzenia te doprowadzają w końcu do destabilizacji („rozchwiania”) funkcji genomu.

Proces nowotworzenia zostaje zainicjowany najczęściej w pojedynczej komórce. Źródła mutacji nie są w pełni poznane. Indukować mutacje mogą czynniki mutagenne (zewnątrzkomórkowe) lub powstające wewnątrz organizmu, a także błędne reperacje mutacji, błędy w replikacji DNA, nieprawidłowe i niehomologiczne rekombinacje. Niewykluczone, że niektóre mutacje mają charakter epigenetyczny, zmieniają nie tyle treść informacji genetycznej, co raczej sposoby jej regulacji (np. zmiany w metylacji DNA). Część mutacji może mieć charakter mutacji spontanicznych spowodowanych tautomerycznymi przekształceniami w strukturze nukleotydów.

Zjawiska epigenetyczne odgrywają poważną rolę w ojcowskim przekazywaniu cech predyspozycji do zapadania na choroby nowotworowe. Ten proces niemendlowskiego dziedziczenia cech w języku angielskim nosi nazwę „imprinting” (p. rozdz. 10). Być może, że w niektórych przypadkach dochodzi, w wy-

niku zdarzeń epigenetycznych, do inaktywacji genów recesywnych odpowiedzialnych za kontrolę procesów proliferacji: komórki dzielą się i tracą zdolność do prawidłowego reagowania na określone sygnały różnicowania komórkowego. Bardzo prawdopodobne, że we wczesnych okresach rozwoju nowotworu dochodzi do mutacji i utraty funkcji przez geny supresorowe, gdyż mutacje genu *p53* spostrzega się też we wczesnych etapach rozwoju wielu typów nowotworów.

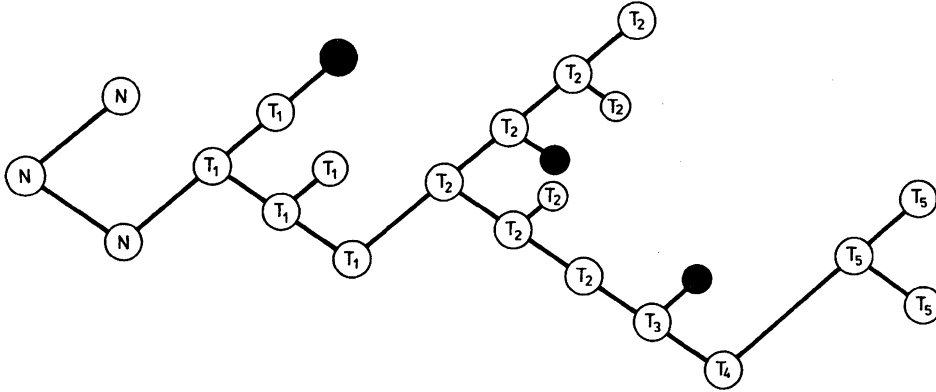
W miarę progresji procesu nowotworowego w komórkach transformowanych pojawiają się zmiany na poziomie chromosomalnym, rearanżacja chromosomów, a także zaburzenie liczby chromosomów (aneuploidia). Przyczyny aneuploidii nie są w pełni jasne. Niewykluczone, że w powstawaniu aneuploidii biorą udział mutacje recesywne genów kontrolujących precyzję i dokładność podziałów mitotycznych komórki. W komórce w wyniku nieprawidłowych podziałów dochodzi do niewłaściwego rozkładu chromosomów. Zamiast 23 par, typowej diploidalnej liczby chromosomów u ludzi, obserwuje się zwiększoną lub zmniejszoną liczbę chromosomów. Ponadto w komórce nowotworowej pojawiają się aberracje chromosomowe. Loci objęte aberracjami przestają spełniać prawidłowe funkcje. Dochodzi do przemieszczeń genów z jednych do innych chromosomów (translokacja), do utraty sekwencji nukleotydowych w obrębie genów i ich regionów regulatorowych (delecje), łączenia się genów lub innych fragmentów (fuzje) w nowe, hybrydowe geny, których produkty białkowe nie spełniają określonych, prawidłowych funkcji.

Niestabilność genomu prowadzi więc do pojawienia się w różnych komórkach coraz większej liczby zmutowanych genów. Powstające w wyniku podziałów komórkowych subpopulacje komórkowe różnić się będą między sobą kombinacjami zmutowanych genów.

12.27. Mechanizmy selekcji i adaptacji prowadzą do rozwoju klonów komórek nowotworowych o dużej autonomii wzrostu

Przewaga jednej subpopulacji komórek nad innymi będzie zależała od wartości adaptacyjnej, jaką zmutowane geny będą wносиły do komórek. Subpopulacje komórkowe są bowiem przedmiotem ostrej selekcji. Pozytywną wartość adaptacyjną będą miały te mutacje czy też kombinacje mutacji, które prowadzić będą do coraz większej autonomii komórek, narastającej inwazyjności i zdolności tworzenia przerzutów. Na rysunku 12.5 pokazano w bardzo uproszczony sposób swoistą ewolucję różnych subpopulacji komórkowych podczas nowotworzenia. Powstałe w wyniku zmian mutacyjnych subpopulacje komórkowe są potomstwem jednej komórki (monoklonalne pochodzenie nowotworów), w której był zainicjowany proces zezłośliwienia (transformacji). Subpopulacje te różnią się między sobą wieloma cechami biologicznymi. Komórki z mutacjami o małej wartości przystosowawczej będą eliminowane przez mechanizmy selekcji. Dużą wartość adaptacyjną będą miały natomiast te

- (a) komórki prawidłowe → komórki nowotworu łagodnego (nieinwazyjnego) → komórki nowotworu złośliwego (inwazyjnego) → komórki przerzutów
- (b) komórki euploidne → narastająca aneuploidia w komórkach (destabilizacja genomu)
- (c) inicjacja → promocja → progresja



Rys.12.5. Hipotetyczne rodzaje powstających subpopulacji komórkowych podczas nowotworzenia. N — komórki normalne; T₁ — komórki nowotworu łagodnego; T₂, T₃, T₄ — komórki nowotworu złośliwego; T₅ — komórki przerzutów. Powstające mutacje letalne oznaczono czarnym kółkiem (wg S. Szala, Nowotwory i geny, *Kosmos*, 40, 1991, 311–317 — za zgodą)

warianty komórkowe, które „uciekają” spod nadzoru immunologicznego gospodarza, ogólnoustrojowej kontroli hormonalnej lub kontroli innych „sygnałów” wytwarzanych przez komórki prawidłowe. Dużą wartość adaptacyjną będą miały też te warianty, w których podziały komórkowe nie podlegają kontroli oraz te, które będą w stanie wytworzyć naczynia krwionośne lub wydzielać białka proteolityczne warunkujące inwazję komórek nowotworowych. W procesie progresji nowotworu złośliwego, czyli w procesie swoistej ewolucji komórek nowotworowych, obserwuje się więc tendencję do powstawania subpopulacji o określonych właściwościach biologicznych. Różne kombinacje zmutowanych genów, w tym protoonkogenów oraz genów supresorowych, będą prowadzić do powstania tego samego fenotypu nowotworowego i to niezależnie od tego z jakich tkanek i narządów wywodzić się będą nowotwory.

Choroba nowotworowa jest więc swojego rodzaju chorobą genetyczną, w której powstaniu i przebiegu bierze udział wiele różnych zmutowanych genów.

13. MOLEKULARNE PODSTAWY EWOLUCJI

Życie rodzi się wszędzie tak samo. Pierwej w niebywale powolnym rozwoju ocean musi przybrzeżnie skisnąć w kisielkową chlustwę i ciche fale sulają ją przez wieki, a to i tysiąclecia, nim z tego mięsiwa wyłoni się kurczliwa młazgroć, która po niezliczonych pokrętnych przygodach dociapka się tam, gdzie jej mięszsz zwapnieje w jakiś stelażyk.

Stanisław Lem, *Wizja lokalna*, 1983

Rozdział ten przedstawia hipotezy i spekulacje na temat ewolucji świata ożywionego, które wywodzą się z osiągnięć współczesnej biologii molekularnej dokonanych do końca roku 1991. Pominięte są natomiast wszystkie zagadnienia ewolucyjne pochodzące z innych dziedzin biologii — na przykład paleontologii, teorii doboru, genetyki populacji itp.

Ewolucja życia na Ziemi jest faktem uznanym przez całą współczesną biologię. Jednocześnie jednak ogromna liczba problemów pozostanie nie wyjaśniona; co więcej, być może nie zostanie wyjaśniona nigdy. Dzieje się tak nie tylko dlatego, że nauka nie osiągnęła jeszcze dostatecznego stopnia rozwoju, ale również dlatego, że ewolucja rozpoczęła się zapewne 3–4 mld lat temu i warunki panujące wówczas na Ziemi nie są dokładnie znane. Brak dających się analizować biochemicznie reliktywów wczesnych faz ewolucji oraz niemożność doświadczalnego modelowania procesów, które trwały miliardy lat, wymusza konieczność obracania się w kręgu hipotez.

Z drugiej jednak strony biologia molekularna dostarczyła metod badawczych oraz danych o niebywałym znaczeniu dla rozwoju nauki o ewolucji. Szczególny przełom spowodowała możliwość porównywania sekwencji nukleotydowej genów różnych organizmów żyjących obecnie, a nawet genów izolowanych ze szczątków kopalnych. Wyniki tych badań potwierdziły fakt jedności świata ożywionego; stosowanie praktycznie jednakowych zasad zapisu i odczytywania informacji genetycznej u wszystkich organizmów z wirusami włącznie świadczy dobitnie o ich pochodzeniu od wspólnego praprzodka — tzw. progenoty. Ponadto ustalenie zasad kodowania informacji genetycznej wyrażonych skrótowo jako „centralny dogmat biologii molekularnej”:

DNA \rightleftharpoons RNA \rightarrow białko

doprowadziło do uznania nadrzędności genotypu w procesie ewolucji. Tak więc według współczesnego neodarwinizmu organizmy żywe są skomplikowanymi

układami zapewniającymi replikację genomów. W tym sensie funkcja biologiczna organizmu człowieka nie różni się zasadniczo od np. otoczki wirusa — obie struktury służą ochronie, replikacji i propagacji genów. Szczególnie „udane” zespoły genów osiągają sukces ewolucyjny dzięki interakcji kodowanych przez nie fenotypów z otoczeniem. Masowa produkcja kolejnych, zmodyfikowanych genotypów, jak i ich selekcja dzięki doborowi naturalnemu działającemu na fenotypy, stanowi mechanizm ewoluowania nowych organizmów.

Odgadywanie dróg ewolucji po śladach, jaki ten proces pozostawił w sekwencjach DNA różnych organizmów jest fascynującą przygodą intelektualną. Ciągłe jeszcze za mało wiemy o molekularnych mechanizmach procesów morfogenezy, behawioru i embriogenezy. Ponieważ różnice między gatunkami są głównie związane z tymi właśnie procesami, postęp w badaniach nad ewolucją będzie zależał od postępu w rozumieniu tych zjawisk.

13.1. Życie na Ziemi mogło powstać około 3 mld lat temu

Nasza planeta została ukształtowana ok. 4,5 mld lat temu i wydaje się, że życie na niej powstało ok. 3 mld lat temu. Sugerują to badania nad mikroskamielinami: analiza mikroskopowa skał osadowych, które powstały 3 mld lat ujawniła istnienie pęcherzykowatych tworów, które mogą być pozostałościami pierwotnych komórek.

Ponieważ warunki panujące na powierzchni Ziemi 3–4 mld lat temu nie są dokładnie znane, współczesne poglądy na pierwsze fazy ewolucji opierają się na spekulacjach. Jest jednak jasne, że ewolucja życia rozpoczęła się na długo zanim powstały pierwsze organizmy. Za początek tego łańcucha zjawisk, można uważać powstanie tak zwanego bulionu pierwotnego w wyniku rozpuszczania się w wodzie związków organicznych. Związki te powstawały na skutek reagowania ze sobą składników atmosfery ziemskiej pod wpływem wyładowań elektrycznych oraz promieni UV.

Koncepcję powstania życia przez zagęszczenie się bulionu pierwotnego w tak zwane koacerwaty sformułował Oparin w roku 1938, natomiast w roku 1953 Miller (Stany Zjednoczone) udowodnił, że prebiotyczna synteza związków organicznych daje się powtórzyć doświadczalnie. W kolbie zawierającej mieszaninę metanu, amoniaku i wodoru oraz wodę przeprowadzono silne wyładowania elektryczne, następnie skroplone produkty reakcji były wprowadzane do wody, skąd przez odparowywanie powracały do kolby reakcyjnej. Po kilku dniach takiego „krażenia atmosferycznego” okazało się, że nastąpiła synteza dziesięciu różnych aminokwasów, ponadto w kolbie stwierdzono obecność aldehydów i cyjanowodoru. Opisane doświadczenie zapoczątkowało serię badań nad abiotyczną syntezą związków organicznych, między innymi stwierdzono, że polimeryzacja cyjanowodoru może doprowadzić do powstania adeniny i uracylu, kondensacja formaldehydu zaś prowadzi do powstania cukrów, między innymi rybozy.

Tak więc okazało się, że podstawowe elementy, z jakich składają się białka i kwasy nukleinowe mogły powszechnie występować na Ziemi 3–4 mld lat temu. Początki życia musiały jednak wymagać kondensacji podstawowych elementów w polimery — jak białka i kwasy nukleinowe. Polimery takie powstają przez usunięcie wody w trakcie syntezy wiązania peptydowego białek lub syntezy wiązania fosfodiesterowego kwasów nukleinowych. Tymczasem środowisko wodne i podwyższona temperatura sprzyjały hydrolizie a nie polimeryzacji. Z tego powodu wydaje się, że powstanie życia w środowisku prebiotycznym wymagało spełnienia dodatkowego warunku — ochrony przed hydrolizą nowo powstałych polimerów organicznych. Ochrona taka powodowałaby zmniejszenie efektywnego stężenia wody, na przykład przez uwodnienie obecnych w środowisku polarnych cząsteczek polifosforanów. Niektóre modele powstania życia zakładają udział powierzchni minerałów w procesach kondensacji — postuluje się udział pirytów lub szkła bazaltowego. Takie powierzchnie stanowiłyby środowisko umożliwiające lokalny wzrost stężenia reagujących monomerów, umożliwiałyby wzajemne reakcje powstających kompleksów cząsteczek, pełniłyby rolę katalizatora oraz chroniłyby przed aktywnością hydrolytyczną wody.

13.2. Życie powstało dzięki katalitycznym właściwościom replikujących się cząsteczek RNA

Obecność i ciągła synteza *de novo* nawet najbardziej złożonych cząsteczek organicznych nie oznacza, że mamy do czynienia z układem żywym. Wyznaczenie granicy, od jakiej możemy uznać hipotetyczny praorganizm za żywy, jest dyskusyjne, wydaje się jednak że układ taki musi wykazywać trzy podstawowe cechy:

- (a) własny metabolizm;
- (b) zdolność do replikacji, czyli powielania się i przekazania swoich cech organizmom potomnym;
- (c) podleganie ewolucji.

Przez długi czas pogodzenie tych trzech postulatów z teorią Oparina było niemożliwe z powodu wystąpienia paradoksu typu „co było wcześniej — kura czy jajko”. Wydawało się bowiem, że jedynie białka pełnią rolę biokatalizatorów i dlatego postulowano ich pierwotną rolę w powstawaniu życia. Z kolei wiadomo, że informacja o strukturze białek jest zakodowana w kwasach nukleinowych i że odwrotny przepływ informacji — tj. od białek do kwasów nukleinowych jest niemożliwy. Tak więc, jeżeli pierwszy genom miał się replikować, to w jaki sposób mogło się to odbyć bez udziału białek. Jeśli zaś początkiem życia miały być białka o określonych właściwościach katalitycznych, to w jaki sposób informacja o ich sekwencji mogła się dziedziczyć.

Problem co było pierwsze — białko czy kwas nukleoinowy został rozwiązany w roku 1981, kiedy T. Cech (Stany Zjednoczone) odkrył, że RNA

może pełnić rolę katalityczną. Przedmiotem badań Cecha był intron w rybosomalnym RNA orzęska *Tetrahymena*. Okazało się, intron ten *in vitro* jest zdolny do precyzyjnego wycinania się z prekursora bez udziału jakichkolwiek białek. Intensywne badania nad katalitycznymi funkcjami RNA, prowadzone w ciągu ostatnich dziesięciu lat, udowodniły, że cząsteczki RNA, zwane rybozymami, zdolne są do przeprowadzania *in vitro* reakcji transestryfikacji oraz hydrolizy wiązań fosfodiesterowych w RNA. Dokładniejszy opis tych reakcji czytelnik znajdzie w rozdziale 8 tej książki. Innymi przykładami katalizy z udziałem RNA są: enzym RNaza P, który bierze udział w dojrzewaniu tRNA i jest złożony z białka oraz cząsteczki RNA, która jest niezbędna do aktywności enzymatycznej; małe cząsteczki RNA (snRNA) są składnikami spliceosomu, czyli kompleksu przeprowadzającego wycinanie intronów. Wydaje się, że rybosomalny RNA pełni funkcje transferazy peptydylowej w procesie translacji; wykazano też udział RNA jako czynnika transkrypcyjnego dla polimerazy RNA III u owadów (tab. 13.1).

Tabela 13.1. Funkcje biologiczne cząsteczek RNA

RNA	Funkcja
mRNA	przekazywanie informacji określającej kolejność łączenia aminokwasów w biosyntezie białka
rRNA	1. udział w strukturze rybosomu 2. aktywność transferazy peptydylowej (?) 3. translokacja peptydylo-tRNA
tRNA	cząsteczki adaptorowe przenoszące aminokwasy w biosyntezie białek i w innych szlakach anabolicznych
U1, U2, U4/U6 i U5 snRNA	wycinanie intronów
U3 snRNA	dojrzewanie rRNA (?)
U7 snRNA	obróbka końca 3' mRNA histonowego
U11 snRNA	obróbka i poliadenylacja 3'-końców pre-mRNA
M1 RNA	komponenta katalityczna RNazy P biorącej udział w obróbce tRNA
RNA telomerazy	matryca do syntezy telomerów
7S RNA	składnik kompleksu rozpoznający sygnał w procesie translokacji białek przez błony
primery RNA	cząsteczki RNA inicjujące replikację DNA
micF	prokariotyczny RNA zdolny do regulacji wydajności translacji
TFIIIR	czynnik regulujący transkrypcję przez PolIII u owadów

Za odkrycie katalizy opartej na RNA badacze Cech i Altman (Stany Zjednoczone) otrzymali nagrodę Nobla w roku 1990.

Chemiczne właściwości RNA, jego zdolność do przybierania skomplikowanych struktur drugo- i trzeciorzędowych oraz możliwości modyfikacji zasad

w cząsteczce świadczą o teoretycznie nieograniczonym potencjale katalitycznym RNA. Co więcej, właściwości katalityczne wykazują stosunkowo krótkie cząsteczki RNA: np. rybozym skonstruowany *in vitro* przez J. Szostaka (Stany Zjednoczone) z części intronu faga *T4* jest zdolny do syntezy komplementarnej nici RNA, używając oligonukleotydów jako substratów. Sam rybozym składa się z trzech odcinków RNA o długości 59, 75 i 43 nukleotydów i stanowi rodzaj prymitywnej replikazy RNA.

Opisane odkrycia spowodowały przełom w wyobrażeniach na temat pierwotnej fazy ewolucji biosfery. Uważa się obecnie, że pierwszymi replikującymi się cząsteczkami były replikazy RNA, to jest spontanicznie powstałe łańcuchy rybonukleotydów, które wykorzystywały obecnie w „pierwotnym bulionie” rybonukleotydy do syntezy komplementarnych replikaz. Stanowiły one zarówno materiał genetyczny, jak i enzym katalizujący własną replikację. Powielanie się tych cząsteczek następowało oczywiście z błędami replikacyjnymi, spowodowanymi głównie brakiem mechanizmów korekcyjnych oraz niedoskonałością pierwotnych rybozymów. Na skutek tego potomne cząsteczki reprezentowały szerokie spektrum aktywności, niektóre replikowały się szybciej, inne miały zmienione optima pH czy stężenia soli, jeszcze inne mogły nabyć zdolność hydrolizowania „obcych” cząsteczek RNA i zużywania powstałych w ten sposób nukleotydów do własnej replikacji. Dobór naturalny mógł więc działać już od chwili powstania pierwszych rybozymów, selekcionując cząsteczki najlepiej przeżywające i efektywnie replikujące się. Tę początkową, hipotetyczną fazę ewolucji, nazwano „światem RNA”. Wydaje się mało prawdopodobne, aby pozostały jakiegokolwiek ślady tego świata, gdyż RNA łatwo ulega hydrolizie, ponadto cząsteczki RNA są dobrą pożywką dla większości mikroorganizmów. Przyjmuje się jednak, że wymienione reakcje, w których uczestniczą cząsteczki RNA stanowią relikty „świata RNA”. Za uznaniem RNA, a nie DNA za pierwotny nośnik procesów życiowych przemawia fakt, że synteza deoksynukleotydów *in vivo* odbywa się na skutek redukcji wcześniej powstałych rybonukleotydów, a tymina — zasada występująca jedynie w DNA — powstaje w wyniku metylacji zasady specyficznej dla RNA, to jest uracylu. Co więcej, w procesie replikacji DNA niezbędne są krótkie odcinki RNA służące jako primery, podczas gdy polimerazy RNA są w stanie inicjować syntezę komplementarnej nici RNA bez udziału starterów. Tak więc DNA może być uznany za modyfikację RNA, która wyewoluowała później i która ze względu na większą stabilność chemiczną lepiej nadawała się do przechowywania informacji genetycznej.

Świat RNA składał się więc z replikujących się cząsteczek RNA, które spełniały rolę zarówno replikatora, jak i materiału genetycznego — czyli fenotypu i genotypu zarazem. Jednakże prawdziwe przyspieszenie ewolucji nastąpiło z chwilą wytworzenia całkiem nowego systemu katalizy: a mianowicie układów opartych na białkach.

13.3. Białka okazały się lepszymi katalizatorami niż RNA

Ponieważ białka nie mają zdolności do replikacji, nie istnieje mechanizm, w którym dobór naturalny mógłby działać na polipeptydy nie kodowane przez genom. Innymi słowy, ponieważ cechy nabyte nie podlegają dziedziczeniu, wszystkie spontaniczne połączenia aminokwasów, nawet bardzo aktywne katalitycznie, nie mogły pełnić żadnej roli w ewolucji, gdyż informacja o ich sekwencji nie mogła być przekazana potomstwu. Aby mogło dojść do katalizy zależnej od białek, konieczne było utworzenie zależności między sekwencją nukleotydów w prymitywnym genomie RNA a sekwencją oligopeptydu — zdolnego do jakiejś metabolicznej funkcji. Obecny system odczytywania informacji genetycznej jest bardzo skomplikowany: za specyficzne rozpoznanie aminokwasu i powiązanie go z tRNA o właściwym antykodonie odpowiedzialne są syntetazy aminoacylo-tRNA, natomiast sama synteza polipeptydu wymaga złożonego kompleksu rybosom-mRNA, czynników translacyjnych oraz pełnego zestawu aminoacylo-tRNA.

W jaki sposób odbyła się więc ewolucja kodu genetycznego i powiązanego z nim aparatu translacyjnego? W ostatnich latach zaproponowano model „etykiety genomowej” (ang. genomic tag), który zakłada, że pojawienie się procesu translacji odbyło się dzięki wykorzystaniu w ewolucji końcowych odcinków genomów RNA.

Autorzy tego modelu: Weiner i Maizels (Stany Zjednoczone) zwrócili uwagę, że jednoniciowe wirusy RNA, atakujące rośliny i bakterie, zawierają na 3'-końcach swoich genomów tzw. „etykietkę” w postaci struktury przypominającej tRNA. Etykietyki uważane są za „molekularną skamielinę” pochodzącą z wczesnych etapów ewolucji świata RNA. Mogą być jednak rozpoznawane *in vitro* przez enzymy współczesnego metabolizmu RNA: np. przez nukleotydylotransferazę tRNA (tj. enzym tworzący sekwencje CCA na 3'-końcu tRNA), enzymy aminoacylujące tRNA i inne. Wydaje się, że funkcją etykietyki jest wskazywanie końca 3' genomu RNA dla replikacji oraz umożliwienie rozróżnienia RNA matrycowego zawierającego etykietkę od innych cząsteczek RNA. Powstanie znakowanych końców RNA we wczesnej fazie ewolucji ułatwiło replikację genomów RNA, a jednocześnie mogło stać się zaczątkiem powstawania procesu translacji.

Jeśli bowiem założymy, że przyłączenie aminokwasu do struktury etykietyki miało pozytywny wpływ na replikację, to oznacza, że cząsteczki przypominające aminoacylo-tRNA były obecne w świecie RNA i mogły zostać wykorzystane do syntezy peptydów. W ten sposób translacja i kataliza oparta na białkach powstały przez „przywłaszczenie” elementów pierwotnie służących replikacji RNA.

Na związki między replikacją a translacją wskazuje między innymi fakt, że replikaza bakteriofaga $Q\beta$ jest tetramerem składającym się z białka fagowego oraz trzech białek gospodarza. Wszystkie trzy: białko rybosomalne S1 i faktory elongacyjne Tu oraz Ts są składnikami aparatu translacyjnego. Zgodnie

z modelem etykiety genomowej to nie bakteriofag $Q\beta$ wykorzystuje faktory translacyjne do własnej replikacji, ale aparat translacyjny bakterii pochodzi od wcześniejszych ewolucyjnych czynników replikacyjnych RNA.

Pierwotne polipeptydy prawdopodobnie nie były optymalnymi katalizatorami i nie mogły w pełni zastąpić rybozymów, gdyż były stosunkowo krótkie i składały się z niewielu różnych aminokwasów. Wydaje się więc, że rybozomy początkowo wyewoluowały w enzymy typu RNP (rybonukleoproteiny) i dopiero w późniejszych stadiach ewolucji doszło do wykorzystania potencjału katalizycznego samych białek. Warto zauważyć, że do dzisiaj wiele procesów jest katalizowanych przez kompleksy RNA z białkami (p. tab. 13.1), natomiast ponad połowa znanych enzymów zależna jest od niebiałkowych kofaktorów wśród których szczególnie liczne są nukleotydy lub ich pochodne.

13.4. Kod genetyczny jest na ogół identyczny w całym świecie ożywionym

Porównywanie sekwencji zasad w genach oraz sekwencji aminokwasów w odpowiadających im białkach ujawniło, że prawie we wszystkich badanych organizmach żywych zasady kodowania informacji genetycznej są jednakowe: to znaczy zawsze tej samej trójce zasad odpowiada ten sam aminokwas. Uniwersalność kodu genetycznego, czyli stosowanie tych samych zasad kodowania u bakterii czy u człowieka świadczy o tym, że kod genetyczny w znanej nam postaci musiał wyewoluować bardzo wcześnie, jeszcze przed rozejściem się prokariotów, eukariotów i archebakterii.

Koncepcje dotyczące ewolucji samego kodu genetycznego mają oczywiście charakter spekulacji. Możliwe, że początkowo jeden kodon oznaczał kilka aminokwasów lub też, że początkowe prymitywne kodony były złożone z tylko dwóch zasad. Nie jest też jasne, czy istniały chemiczne podstawy wykorzystywania konkretnych sekwencji RNA do kodowania określonych aminokwasów, czy też związki takie były czysto przypadkowe. Jest jednak oczywiste, że osiągnąwszy pewną sprawność działania, kod genetyczny musiał zostać „zamrożony” ewolucyjnie w swojej formie, gdyż wszelkie zmiany zasad kodowania powodowałyby lawinę mutacji typu missens w rozmaitych białkach i co za tym idzie zmniejszenie sprawności ewolucyjnej pierwotnego organizmu.

Istnieją jednak odstępstwa od zasady uniwersalności kodu genetycznego, głównie w genomach mitochondrialnych oraz w genomach jądrowych orzęsków i u *Mycoplasma* (tab. 13.2) Co więcej, w mitochondriach inne są także zasady odczytywania sekwencji w mRNA przez tRNA: liczba rodzajów tRNA jest niewielka i najczęściej rozpoznawane są tylko dwie pierwsze zasady antykodonu. Trudno jest osądzić, czy takie uproszczone zasady odczytywania kodu genetycznego oraz odstępstwa od uniwersalnego kodu stanowią relikty wczesnej fazy ewolucji, czy też powstały znacznie później i mają charakter przystosowania do translacji bardzo małej ilości białek. Pewnym argumentem na korzyść pierwszej hipotezy jest stosowanie kodonu UGA jako kodującego

Tabela 13.2. Różnice między uniwersalnym kodem genetycznym a kodami w mitochondriach oraz u *Mycoplasma* i *Paramecium*

Organizm	Kodon	Znaczenie w mitochondriach	Znaczenie w kodzie uniwersalnym
Większość organizmów	UGA	Trp	STOP
Ssaki	AGA, AGG	STOP	Arg
Ssaki	AUA	Met (inicjacja)	Ileu
<i>Drosophila</i>	AUA	Met (inicjacja)	Ileu
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AUA	Met (elongacja)	Ileu
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CUA	Thr	Leu
<i>Drosophila</i>	AGA	Ser	Arg
Organizm	Kodon	Znaczenie	Znaczenie w kodzie uniwersalnym
<i>Mycoplasma</i>	UGA	Trp	STOP
<i>Paramecium</i>	UAA	Glu	STOP
	VAG	Glu	STOP

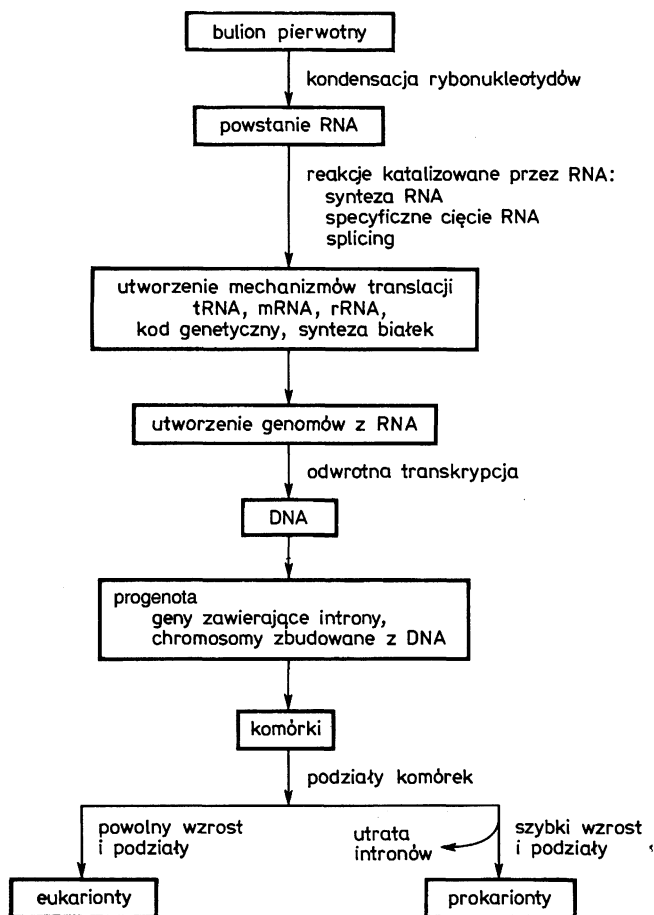
tryptofan w mitochondriach, *Mycoplasma* i u orzęsków. Być może taki właśnie kod był używany przez grupę organizmów, która dokonała inwazji symbiotycznej przodków eukariontów.

13.5. Progenota: praprzodek organizmów żywych miał genom złożony z DNA

Trudno jest określić, kiedy DNA stał się materiałem genetycznym. DNA jest bardziej stabilny chemicznie od RNA i nie podlega tak łatwo hydrolizie. Niewykluczone, że żaden organizm o stopniu komplikacji lub tempie wzrostu obecnych organizmów nie mógł mieć genomu złożonego z RNA, gdyż powstrzymywanie rozpadu i naprawa uszkodzeń takiego genomu pochłaniałyby zbyt wiele energii. Powstanie genomów z DNA było więc istotnym krokiem na drodze ewolucji.

Ponieważ wszystkie obecne organizmy żywe syntetyzują prekursor DNA, redukując grupy 2'-OH difosforanów rybonukleotydów, powstanie enzymu katalizującego tę reakcję, czyli reduktazy rybonukleotydydofosforanów było kluczowym wydarzeniem prowadzącym do ewolucji świata opartego na DNA. Konwersja genomów RNA do DNA wymagała także dodatkowych reakcji: poza syntezą prekursorów niezbędne było powstanie replikaz DNA oraz polimeraz RNA.

Na pewnym etapie ewolucji musiały także utworzyć się systemy błon białkowo-lipidowych, umożliwiające kompartmentację procesów biochemicznych i oddzielające prymitywny organizm od środowiska zewnętrznego. Wszystkie te przemiany doprowadziły do powstania praprzodka komórki: obłonionego układu dysponującego genomem złożonym z DNA, zdolnego do replikacji, transkrypcji i translacji oraz wykazującego prymitywny metabolizm. Taki hipotetyczny praorganizm został nazwany progenotą; kolejne etapy ewolucji doprowadzające do powstania progenoty ilustruje rysunek 13.1.



Rys. 13.1. Schemat przedstawiający hipotetyczne wczesne fazy ewolucji (wg J.E. Darnell i W.F. Doolittle, *PNAS* 83, 1986, 1271)

13.6. Historia ewolucji jest zapisana w sekwencji nukleotydowej genów

W końcu lat 70. W. Gilbert (Stany Zjednoczone) i F. Sanger (Anglia) opracowali metody szybkiego ustalania sekwencji nukleotydów w DNA, za co otrzymali nagrodę Nobla. Dzięki tym metodom stało się możliwe porównywanie sekwencji genów kodujących te same białka u różnych organizmów, a co za tym idzie śledzenie zmian ewolucyjnych na poziomie DNA. Możliwe także stało się ustalenie, czy jakaś domena lub motyw powtarza się w białkach pełniących różne funkcje. Szybki postęp badań w tej dziedzinie spowodował, że na początku lat 90. znanych było ok. 30 000 sekwencji nukleotydowych różnych genów. Te sekwencje umieszczone w komputerowych bazach danych

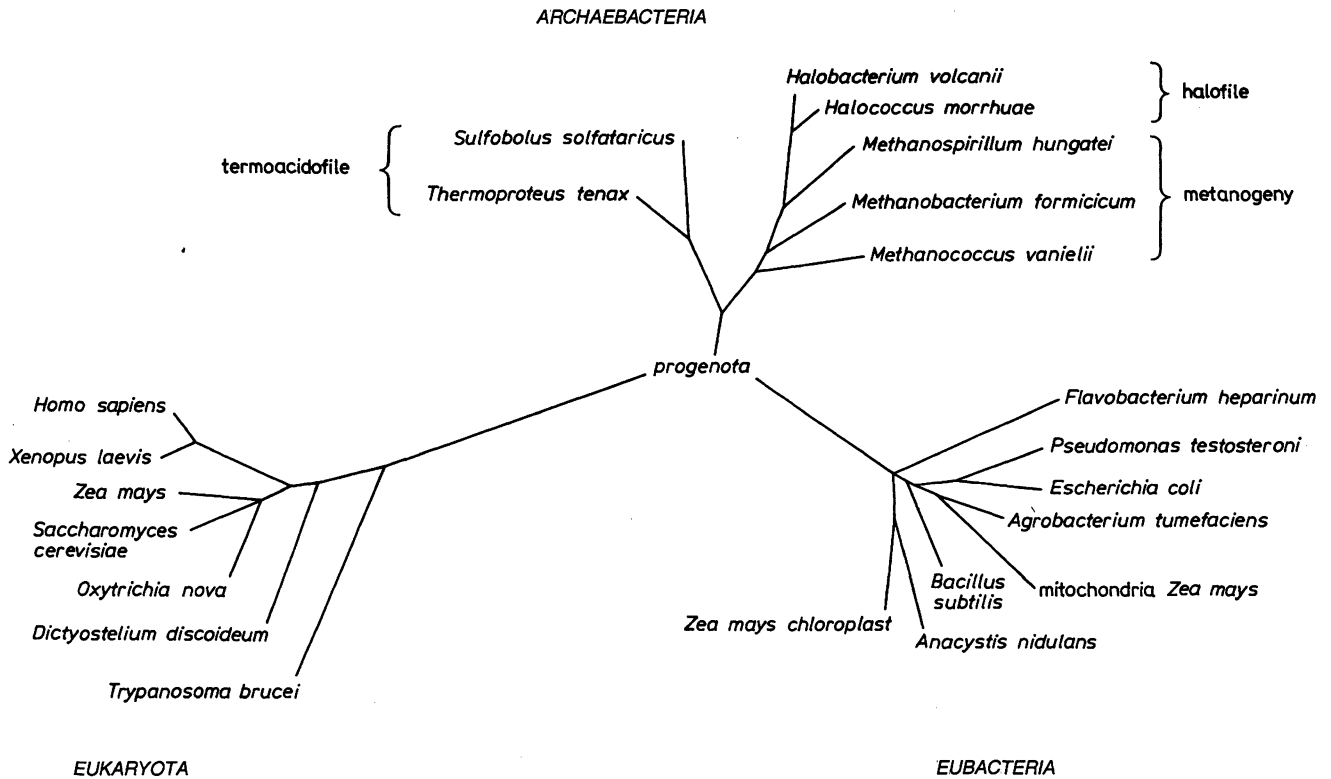
można poddać analizie. W ostatnich latach planuje się także uzyskanie pełnej sekwencji nukleotydowej genomu człowieka (program HUGO, czyli Human Genome Project, głównie finansowany przez Stany Zjednoczone, zakładający ustalenie sekwencji trzech miliardów par zasad) oraz sekwencjonowanie genomu drożdży (finansowane przez EWG). Zakończenie tych prac jest spodziewane na początku wieku XXI.

Badania porównawcze nad sekwencjami DNA wykazały, że niektóre geny ewoluują bardzo powoli, to jest rzadko akumulują substytucje nukleotydowe i w efekcie sekwencje tych genów mało się różnią od siebie, nawet w przypadku porównywania genów z organizmów bardzo odległych filogenetycznie. Do takich genów należą między innymi geny kodujące cytochrom *c*, histony czy rybosomalny RNA. Ponieważ występują one w ogromnej większości lub u wszystkich organizmów żywych, przyjmuje się, że powstały one bardzo wcześnie w ewolucji. Stanowią one rodzaj „molekularnych skamienielin” i analiza zmian w ich sekwencjach doskonale się nadaje do śledzenia głównych trendów w ewolucji świata ożywionego.

W przeciwieństwie do nich, pseudogeny, introny, odcinki międzygenowe oraz genomy mitochondrialne mają dość szybkie tempo ewolucji i analiza ich sekwencji jest przydatna w badaniach nad filogenezą gatunków bliżej spokrewnionych.

Jeżeli założymy, że częstość mutacji w czasie ewolucji jest wartością stałą dla danego genu, to liczba różnic w sekwencji nukleotydowej dwóch homologicznych genów będzie wprost proporcjonalna do czasu, jaki upłynął od rozdzielenia się badanych gatunków w filogenezie. Istnienie tego „zegara molekularnego” pozwala na konstrukcję drzew genealogicznych organizmów żywych przez porównywanie danych z sekwencji DNA z danymi paleontologicznymi. Bardzo użytecznym genem w śledzeniu ewolucji okazał się gen kodujący 16SrRNA. Występuje on bowiem u wszystkich organizmów, ewoluował bardzo powoli i daje się łatwo klonować *in vitro*. Rysunek 13.2 przedstawia drzewo genealogiczne organizmów żywych, skonstruowane na podstawie analizy sekwencji 16SrRNA. Warto zauważyć, że zgodnie z tą analizą *Archaeobacteria* tworzą odrębne królestwo, całkowicie różne od *Eubacteria* i *Eukaryota*. Jest to zgodne z wynikami innych badań, np. u *Archaeobacteria* wykryto obecność intronów w niektórych genach. Z tych powodów niektórzy badacze sugerują zastąpienie nazwy *Archaeobacteria* nazwą *Archaea*, aby podkreślić odrębność filogenetyczną tych organizmów od bakterii.

Wydaje się, że różne tempa akumulowania substytucji nukleotydowych w genach odzwierciedlają różnice w presji doboru naturalnego. Ponieważ pseudogeny są genami, które utraciły zdolność kodowania funkcjonalnych białek, losowe zmiany w ich sekwencji nie wpływają na fenotyp, nie podlegają presji doboru i akumulują się z maksymalną częstością, będącą wypadkową losowych błędów w replikacji DNA czy też działania naturalnych czynników mutagennych. Podobnie zachowują się introny oraz obszary między genami. Inaczej dzieje się w przypadku genów kodujących metabolicznie czynne



Rys. 13.2. Drzewo genealogiczne skonstruowane na podstawie sekwencji genów kodujących 16SrRNA

produkty: substytucje nukleotydowe mogą mieć istotne znaczenie dla funkcji — tak więc eliminacja lub utrwalenie tych zmian są wynikiem doboru naturalnego.

Przeprowadzone ostatnio badania z zastosowaniem mutagenyzy *in vitro* sugerują, że tylko sekwencje kodujące aminokwasy, występujące w centrach aktywnych lub mające znaczenie dla konformacji cząsteczki, muszą być zachowane. Pozostałe aminokwasy mogą ulegać wymianie na inne wskutek mutacji i te pozycje w białku, dla których taka zmiana nie powoduje różnic w aktywności, mogą stanowić ponad 50% wszystkich aminokwasów.

13.7. Mitochondria i chloroplasty są pochodzenia endosymbiotycznego

Mitochondria i chloroplasty zawierają po kilkadziesiąt niewielkich, najczęściej kolistych cząsteczek DNA. DNA mitochondrialny (mtDNA) koduje u wszystkich organizmów eukariotycznych podobny zestaw 10–20 polipeptydów, które są niezbędne w procesie oddychania tlenowego. Pozostałe ok. 95% białek, z jakich składa się mitochondrium, jest kodowane przez genom jądrowy. Z kolei genomy chloroplastowe (ctDNA) kodują 60–100 białek, natomiast pozostałe 80–90% białek chloroplastu kodowane jest przez DNA jądrowy. Zarówno mtDNA, jak i ctDNA kodują jeszcze zestawy rRNA i tRNA, niezbędne do translacji mitochondrialnego i chloroplastowego mRNA.

Obecnie przyjmuje się, że zarówno chloroplasty, jak i mitochondria powstały w wyniku symbiozy organizmów będących przodkami eukariontów z organizmami zbliżonymi do obecnych cyjanobakterii (ct) i bakterii purpurowych (mt). Szacuje się, że symbioza taka została utworzona ok. 1 mld lat temu. Funkcje metaboliczne, których dostarczyły symbionty, to jest oddychanie tlenowe i fotosynteza, stały się z czasem niezbędne dla organizmów gospodarza, natomiast większość genów kodujących białka uczestniczące w tych procesach przemieściła się do jądra komórkowego. Równocześnie postępował proces delekcji większości genów u symbiontów i w efekcie tych przemian symbionty przekształciły się w organelle komórkowe.

Dowodów na hipotezę endosymbiotyczną dostarczyła przede wszystkim analiza sekwencji genów mitochondrialnych i chloroplastowych. Między innymi stwierdzono, że promotory genów chloroplastowych mają obszary –35 i –10 bardzo podobne do typowych promotorów prokariotycznych.

	–35	–10
<i>E. coli</i> (sekwencja najwyższej zgodności)	TCTTGACAT	TATAA
tRNA-2 metioninowy z ctDNA szpiku	TATTGCTTA	TATAA

Rybosomy chloroplastowe są podobne do rybosomów prokariotycznych. Zachodząca na nich translacja jest wrażliwa na chloramfenikol — podobnie jak

u *E. coli*. Rybosomalny RNA chloroplastów zawiera sekwencje wysoce homologiczne do rRNA z *E. coli*, natomiast niektóre chloroplastowe białka rybosomalne reagują z przeciwciałami specyficznymi dla białek rybosomalnych *E. coli*.

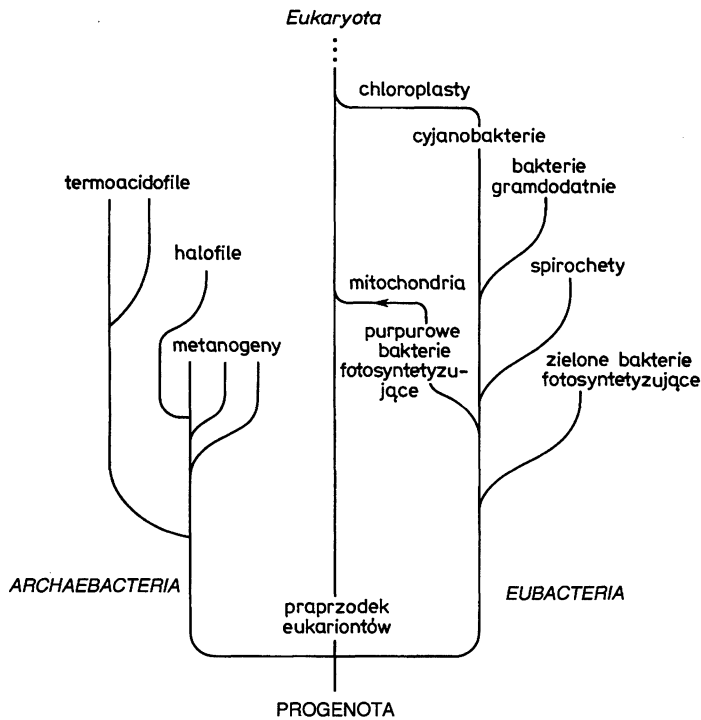
Porównania sekwencji genomów mitochondrialnych i prokariotycznych dostarczają mniej informacji z powodu znacznej różnorodności mtDNA. Jednakże dokładna analiza genów kodujących rRNA wykazała istotne homologie z genami rRNA współczesnych fotosyntetyzujących bakterii purpurowych typu α . Do grupy tej należą bakterie, które wyróżniają się funkcjonalnymi oddziaływaniami z roślinami wyższymi, jak *Agrobacterium* i *Rhizobium*.

Ewolucyjne przekształcenie się genomów prokariotów w obecnie istniejące DNA organelli musiało polegać między innymi na przemieszczaniu się odcinków DNA. Wiele faktów wskazuje na to, że taka wymiana genów między genomami jądrowymi a chloroplastowymi i mitochondrialnymi zachodziła w przeszłości i ciągle jeszcze zachodzi. W różnych organizmach ten sam gen może być kodowany przez genom jądrowy lub mitochondrialny. Na przykład podjednostka 9 kompleksu ATPazy jest kodowana przez mtDNA u *Saccharomyces cerevisiae*, ale u innych grzybów i u człowieka jest kodowana przez genom jądrowy. Z kolei podstawowy enzym fotosyntezy: karboksylaza rybulozo-1,5-difosforanu składa się z ośmiu dużych jednakowych podjednostek rbc-L oraz z ośmiu jednakowych małych podjednostek rbc-S. U większości fotosyntetyzujących eukariotów podjednostka rbc-L jest kodowana przez genom chloroplastowy, rbc-S zaś — przez genom jądrowy. Jednakże u jednokomórkowca *Cyanophora paradoxa* oba białka kodowane są przez genom prymitywnego chloroplastu — tzw. cyjanelli. Fakt ten sugeruje, że w trakcie ewolucji chloroplastów gen kodujący rbc-S przeniósł się z organelli do jądra komórkowego.

Dodatkowym dowodem na wymianę DNA między jądrem i organellami jest homologia niektórych sekwencji DNA chloroplastowego szpinaku z sekwencjami w genomie jądrowym szpinaku. Udało się także wykazać hybrydyzację fragmentów mtDNA z genomami jądrowymi u drożdży, rozgwiazdy i szczura.

Ostatnio udało się wykazać doświadczalnie, że DNA może przenosić się z mitochondriów do jądra: do mitochondriów szczepu drożdży *S. cerevisiae*, który wymagał do wzrostu uracylu, wprowadzono skonstruowane *in vitro* genomy mitochondrialne, zawierające jądrowy gen *URA3*. Gen ten nie może ulegać ekspresji w mitochondriach ze względu na różnice w kodzie genetycznym oraz różne sygnały umożliwiające transkrypcję i translację. Jednakże stwierdzono przechodzenie tego genu do jądra z niewielką częstością, czego rezultatem jest wzrost komórek na pożywce bez uracylu. Badania molekularne potwierdziły fakt transferu genu *URA3* do jądra komórkowego. Tak więc mechanizmy, które doprowadziły do przeniesienia większości DNA prasymbiontów do eukariotycznego genomu jądrowego nadal istnieją i mogą funkcjonować u obecnych eukariotów.

Genomy mitochondrialne i chloroplastowe pochodzą od dwóch niezależnych linii prokariotycznych przaprzodków. W historii ewolucji musiały więc nastąpić dwie inwazje czy też symbiozy: symbioza promitochondriów z proeukariontem i symbioza prochloroplastów z proeukariontem. Rysunek 13.3 przedstawia hipotetyczny ciąg zdarzeń w ewolucji genomów organellarnych.



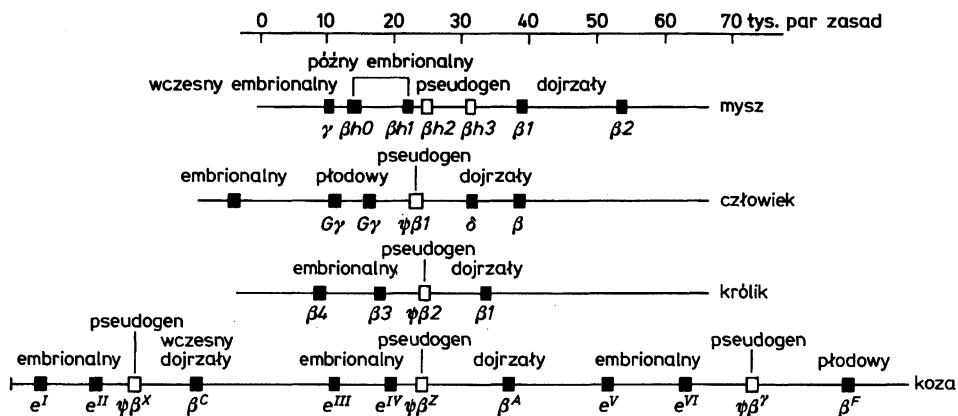
Rys. 13.3. Ewolucyjne drzewo genealogiczne przedstawiające dwie inwazje endosymbiontów prowadzące do powstania organizmów eukariotycznych

Jaki jest sens biologiczny istnienia genomów chloroplastowych i mitochondrialnych? Dlaczego komórki utrzymują tak kosztowne energetycznie odrębne systemy replikacji, transkrypcji i translacji genów organellarnych, które kodują tak niewielką liczbę białek? Odpowiedź na te pytania nie jest znana. Jest możliwe, że genomy mitochondrialne i chloroplastowe stanowią „ślepy zaułek ewolucji”. Ponieważ niektóre białka uczestniczące w fotosyntezie i oddychaniu nie mogą przechodzić przez błony organelli, muszą być syntetyzowane od wewnątrz. Wydaje się, że mRNA i tRNA także nie mogą być transportowane do wnętrza organelli i dlatego redukcja genomów i przenoszenie się genów z organelli do jądra musiały się w pewnym miejscu zatrzymać. W świecie eukariontów zachował się relikw z czasów inwazji organizmów symbiotycznych.

13.8. Białka o nowych funkcjach powstały dzięki duplikacjom genów lub dzięki tasowaniu egzonów

Za jeden z mechanizmów powstawania genów kodujących białka o nowych lub zmodyfikowanych funkcjach uważa się duplikację genów struktury, doprowadzającą do powstawania dodatkowej kopii genu kodującego dane białko. Taka dodatkowa kopia może akumulować mutacje, podczas gdy „oryginał” funkcjonuje bez zmian. Z czasem proces ten doprowadza do wytworzenia nowego genu.

Powstawanie genów o nowych funkcjach w wyniku duplikacji daje się prześledzić na przykładzie rodziny β -globin u ssaków. Poli-peptydy β -globin tworzą kompleks z α -globiną oraz hemem i w ten sposób powstaje hemoglobina — tetramerowe białko odpowiedzialne za przenoszenie tlenu. U człowieka jeden gen koduje poli-peptyd β -globiny występujący w okresie embrionalnym (ϵ), dwa inne geny kodują β -globiny płodowe ($G\gamma$ A- γ) oraz dwa geny — β i δ — kodują β -globiny osobników dojrzałych. Z kolei u kóz występuje aż pięć genów embrionalnych, u królika i u kozy zaś występuje po jednym genie osobników dojrzałych. Opisane geny powstały prawdopodobnie w wyniku duplikacji genu kodującego mioglobinę. Kolejne duplikacje i zmiany w sekwencji doprowadziły do powstania dwóch rodzin genowych: α - i β -globin, uczestniczących w wytwarzaniu różnych form hemoglobiny w kolejnych stadiach rozwoju ssaków (rys. 13.4).

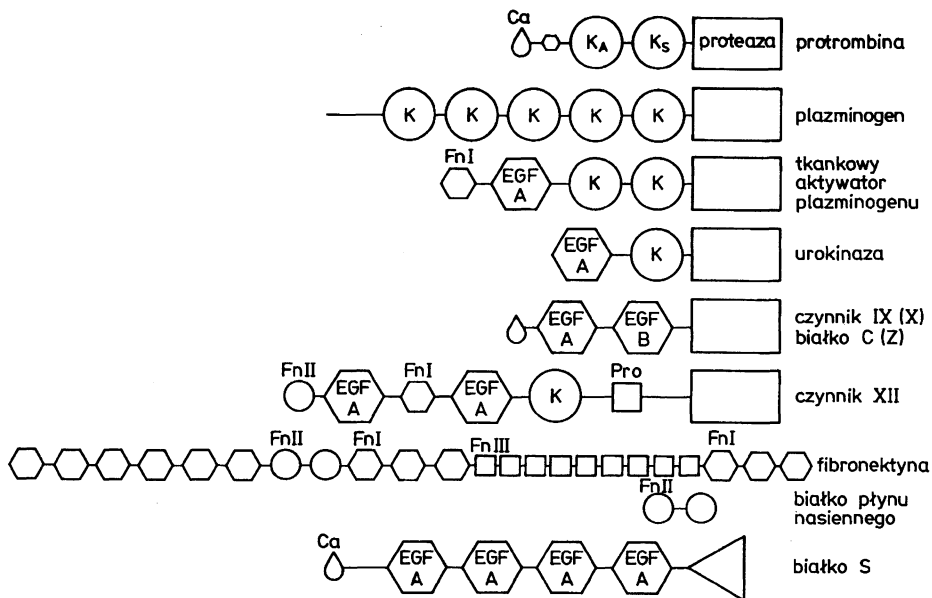


Rys. 13.4. Duplikacje genów w rodzinie β -globin u ssaków

Opisany powyżej model ewoluowania genów nie mógł jednak wyjaśnić wielu danych uzyskiwanych z sekwencjonowania białek lub genów kodujących białka. Dlatego też w roku 1977 W. Gilbert (Stany Zjednoczone) postawił hipotezę, że poszczególne egzony w genach reprezentują domeny białkowe, to jest fragmenty białek, które są odpowiedzialne za określone funkcje: na przykład za wiązanie jonów czy aktywność enzymatyczną. Co więcej — Gilbert

postulował, że poszczególne egzony z różnych genów mogły się ze sobą łączyć w różnych kombinacjach w trakcie ewolucji. Introny znajdujące się między egzonomi kodującymi poszczególne domeny białek stanowiłyby miejsca włączenia lub usuwania kolejnych egzonów, dzięki czemu faza odczytu polipeptydu, kodowanego przez kilka egzonów pochodzących z różnych źródeł, nie ulegałaby zmianie. W ten sposób nowe geny powstają dzięki kombinacji egzonów pochodzących z innych genów. Powyższa hipoteza Gilberta nosi nazwę „tasowania egzonów” (ang. exon shuffling).

Rodzina proteaz serynowych stanowi przykład genów, w których introny przedzielają egzony kodujące poszczególne domeny białkowe. Dotychczas zsekwencjonowano ponad 10 genów tej rodziny, między innymi ludzkie czynniki krzepliwości krwi IX i X, ludzką trombinę, ludzki aktywator plazminogenu (TPA), urokinazę świni, fibronektynę i inne. Wszystkie te białka mają domenę odpowiedzialną za hydrolizę wiązania peptydowego. Domeny o innych funkcjach kodowane są przez odrębne egzony i w zależności od białka stanowią one peptydy sygnałowe, rejony wiążące jony wapnia, czy też rejony homologiczne do epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) (rys. 13.5).



Rys. 13.5. Diagram przedstawiający ułożenie domen białkowych w rodzinie proteaz serynowych Ca — domena wiążąca wapń; K — domena „kringle”; EGF-A — domena epidermalnego czynnika wzrostu A; EGF-B — domena epidermalnego czynnika wzrostu B; Fn — domena fibronektyny (typ I, II lub III); proteaza — domena katalityczna proteazy serynowej; pro — obszar bogaty w prolinę .

Analiza sekwencji genów z rodziny proteaz serynowych sugeruje więc, że w trakcie ewolucji egzony kodujące domeny o różnych funkcjach zostały przyłączone do egzonów kodujących proteolityczne centrum aktywne. W trak-

cie tego procesu niektóre egzony uległy duplikacji i występują w białku obok siebie. Tak więc tasowanie egzonów doprowadziło do powstania białek o różnych funkcjach.

Mocnym dowodem na hipotezę tasowania egzonów jest występowanie wyżej wspomnianego egzonu kodującego rejon homologiczny do EGF w białkach nie należących do spokrewnionych rodzin. Egzon ten występuje bowiem w epidermalnym czynniku wzrostu (EGF) i czynnikach krzepliwości krwi IX i X, ale także w receptorze lipoproteiny niskiej gęstości (LDL receptor). Rozprzestrzenianie się tego egzonu musiało nastąpić w ewolucji stosunkowo niedawno, gdyż wszystkie te białka są charakterystyczne wyłącznie dla kręgowców.

Kolejnego dowodu na tasowanie egzonów dostarczyła analiza sekwencji trzech enzymów: ludzkiej kinazy glicerofosforanowej (PGK), dehydrogenazy alkoholowej kukurydzy (ADH) oraz dehydrogenazy 3-fosfoglicerynianu (GAPDH) kurczęcia. Wszystkie te enzymy mają podobne domeny wiążące nukleotydy oraz zupełnie niepodobne do siebie domeny katalityczne. Każda z domen wiążących nukleotydy jest kodowana przez 5 egzonów, identycznie względem siebie ułożonych.

13.9. Ewolucji na Ziemi wystarczyło niewiele egzonów

Hipoteza tasowania egzonów zakłada, że złożona budowa białek jest wynikiem łączenia egzonów pochodzących z różnych genów. W ten sposób białka uzyskują nowe funkcje, niejako przejmując je od innych białek. Ma to zasadnicze znaczenie dla tempa ewolucji, która w ten sposób korzysta z „cegiełek” czy też „podzespołów”, czyli już wcześniej wyewoluowanych i funkcjonalnych domen białkowych.

Autorzy hipotezy tasowania egzonów — W. Gilbert i współpracownicy usiłowali oszacować liczbę wszystkich istniejących egzonów, to znaczy odpowiedzieć na pytanie, jak wiele różnych egzonów było niezbędnych do wytworzenia przez ewolucję istniejącej obecnie różnorodności białek w świecie ożywionym. Sądząc po olbrzymiej liczbie gatunków — i jak się wydaje odpowiadającej im różnorodności białek — wydawałoby się, że liczba egzonów musi być astronomiczna. Gilbert uzyskał jednak zupełnie przeciwny wynik.

Przyjęta metoda polegała na analizie statystycznej zbioru wszystkich znanych sekwencji kodujących białka, tj. ok. 20 000 sekwencji DNA. W zależności od przyjętego modelu matematycznego, Gilbert oszacował liczbę wszystkich występujących obecnie egzonów na 1000–7000. Jest ona zaskakująco mała w porównaniu z liczbą wszystkich możliwych sekwencji peptydu o długości 40 aminokwasów, która wynosi 10^{52} lub też z liczbą przeciwną, wystarczającą do wystąpienia sekwencji specyficznej dla dowolnego antygeny, która u myszy wynosi ok. 10^8 . Metoda zastosowana przez Gilberta spotkała się z krytyczną oceną wielu badaczy i nie jest wykluczone, że liczba egzonów jest większa niż

7000. Niezależnie jednak od precyzji, z jaką będzie można dokonać obliczenia tej wartości — wydaje się, że liczba „elementów budulcowych” wykorzystanych przez ewolucję jest niezwykle mała w porównaniu z możliwościami wynikającymi z kombinacji 20 aminokwasów.

Ewolucja odbywała się w sposób przyspieszony — przez wykorzystanie „podzespołów” w postaci egzonów kodujących funkcjonalne domeny białkowe. Tak więc białko o długości 200 aminokwasów mogło powstać przez tasowanie pięciu egzonów, każdy o długości 40 aminokwasów (25 000 możliwych kombinacji), a nie w wyniku pojedynczych substytucji nukleotydowych (20^{200} kombinacji).

Drugim istotnym wnioskiem wynikającym z faktu istnienia stosunkowo niewielkiej liczby egzonów jest to, że obecnie występująca różnorodność białek odzwierciedla jedynie małą część wszystkich teoretycznie możliwych rozwiązań ewolucyjnych. Stało się tak dlatego, że ewolucja jest procesem utrwalającym zmiany, które zaszły w trakcie jej przebiegu. Powstawanie i utrwalanie nowych sekwencji aminokwasów jest zawężone na skutek ewolucyjnego sukcesu kombinacji już uprzednio powstałych. Tak więc powstanie określonego zestawu egzonów w początkach ewolucji mogło zdeterminować jej dalszy bieg: różnorodność białek była kreowana z „początkowego” zestawu egzonów, nie zaś kreowana *de novo* z puli losowych kombinacji.

Najnowsze techniki biologii molekularnej potwierdzają powyższą tezę, możliwe jest bowiem syntetyzowanie odcinków DNA lub RNA o losowej sekwencji, a następnie ze zbioru 10^8 takich cząsteczek można selekcjonować i namnażać (za pomocą reakcji PCR, czyli reakcji łańcuchowej polimerazy) cząsteczki wykazujące specyficzne właściwości katalityczne. W ten sposób uzyskano rybozomy i cząsteczki białka o niespotykanych w przyrodzie właściwościach, np. zdolne do wiązania pewnych barwników czy też mające zdolność specyficznego cięcia genomów wirusowych, np. wirusa HIV. Z kolei wyselekcjonowane w ten sposób cząsteczki, o właściwościach „naturalnie” wytworzonych przez ewolucję, mają sekwencje białek czy RNA zupełnie niepodobne do sekwencji występujących w przyrodzie. Fakty te potwierdzają wnioski Gilberta o ograniczonej historycznie różnorodności rozwiązań ewolucyjnych i świadczą o istnieniu różnorodności czynnych katalitycznie sekwencji, z których ewolucja nie skorzystała. Praktyczne wykorzystanie tego potencjału może przynieść ogromne korzyści w biotechnologii i w medycynie.

13.10. Czy introny pojawiły się wcześniej czy późno w ewolucji?

Genomy różnych organizmów zawierają niejednakowe liczby intronów. Na przykład genom ludzki zawiera ich bardzo dużo, do kilkudziesięciu intronów na jeden gen, genom drożdży *Saccharomyces cerevisiae* ma ich bardzo niewiele, natomiast genom *E. coli* nie zawiera ich wcale. Zupełnie odwrotnie dzieje się

w genomach mitochondrialnych: mtDNA ludzkie nie zawiera w ogóle intronów, podczas gdy są one liczne w mtDNA drożdży. Fakt ten nasuwa wiele pytań: przede wszystkim czy introny spełniają jakąś funkcję, czy stanowią wartość w doborze naturalnym oraz czy istniały od samego początku ewolucji, czy też pojawiły się w pewnym jej momencie, np. w trakcie lub po oddzieleniu się eukariontów od prymitywnego przodka — tzw. progenoty.

Współcześni badacze nie udzielają zgodnych odpowiedzi na te pytania. Część genetyków faworyzuje hipotezę o pojawieniu się intronów stosunkowo późno w ewolucji, już po powstaniu progenoty. Według tych poglądów progenota zawierała geny ciągłe, pozbawione intronów. Intron pojawił się jako rodzaj inwazyjnych transpozonów, obdarzonych możliwością samowycinania się na poziomie RNA. Ich włączenie się w genom nie powodowało skutków w doborze naturalnym i w tym sensie introny te byłyby typowym przykładem „samolubnego DNA”, to znaczy sekwencji włączonej w genom i korzystającej z aparatu replikacyjnego tegoż genomu, bez wywoływania efektów fenotypowych. Chociaż insercja intronów nie powodowała natychmiastowych skutków, na dłuższą metę okazała się mechanizmem przyspieszającym ewolucję — przez umożliwienie tasowania egzonów.

Niektóre cechy intronów mitochondrialnych stanowią poparcie dla przedstawionych tez. Na przykład pewne introny mtDNA drożdży kodują enzymy służące do ich wycinania — tzw. maturazy. Inne introny mitochondrialne drożdży mają zdolność do przenoszenia się z genomu zawierającego intron do określonego miejsca w genomie bez intronu. Intron ω z genu kodującego duży mt rRNA drożdży koduje endonukleazę, która uczestniczy w procesie takiego przenoszenia się (ang. intron homing). Ostatnio udało się wykryć w genomie mitochondrialnym rzodkiewnika (*Arabidopsis*) układ jednego intronu w drugim — tzw. twintron, czyli intron bliźniaczy i uważa się ten fakt za dowód na inwazyjność intronów.

Z kolei zwolennicy teorii o wczesnej obecności intronów w ewolucji zakładają, że introny powstały równocześnie z egzonami jeszcze w czasie trwania świata RNA, a więc przed powstaniem pregenoty. Umożliwiły w ten sposób tasowanie egzonów jako „przyspieszoną drogę ewolucji”. Według zwolenników tej koncepcji, wprowadzenie intronów do istniejących już uprzednio genów musiałoby się wiązać z obniżeniem sprawności ewolucyjnej organizmów.

Zgodnie z teorią „wczesną” — introny mogą być „gubione” przez genomy i stąd bakterie pozbyły się ich całkowicie, gdyż dla szybko rozmnażających się organizmów jednokomórkowych stanowiło to element przewagi selekcyjnej.

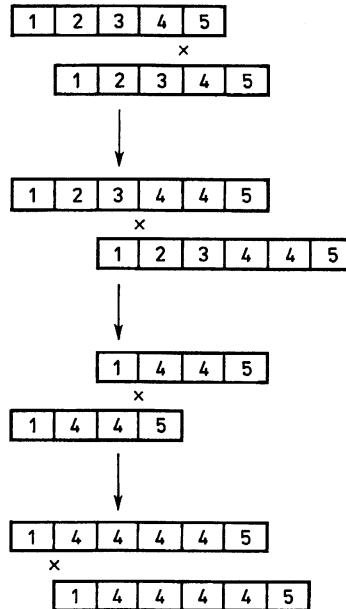
13.11. Geny należące do rodzin wielogenowych ewoluują razem

Niektóre geny powtórzone są w genomie wiele razy i tworzą tak zwane rodziny wielogenowe. Najbardziej charakterystycznym przykładem jest rodzina genów kodujących rybosomalne RNA, występująca powszechnie u eukarion-

tów. Na przykład u grzyba strzępkowego *Aspergillus nidulans* geny kodujące 18SrRNA, 5.8SrRNA i 26SrRNA leżą obok siebie i układ ten powtórzony jest kilkaset razy na jednym odcinku chromosomu (ang. tandem repeats). Z kolei geny kodujące 5SrRNA u *Aspergillus* także są powtórzone kilkaset razy w genomie, występują jednak pojedynczo na różnych chromosomach i tworzą tak zwaną rodzinę rozproszoną.

Analiza sekwencji nukleotydowych genów należących do rodzin wielogenowych ujawniła nieoczekiwany fakt: wszystkie geny powtórzone obok siebie są jednakowe w obrębie jednego gatunku, ale mogą różnić się znacznie od analogicznych odcinków DNA innego, blisko spokrewnionego gatunku. Co więcej, zależność ta zachodzi także dla tych odcinków DNA, które nie kodują żadnych produktów: na przykład w rodzinie powtarzających się sekwencji DNA, kodujących przerywniki (ang. spacers) między genami 18SrRNA i 28SrRNA u *Xenopus laevis* i *Xenopus mulleri*, sekwencje przerywników są praktycznie identyczne wewnątrzgatunkowo, ale różnią się ok. 10% pomiędzy tymi dwoma gatunkami. Fakt ten oznacza, że powtórzone geny w obrębie gatunku ewoluują wspólnie i utrzymują homogenność sekwencji. Mutacja w jednym elemencie rodziny wielogenowej albo ulega eliminacji, albo utrwała się wskutek rozprzestrzeniania się na wszystkie geny tworzące rodzinę genową. Proces ten nazywany jest ewolucją zespołową (ang. concerted evolution).

Ewolucja zespołowa zachodzi niezależnie od faktu, czy dana rodzina genów lub sekwencji koduje jakies czynne fenotypowo produkty, ponadto występuje także w przypadku rozproszonych rodzin genowych. Na przykład u *Aspergillus nidulans* ewolucji zespołowej podlegają nie tylko rozproszone geny kodujące 5SrRNA, ale także rozproszone fragmenty pseudogenów 5SrRNA.



Rys. 13.6. Model ewolucji zespołowej (ewolucji przebiegającej zgodnie) przez nierówny crossing-over. Numery przedstawiają kolejne elementy powtórzonych odcinków DNA

Przypuszcza się, że za ewolucję zespołową odpowiedzialna jest konwersja genów lub niewzajemny crossing-over. Schemat przedstawiający homogenizację sekwencji rodziny genowej przez niewzajemny crossing-over pokazany jest na rysunku 13.6. Za mechanizmem tym przemawia fakt, że liczba powtarzających się jednostek w rodzinach wielogenowych może być różna, nawet w obrębie tego samego gatunku. Liczby kopii genów kodujących rybosomalne RNA oszacowane na podstawie kinetyki reasocjacji DNA wynoszą: u kukurydzy — 3100–9400, u *Drosophila* — 100–230, u człowieka zaś — 50–190.

13.12. Część DNA w genomach nie ulega ekspresji

W trakcie ok. 3 mld lat ewolucji od najprostszych organizmów do obecnych ssaków i roślin zawartość DNA w genomach wzrosła ok. 1000 razy. Początkowo uważano, że wzrost zawartości DNA jest odzwierciedleniem wzrostu skomplikowania, gdyż nowe cechy metaboliczne i rozwojowe muszą być kodowane przez nowe geny, które nie mają odpowiedników u prostszych ewolucyjnie organizmów. Na przykład geny kodujące fibrynogen, haptoglobinę czy immunoglobuliny są znane wyłącznie u kręgowców. Jednakże okazało się, że ilość DNA w genomie często jest zupełnie nie skorelowana z pozycją organizmu na „drabinie ewolucyjnej”. Fakt ten znany jest jako paradoks zawartości DNA (ang. C-value paradox). Na przykład wiele gatunków płazów zawiera więcej DNA niż ssaki, a pewien gatunek ryby płucodysznej zawiera 40 razy więcej DNA niż człowiek.

Analiza molekularna genomów eukariotycznych wykazała, że ich większa część złożona jest z sekwencji nie kodujących: głównie obszarów wewnątrz intronów oraz z międzygenowych sekwencji powtarzających się. Procentowa zawartość sekwencji repetetywnych w genomach jest różna, u niższych eukariotów dochodzi do 10–20%, u zwierząt — do 50% a u niektórych roślin osiąga wartość 80%. Dane te pochodzą z eksperymentów, w których DNA jest losowo pofragmentowany na krótkie odcinki, a następnie denaturowany i renaturowany. Śledzenie tempa renaturacji przez pomiary absorpcji w UV pozwala na oszacowanie zawartości sekwencji powtarzających się, gdyż renaturują one szybciej. I tak stwierdzono, że u myszy ok. 10% DNA zbudowane jest z sekwencji repetetywnych, czyli powtarzających się wielokrotnie w genomie: występuje tam ok. 1 000 000 kopii prawie identycznej sekwencji DNA o długości 234 par zasad; ok. 20% DNA składa się z różnych sekwencji powtórzonych 100–100 000 razy oraz ok. 70% DNA stanowi geny występujące średnio w jednej kopii na haploidalny zestaw chromosomów. Frakcja DNA repetetywnego nazywana jest DNA satelitarnym, gdyż w trakcie wirowania preparatów DNA w gradiencie gęstości chlorku cezu tworzy ona odrębny prążek. Powtarzająca się sekwencja 234 par zasad tworząca DNA satelitarny myszy składa się z krótszych, homologicznych do siebie podjednostek i wydaje się, że pochodzi ona od podstawowej sekwencji o długości 9 par zasad.

W genomie człowieka występuje klasa powtarzających się sekwencji DNA, zwana rodziną Alu. Nazwa ta pochodzi stąd, że w obrębie sekwencji Alu występuje miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *AluI*. Sekwencje Alu mają ok. 300 par zasad; są one powtórzone ok. 300 000 razy i są rozproszone w genomie. Niektóre z nich występują nawet wewnątrz intronów, natomiast średnia odległość między kolejnymi sekwencjami Alu wynosi ok. 6000 par zasad. Wydaje się, że sekwencje Alu nie pełnią żadnych funkcji; mają jednak zdolność do rozprzestrzeniania się, ponieważ zawierają wewnętrzny promotor i mogą być transkrybowane przez polimerazę RNA III. Transkrypty Alu są w stanie włączać się w różne miejsca genomu korzystając z procesu retrotranspozycji, to jest zjawiska polegającego na odwrotnej transkrypcji RNA w DNA i integracji powstałego DNA do chromosomów. Taki proces reintegracji sekwencji do genomów może w istotny sposób wpływać na zawartość DNA w genomach. Zjawisko to jest dość częste, na przykład genom myszy zawiera wiele pseudogenów globinowych, niektóre z nich nie zawierają intronów i stąd wydaje się, że powstały na drodze retrotranspozycji. Proces „wypompowywania” pseudogenów z pojedynczego, transkrybowanego locus przyrównywano do wypływu lawy z wulkanu i stąd nazwano go modelem Wezuwiusza.

Włączanie się bezintronowych genów do chromosomu po odwrotnej transkrypcji ich dojrzałego mRNA stanowi prostą drogę precyzyjnego pozbywania się intronów na poziomie DNA. Geny *Saccharomyces cerevisiae* bardzo rzadko zawierają introny, to samo dotyczy genomów prokariotycznych. Jest więc możliwe, że w trakcie ewolucji organizmy te pozbyły się intronów w opisany powyżej sposób, ponieważ dobór naturalny faworyzował ograniczanie ilości DNA w genomie.

13.13. Geny powstające przez odwrotną transkrypcję mogą pełnić ważną rolę w ewolucji

Ostatnio wykazano, że niektóre geny powstałe w wyniku retrotranspozycji, czyli tak zwane retrotranspozony, pełnią funkcje w metabolizmie komórek. Fakt ten oznacza, że zjawisko retrotranspozycji może nie tylko prowadzić do „zaśmiecania” genomów, ale może być uważane za istotną drogę w ewolucji nowych genów. Wydaje się, że gen kodujący insulinę (typ I) u szczura jest retrotranspozonomem, który powstał w wyniku niekompletnego składowania pierwotnego transkryptu. Kolejnym przykładem są geny kodujące kinazę fosfoglicerynianu (*Pgk-1*) i dehydrogenazę pirogronianu (*Pdha-1*) u myszy i u człowieka. Oba geny są położone na chromosomie X, ulegają ekspresji w komórkach somatycznych i każdy z nich zawiera 10 intronów. Istnieją jednak autosomalne geny *Pgk-2* i *Pdha-2*, kodujące wspomniane enzymy, które ulegają ekspresji wyłącznie w gonadach męskich i wykazują charakterystyczne cechy retrotranspozonów. W innym przypadku retrotranspozony pełnią funkcję

regulacyjną w stosunku do istniejącego uprzednio genu: zmodyfikowane końce 3' pseudogenu γ -aktyny służą jako rejony promotorowe ludzkich genów kodujących amylazy śliniankowe. Przedstawione przykłady sugerują, że retrotranspozony i nieaktywne retropseudogeny mogą pełnić istotną rolę w ewolucji, stanowiąc rodzaj rezerwuaru sekwencji, używanych do tworzenia nowych genów.

13.14. Genomy mogą być kolonizowane przez pasożytniczy, samolubny DNA

Jak opisano w poprzednim rozdziale, genomy organizmów żywych zawierają niekiedy bardzo duże ilości sekwencji, które prawdopodobnie nie pełnią żadnej funkcji. Sekwencje przerywnikowe między genami, repetetywny DNA, introny, transpozony i pseudogeny mogą stanowić ponad połowę całkowitej ilości DNA w genomie i bywają nazywane śmieciami molekularnymi (ang. junk DNA). W celu wyjaśnienia faktu utrzymywania się tych sekwencji w genomach L. Orgel, F. Crick, C. Sapienza i W. Doolittle sformułowali hipotezę samolubnego DNA (ang. selfish DNA). Zakłada ona, że istnieją sekwencje DNA, które są lub były zdolne do rozprzestrzeniania się w genomach. Sekwencje te stanowią rodzaj pasożytów molekularnych, które namnażają się kosztem aparatu replikacyjnego komórek. Samolubny DNA, nie kodując żadnej funkcji, jest pasywnym „pasażerem bez biletu” w ewolucji.

Powstaje pytanie, dlaczego dobór naturalny nie jest w stanie eliminować takiego DNA u wielu gatunków. Być może, że u szybko dzielących się jednokomórkowców, jak bakterie i drożdże, zwiększanie ilości DNA jest poddane bliżej jeszcze nie znanym ograniczeniom i dlatego śmieci molekularne są eliminowane. Z drugiej strony, odróżnienie „własnego” DNA komórki od rozprzestrzeniającego się transpozonu czy sekwencji Alu wydaje się biochemicznie niemożliwe, natomiast insercja w obrębie intronu czy też odcinka między genami ma najczęściej charakter neutralny pod względem doboru. Stąd też jedynym ograniczeniem ekspansji DNA śmieciowego wydaje się koszt energetyczny utrzymania zwiększonego genomu. Wyższe eukarionty wykazują jednak zadziwiającą tolerancję na samolubny DNA — u roślin zawartość sekwencji nie kodujących często dochodzi do 80% całkowitej ilości DNA.

Znany ewolucjonista R. Dawkins (Anglia), który jest twórcą sformułowania „samolubny gen”, uważa, że paradoks zawartości DNA jest pozorny. DNA nie istnieje bowiem po to, aby sprawować „nadzór” nad metabolizmem komórki i dziedziczeniem jej cech. W istocie jest odwrotnie — jedyną funkcją DNA jest jego przeżycie i replikowanie się, natomiast metabolizm, struktury komórkowe i całe organizmy żywe są jedynie środkami do tego celu, wytworzonymi przez ewoluujący DNA. W tym sensie wszystkie geny są „samolubne” — zarówno te, które kodują jakieś funkcje, jak i te, które są w stanie

wykorzystać genomy jako wehikuly, nie dostarczając w zamian nic. Geny kodujące produkty podlegają selekcji przez fenotypy organizmów, mutacja w danym genie prowadzi zatem do zmian częstości występowania tego genu w stosunku do nie zmutowanych alleli. Z kolei śmieci molekularne nie ulegają wprawdzie ekspresji fenotypowej, ale mogą podlegać selekcji wewnątrzgenomowej — to znaczy zmieniać swoją częstość występowania w obrębie genomu. Selekcja wewnątrzgenomowa może więc doprowadzić do wzrostu liczby pewnych typów sekwencji DNA, które są w stanie szczególnie efektywnie zaśmiecać chromosomy. Ponieważ rozprzestrzenianie wewnątrzgenomowe jest podobne do działania wirusa, Orgel i Crick nazwali ten proces „rakiem genomów”.

13.15. Czy rzeczywiście pochodzimy od jednej pramatki Ewy?

Pochodzenie i ewolucja gatunku *Homo sapiens* jest jednym z najbardziej fascynujących problemów biologii. Nowe techniki biologii molekularnej i sekwencjonowanie całych genomów z pewnością dostarczą ogromną liczbę danych na temat ewolucji genów u naczelnych.

Wiele dotychczasowych badań nad ewolucją molekularną człowieka opierało się na ustaleniu polimorfizmu miejsc restrykcyjnych (RFLP) mitochondrialnego DNA. Na podstawie tych badań wysunięto hipotezę, że wszyscy pochodzimy od jednej pramatki — tzw. mitochondrialnej Ewy. Hipoteza ta wzbudziła wiele sprzeciwów, zarówno ze strony antropologów i archeologów, jak i ostatnio genetyków.

Podstawą hipotezy o istnieniu pramatki Ewy stanowią badania nad ewolucją mtDNA. U ssaków mtDNA ewoluuje ok. 10 razy szybciej niż geny jądrowe. Spowodowane jest to brakiem mechanizmów naprawy poreplikacyjnej w mitochondriach oraz większą tolerancją na substytucje nukleotydowe w trzeciej pozycji kodonów. Ponieważ „zegar molekularny” w mtDNA porusza się szybciej niż w genomie jądrowym, analiza mtDNA może być źródłem informacji o ewolucji gatunków rozdzielonych stosunkowo niedawno. Co więcej, wydawało się, że mitochondria plemników nie wnikają do komórki jajowej w trakcie zapłodnienia, tak więc mtDNA stanowiłoby czystą linię matczyną a nie wynik rekombinacji genomów obojga rodziców.

A. Wilson i współpracownicy (Stany Zjednoczone), wychodząc z tych założeń poddali analizie restrykcyjnej próbki mtDNA, reprezentujące 147 osób różnych ras, i na tej podstawie skonstruowali drzewo genealogiczne mtDNA. Uzyskane wyniki sugerowały, że najstarszą rasą jest rasa czarna, gdyż w jej obrębie zmienność mtDNA jest największa oraz że wszystkie występujące obecnie genomy mitochondrialne dają się wyprowadzić z jednego pierwotnego genomu, czyli od jednej hipotetycznej „pramatki Ewy”, która żyła w Afryce ok. 200 000 lat temu.

Jednakże w roku 1991 udowodniono doświadczalnie, że u gryzoni mtDNA może się dziedziczyć po samcach. Tak więc podstawowe założenie, na którym opiera się teoria „pramatki Ewy” uległo zmianie, co w efekcie podważa konkluzje tej teorii. Co więcej, poddano krytyce samą metodę konstrukcji drzewa genealogicznego.

Być może, że dokładniejsze dane na temat ewolucji człowieka będzie można uzyskać z sekwencjonowania określonych genów, np. genu na chromosomie Y, który warunkuje rozwinięcie się cech męskich. Trudności może jednak nastręczyć stosunkowo krótki czas, jaki upłynął od ewolucji naczelnych. Wydaje się, że większość genów jądrowych ewoluuje zbyt wolno, aby mogły stanowić dobry „zegar ewolucyjny”. I tak analizowane ostatnio odcinki ludzkiego chromosomu Y o długości 800 par zasad nie wykazały żadnych różnic w sekwencji u osobników należących do 16 różnych ras. Ustalenie optymalnych fragmentów genomu do takiej analizy będzie więc niezbędne do dalszych badań nad ewolucją człowieka i do rozstrzygnięcia problemu „pramatki Ewy”.

13.16. Czy symbioza i horyzontalny transfer genów mogą być motorem ewolucji?

Niektórzy badacze postulują, że za ewolucję gatunków są odpowiedzialne mechanizmy inne niż neodarwinowskie, to jest mutacje, duplikacje czy tasowanie odcinków DNA w obrębie jednego gatunku. Lynn Margulis (Stany Zjednoczone), która jest autorką teorii o endosymbiotycznym pochodzeniu mitochondriów i chloroplastów, sugeruje, że motorem ewolucji gatunków jest symbioza. Cała biosfera byłaby więc jednym żywym organizmem: Gają (czyli matką Ziemią z mitologii greckiej). Hipoteza Gai jest dość kontrowersyjna i nie opiera się na konkretnych modelach molekularnych, korzysta natomiast z faktu, że biologia nie jest jeszcze w stanie odpowiedzieć na pytanie, jakie konkretnie różnice w genomach świadczą o odrębności gatunków oraz w jaki sposób do takiego wyodrębnienia dochodzi.

Pewną przesłanką dla hipotezy Gai jest stwierdzony fakt horyzontalnego transferu genów, to jest przekraczania przez DNA barier między genomami jądrowymi i organellarnymi oraz między różnymi gatunkami. Taki transfer genów znany był od dawna u prokariotów, gdzie przenoszenie genów w postaci fragmentów chromosomów, na fagach czy plazmidach i episomach jest zjawiskiem powszechnym. Lata 80. ujawniły jednak wiele przykładów „swobodnego DNA” (ang. promiscuous DNA), czyli DNA przenoszącego się między różnymi genomami. I tak gen kodujący dysmutazę nadtlenków uległ przeniesieniu z genomu ryby do bakterii *Photobacter leiognathi*, gen kodujący histon H3 uległ wymianie między bardzo daleko spokrewnionymi gatunkami jeźowców. Znalezione także odcinek DNA chloroplastowego o długości 12 tysięcy par zasad, który został włączony do genomu mitochondrialnego kukurydzy. Z kolei w genomach jądrowych wielu organizmów znaleziono odcinki DNA mitochondrialnego.

Mimo stwierdzenia tych faktów, nie jest jeszcze jasne, czy horyzontalny transfer genów jest zjawiskiem wyjątkowym, czy też ma charakter uniwersalny i stanowi istotny czynnik w ewolucji.

13.17. Podsumowanie

Ewolucja życia na Ziemi trwa około 3 do 4 mld lat, jest więc procesem, który nie daje się modelować doświadczalnie. Przedstawione w tym rozdziale hipotezy opierają się jednak na dobrze udokumentowanych faktach z dziedziny biologii molekularnej. W ostatnich latach największe znaczenie dla badań nad ewolucją miało ustalenie i porównywanie sekwencji nukleotydowej genów oraz odkrycie, że RNA może mieć właściwości katalityczne. Za początek procesów życiowych można uznać powstawanie cząsteczek RNA zdolnych do katalizy reakcji biochemicznych oraz własnej replikacji. Cząsteczki te stanowiły więc jednocześnie genotyp i fenotyp. Ich dalsza ewolucja doprowadziła do wytworzenia metabolizmu opartego na katalizie białkowej oraz do wytworzenia stabilnych genomów w postaci dwuniciowego DNA. Powstały w ten sposób praorganizm, zwany progenotą, był przodkiem wszystkich żyjących obecnie organizmów — świadczy o tym jednolitość zasad kodowania informacji genetycznej. W wielu przypadkach obecna struktura genomów odzwierciedla ewolucyjną drogę ich powstawania: i tak genomy mitochondrialne i chloropllastowe są relikami organizmów, które dokonały inwazji symbiotycznej do komórek przodków eukariontów. Ewoluujące geny wytwarzały kolejne, coraz doskonalsze i bardziej skomplikowane fenotypy, konkurujące ze sobą w procesie doboru naturalnego i służące dalszej replikacji oraz ekspansji ich genotypów. Nowe geny powstawały nie tylko przez mutacje, ale przede wszystkim w wyniku tasowania egzonów, to jest składania nowych genów z części, będących egzonami kodującymi domeny białkowe o specyficznych funkcjach. Wiele genomów zawiera sekwencje DNA, które zapewne nie pełnią żadnej funkcji i stanowią rodzaj pasożytniczego, samolubnego DNA. Dalsze badania porównawcze nad sekwencjami DNA oraz odkrywanie molekularnych podstaw procesów biologicznych będą w stanie poszerzyć naszą wiedzę o przebiegu oraz mechanizmach ewolucji.

14. NOWY WSPANIAŁY ŚWIAT BIOTECHNOLOGII

Metody rekombinacji DNA *in vitro* zastosowano do genetycznych modyfikacji organizmów wykorzystywanych w celach biotechnologicznych. Technologie służące do wytwarzania użytecznych żywych organizmów lub substancji pochodzących z organizmów i(lub) ich części definiowane są jako biotechnologiczne. Działalność taka zawsze towarzyszyła społecznościom ludzkim. Dzięki nowym metodom genetycznym powstały jednak nowe możliwości świadomych modyfikacji genotypów i tworzenia nowych kombinacji genów. W tym rozdziale zostaną podane przykłady jedynie tych osiągnięć inżynierii genetycznej prowadzących do konstrukcji nowych genotypów żywych organizmów, które mogą być lub już są wykorzystane w technologiach przemysłowych.

Uczeni, którzy opublikowali w roku 1974 w czasopiśmie *Science* oświadczenie na temat bezpiecznego stosowania technik rekombinacji DNA *in vitro*, zwrócili uwagę zarówno na towarzyszące temu zagrożenia, jak i na potencjalne korzyści dla badań podstawowych i stosowanych. Formułowane wówczas optymistyczne nadzieje nie straciły na aktualności, a skonkretyzowane w postaci szczegółowych wyników — przyniosły wiele pożytku.

14.1. Wprowadzenie do zagadnień współczesnej biotechnologii

14.1.1. Zakres stosowania technik rekombinacji DNA *in vitro* w projektach biotechnologicznych. Sprzężenie nauki z techniką

Biotechnologicznymi celami osiąganymi w badaniach metodami rekombinacji *in vitro* mogą być:

- (a) klonowanie i ekspresja genów kodujących określone białka;
- (b) optymalizacja poziomu ekspresji określonego genu kodującego żądane białko. Poziom ten zależy m.in. od rodzaju użytego wektora i gospodarza oraz od nukleotydowych sekwencji regulacyjnych towarzyszących genowi;
- (c) zamierzone modyfikacje sekwencji nukleotydowych kodujących dane białko: ekspresja tak zmutowanych genów prowadzi do syntezy rodzin białek, zwanych muteinami, często o nowych właściwościach; ich badania stanowią przedmiot zainteresowań inżynierii białkowej;
- (d) utworzenie wyższych organizmów transgenicznych, nosicieli heterologicznych genów we wszystkich komórkach, również rozrodczych;
- (e) somatyczna terapia genowa dojrzałych osobników;
- (f) diagnostyka genowa, związana z oznaczaniem sekwencji nukleotydów pojedynczych genów, dużych fragmentów i pełnych genomów.

Organizmy modyfikowane metodami rekombinacji DNA *in vitro* znalazły zastosowanie w praktyce medycznej i rolniczej, w licznych technologiach przemysłów: farmaceutycznego, chemicznego, przetwórczego, wydobywczego, w różnego typu analityce i wreszcie w ochronie środowiska naturalnego.

Rekombinacja DNA *in vitro* jest jedną z licznych metod realizacji celów biotechnologicznych. Jej optymalne wykorzystanie zależy od osiągnięć wielu gałęzi nauki, takich jak mikrobiologia, biochemia, biologia komórki, chemia, informatyka, fizyka, a także ekonomia. Rachunek ekonomiczny projektu powinien uwzględniać trwałość genetyczną produkcyjnego szczepu, wydajność procesu w skali produkcyjnej, koszt surowców, energochłonność, koszt uzyskania tego samego produktu metodami tradycyjnymi, chłonność rynku itp.

14.1.2. Czynniki warunkujące sukces projektu biotechnologicznego

Projekt programu biotechnologicznego powinien wynikać z podstawowej wiedzy o mechanizmach ekspresji genów: znajomości struktury genomu dawcy i biorcy DNA (geny podzielone u *Eukaryota*, układy operonów u *Prokaryota*, częstotliwość używania kodonów itp), znajomości sekwencji DNA regulujących transkrypcję i translację, znajomości potranslacyjnych modyfikacji pierwotnego produktu translacji (skracanie, specyficzna glikozylacja, fosforylacja, acylacja itp.).

Cel doświadczenia decyduje o wyborze postępowania w konstruowaniu nowych kombinacji genów. Należy zmierzać do jak najlepszego dostosowania konstrukcji klonowanych heterologicznych sekwencji DNA do cech genetycznych biorcy. Jest to warunek konieczny, ale nie wystarczający, do osiągnięcia pomyślnego wyniku końcowego. Decydują o nim również nieprzewidywalne *a priori* w większości przypadków: stabilność strukturalna zrekombinowanego DNA, stabilność segregacyjna wektora, warunki hodowli, stabilność odpowiedniego mRNA, poziom ekspresji klonowanego genu, czułość metody wykrywania poszukiwanego produktu (białka) i formy jego gromadzenia przez komórkę biorcę.

Potencjalne szczepy produkcyjne mikroorganizmów, skonstruowane metodami rekombinacji DNA *in vitro* i charakteryzujące się dużą liczbą kopii wektora oraz wysokim poziomem ekspresji klonowanego genu, mogą być łatwo zdominowane w warunkach przemysłowych przez szczepy dzikie, ze względu na zazwyczaj przedłużony czas generacji modyfikowanego genetycznie szczepu. Zrekombinowany DNA ulega często delecjom, przegrupowaniom wewnątrzwektorowym, może też ulec rekombinacji z genomem gospodarza. Wydajność końcowa produkcji zależy od składu pożywki hodowlanej (obecność czynników selekcyjnych), pH, temperatury, sposobu hodowli (np. unieruchomienie komórek). Uzyskiwane białko może być zdenaturowane (ciałka inkluzyjne w *E. coli*) albo ulegać nie zaplanowanej proteolizie.

Wydajność ekspresji i trwałość końcowego produktu białkowego można zwiększyć klonując odpowiedni gen w wektorze sekrecyjnym lub dokonując fuzji klonowanego genu z fragmentem genu biorcy (wynikiem ekspresji jest fuzyjne białko). Ten ostatni, często bardzo skuteczny, sposób stabilizacji zrekombinowanych białek wprowadza nowe utrudnienie techniczne, przedłużając procedurę ich wyodrębniania o etap usunięcia fragmentu polipeptydowego pochodzącego od biorcy.

14.1.3. Rozwój firm biotechnologicznych

Rozwój współczesnej biotechnologii, zapoczątkowany w Stanach Zjednoczonych, rozpoczął się od tworzenia małych firm biotechnologicznych. Zakładali je zazwyczaj pracownicy uniwersytetów, którzy wcześniej już nauczyli się stosować w doświadczeniach metody rekombinacji DNA *in vitro*. Firmy rozpoczynały działalność od rozeznania potrzeb rynkowych. Po podjęciu decyzji o profilu produkcji organizowano laboratorium.

Jak w każdym konkurencyjnym przemyśle wyniki pracy są w firmach biotechnologicznych tajne (do momentu uzyskania patentu), a firmie przede wszystkim zależy na szybkim tempie osiągnięcia końcowego produktu handlowego, a nie na wyjaśnianiu mechanizmów jego powstawania.

W miarę rozwoju biotechnologii małe firmy były wchłaniane przez wielkie koncerny, bądź też podpisywały z nimi umowy o przekazaniu technologii gotowej do wdrożenia. W roku 1991 w Stanach Zjednoczonych działały 742 firmy biotechnologiczne. Były to:

- (a) firmy prywatne (59%);
- (b) spółki akcyjne (19,5%);
- (c) pododdziały dużych korporacji (18,5%).

Na czele listy spółek akcyjnych znajdowały się: Amgen, Centocor, Chiron i Genentech. W sumie firmy biotechnologiczne w Stanach Zjednoczonych zatrudniały wówczas 73 tys. pracowników, wydawały na badania 3,6 mld \$ rocznie, ich dochód wynosił 12 mld \$. Najszybciej rosła liczba oddziałów dużych koncernów przemysłowych.

Nowoczesną biotechnologią farmaceutyczną, wytwarzaniem leków i medycznych zestawów diagnostycznych zajmowało się w roku 1991 w Stanach Zjednoczonych 363 firm.

Przemysł farmaceutyczny należy do bardzo dochodowych, chociaż uzyskanie nowego leku trwa długo (ok. 12–15 lat) i jest kosztowne (ok. 250 mln \$). Każdy produkt musi być przebadany pod kątem bezpieczeństwa, wymaga badań przedklinicznych na komórkach i zwierzętach oraz trzech faz badań klinicznych. Do amerykańskiej agencji zatwierdzającej nowe leki — FDA — w roku 1986 zgłoszono 100 leków biotechnologicznych i 150 uzyskanych innymi technologiami; w roku 1991 liczby te wynosiły odpowiednio 300 i 230. W roku 1993 40 preparatów przeciwciał monoklonalnych i 150 białek przechodziło fazy badań klinicznych, 100 z tych białek nie było stosowanych przedtem w terapiach chorób człowieka.

Budżet federalny na rozwój biotechnologii w roku 1993 w Stanach Zjednoczonych przewidywał 3 125 mln \$ na dziedziny szeroko pojętej ochrony zdrowia i 900 mln \$ na pozostałe. Do tego czasu na rynek wprowadzono kilkadziesiąt leków pochodzenia rekombinacyjnego (m.in. hormon wzrostu, insulinę, interferony α , β , γ , erytropoetynę, czynniki stymulujące wzrost kolonii) i monoklonalnych przeciwciał, a kilkaset było w różnych fazach prób klinicznych. W przodującej firmie badawczo-rozwojowej Genentechu dochody ze sprzedaży t-PA wynosiły 1/3 całości, firma Amgen w roku 1993 sprzedawała dwa leki uzyskane w wyniku rekombinowania DNA (erytropoetynę i czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów) za 1,2 mld \$. Kilka tego typu firm (Biogen, Genzyme, Chiron, Amgen) utrzymywało się już z własnej produkcji.

W dalszej kolejności na liście biotechnologicznych przedsiębiorstw w Stanach Zjednoczonych w roku 1991 znalazły się firmy pracujące na rzecz rolnictwa (127), odczynników i wyposażenia (88), wreszcie ochrony środowiska (29). Wśród najbardziej dochodowych produktów królowały: ludzka insulina wytwarzana przez mikroorganizmy (Humulina, 450 mln \$), tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA, lek trombolityczny stosowany przy zatorach naczyń krwionośnych) i erytropoetyna (hormon białkowy wytwarzany w nerkach, pierwotny regulator erythropoezy u ssaków, stymulujący podziały i różnicowanie komórek erytroidalnych, 200–300 mln \$).

Ostatnie lata przyniosły jednak wyraźny spadek dynamiki przyrostu liczby firm. Podczas gdy w najbardziej korzystnym roku 1987 założono w Stanach Zjednoczonych 91 nowych firm, w roku 1991 powstało tylko dwie.

Biotechnologiczny kapitał amerykański uczestniczył w przedsięwzięciach międzynarodowych: w latach 1985–1989 firmy japońsko-amerykańskie wytwarzające leki stanowiły 13,5% amerykańskiego zaangażowania finansowego, amerykańsko-europejskie — 23,9%. 70% firm utrzymywało stosunki finansowe z amerykańskimi uniwersytetami, 40% — z uniwersytetami w Europie i tylko 12% z japońskimi uczelniami.

14.1.4. Wybór organizmów gospodarzy do klonowania genów

Geny można klonować w mikroorganizmach (bakterie i niższe *Eukaryota*) oraz w komórkach eukariotycznych. Najlepiej poznanym gospodarzem zrekombinowanego DNA jest *E. coli* ze względu na dobrą znajomość jej cech genetycznych, biochemicznych, dostępność dużych kolekcji mutantów i krótki czas generacji. Używane w laboratoriach szczepy *E. coli* K12 nie są chorobotwórcze dla ludzi oraz nie zasiedlają ich przewodu pokarmowego.

Klonowanie genów do celów biotechnologicznych jest możliwe również w komórkach *Bacillus subtilis*, a wydawało się szczególnie korzystne ze względu na zdolność biorcy do wydzielania do podłoża białek w natywnej formie. Niestety plazmidowe wektory są w większości niestabilne w komórkach *B. subtilis*, a białka po sekrecji są w dużej mierze trawione przez proteazy, również wydzielane do podłoża.

W ostatnich latach opracowano także systemy klonowania obcych białek w prokariotach z rodzajów *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Zymomonas* i *Streptomyces*.

Saccharomyces cerevisiae, jako gospodarz klonowanych genów, łączy w sobie zalety układów bakteryjnych i eukariotycznych. Jest to dobrze scharakteryzowany metodami fizjologicznymi i genetycznymi mikroorganizm eukariotyczny. Hodowany był w określonych pożywkach i na dużą skalę od stuleci dla potrzeb przetwórstwa żywności. Komórki *S. cerevisiae* mają zdolność wydzielania białek do podłoża, a ich wieloskładnikowy układ sekrecyjny zapewnia m.in. tworzenie mostków dwusiarczkowych, N- i O-glikozylację oraz modyfikacje proteolityczne. Wektorami mogą być plazmidy zdolne do replikacji nie tylko w drożdżach, ale także w *E. coli*. (tzw. wektory wahadłowe). *Saccharomyces cerevisiae* nie wytwarzają toksyn, a ich hodowle nie ulegają zakażeniom wirusowym.

Pierwszym białkiem sklonowanym z powodzeniem w *S. cerevisiae* w celach handlowych był ludzki α -interferon (1981 r.). Także w *S. cerevisiae* uzyskano preparat antygenu powierzchniowego HBsAg użyty do pierwszej licencjonowanej rekombinacyjnej szczepionki przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. Niestety wydajność ekspresji obcych białek (nawet z genów zaopatrzonych w drożdżowe silne indukowane promotory) jest niska (1–5% ogólnej puli białek), a autonomiczne plazmidy są niestabilne w przypadku braku presji selekcyjnej. Wzór glikozylacji białek wytwarzanych przez *S. cerevisiae* może być różny od charakterystycznego dla komórek wyższych *Eukaryota*. Sekrecji podlegają w zasadzie tylko niewielkie białka, niektóre tylko do przestrzeni peryplazmatycznej. Niektóre produkty ekspresji heterologicznych genów są toksyczne dla szczepów *S. cerevisiae*.

Do ekspresji obcych genów stosuje się też inne gatunki drożdży, ze względu na wieloletnią praktykę w ich przemysłowym wykorzystywaniu i stabilny genotyp. Perspektywy modyfikacji genetycznych takich drożdży, jak *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pas-*

toris, *Yarrowia lipolytica* ocenia się pomyślnie. Kilkadziesiąt białek o znaczeniu handlowym wyprodukowano na skalę przemysłową w tych drożdżach (ludzka albumina osocza, EGF, HBsAg, lizozym, streptokinaza, tkankowy aktywator plazminogenu, IL-2, TNF, glukoamylaza, lipaza, oksydaza glukozy, czynnik VIII, hirudyna, dysmutaza nadtlenkowa i in.). W kilku przypadkach stwierdzono, że biosynteza białek przebiegała z wyższą wydajnością w tych drożdżach niż w *S. cerevisiae*. Wektory plazmidowe są w nich stabilne, częściej dochodzi do włączenia się obcego DNA do genomu, sekrecja białek do środowiska zachodzi z wysoką wydajnością.

Duże nadzieje biotechnologiczne budzi oryginalny układ ekspresji, wywodzący się z wektorów, które pochodzą z bakulowirusów, zakażających larwy motyli i muchówek. Biorcami zrekombinowanego DNA są w tym systemie hodowle komórek owadów lub całe larwy. Komórki transfekuje się mieszaną DNA bakulowirusa i wektora niosącego rekombinowany gen. Wektor skonstruowany został z sekwencji bakteryjnych (*ori* i gen oporności na antybiotyki) oraz kasety ekspresyjnej, na którą składają się polilinker i sekwencje regulacyjne genu polihedryny bakulowirusa (promotor, sekwencje terminatorowe). Wewnątrz transfekowanej komórki dochodzi do homologicznej rekombinacji i utworzenia zrekombinowanego wirusa niosącego w miejsce genu polihedryny gen rekombinowany. Wydajność rekombinacji wzrosła 1–99% po zastosowaniu do transfekcji zlinearyzowanego wektora, niosącego gen, który umożliwia selekcję w komórkach owadów. W tak transfekowanych komórkach dochodzi do prawidłowych modyfikacji posttranslacyjnych klonowanych białek (proteoliza prebiałek, fosforylacja, glikozylacja, acylacja). Wydajność produkcji obcych białek jest kilkanaście razy wyższa w całych larwach. Białka te gromadzą się w hemolimfie. Opracowanie różnorodnych sposobów transfekcji różnych komórek wyższych *Eukaryota* umożliwiło ich wykorzystanie do celów biotechnologicznych. W takich komórkach modyfikacje posttranslacyjne uzyskiwanego białka przebiegają prawidłowo, aż do wytworzenia jego natywnej formy. Zazwyczaj jednak wydajność produkcji jest niska, a jej koszt wysoki. Stąd układy te stosuje się na razie do wytwarzania w skali laboratoryjnej lub półtechnicznej niskotonażowych produktów o wysokiej aktywności biologicznej (odczynniki analityczne, diagnostyczne, niektóre leki). W stadium opracowań są układy ekspresji genów zrekombinowanych z wektorami pochodzenia wirusowego (głównie retrowirusami).

W roku 1993 zrekombinowane białka można było wytwarzać w tak różnych organizmach, jak: bakterie, grzyby, owady, rośliny i ssaki. Jednak w przemyśle farmaceutycznym nadal przeważały: *E. coli*, drożdże i komórki CHO (linia komórkowa z jajnika chomika). Wynikało to z uprzedniego zaaprobowania tych komórek jako potencjalnych producentów leków przez odpowiednie komisje, badające zagrożenie wiążące się z wytwarzaniem i stosowaniem substancji pochodzących z rekombinacji DNA *in vitro*.

14.2. Biotechnologia w przemyśle farmaceutycznym i w medycynie

14.2.1. Kierunki rozwoju biotechnologii medycznej

Zastosowanie metod rekombinacji DNA w lecznictwie i w farmaceutyce doprowadziło do szybkiego postępu w zakresie:

(a) profilaktyki, szczególnie w odniesieniu do chorób dotychczas trudno uleczalnych lub w ogóle nieuleczalnych;

(b) lekoterapii zestawami substancji o charakterze biomodulatorów, dobranymi do potrzeb poszczególnych pacjentów;

(c) poszukiwania nowych, skuteczniejszych leków na schorzenia powodujące największą liczbę zgonów (choroby układu krążenia, nowotwory, niektóre choroby o etiologii wirusowej);

(d) terapii chorób i niedomagań podeszłego wieku;

(e) diagnostyki i terapii chorób o podłożu genetycznym.

Wartość światowej sprzedaży leków oceniano w roku 1990 na 170 mld \$, roczną dynamikę wzrostu w ostatnich latach na ok. 10%. W tym samym roku 1990 zaledwie 7 leków sprzedano aż za 1 mld dolarów (wszystkie doustne). W pierwszej pięćdziesiątce najlepiej sprzedających się leków dwa były wytworzone technikami rekombinacji DNA: ludzka insulina (Humulina, 39 miejsce) i erytropoetyna (Epogen, 50 miejsce). Dla porównania przez ostatnie 25 lat przetestowano pod kątem aktywności przeciwnowotworowej 500 tys. związków, 40 z nich wprowadzono do farmakopei, a tylko 10 okazało się częściowo skuteczne.

Utrwalił się już pogląd, że dalszy rozwój biotechnologii medycznej jest ściśle sprzężony z tempem poznawania ludzkiego genomu. Prace nad ustalaniem map fizycznych i sekwencji nukleotydów w ludzkim genomie są coraz częściej prowadzone w firmach biotechnologicznych: do końca roku 1993 w Stanach Zjednoczonych działało już 14 prywatnych kompanii zaangażowanych w takie badania.

14.2.2. Profilaktyka i diagnostyka

14.2.2.1. Szczepionki

Jako szczepionki wykorzystywano tradycyjnie:

(a) preparaty zawierające żywy organizm patogenny osłabiony dzięki wielokrotnym pasażom w hodowlach;

(b) preparaty zawierające martwy organizm patogenny;

(c) preparaty zawierające immunogenne epitopy organizmu patogennego.

Nie zawsze były to preparaty w pełni bezpieczne: w szczepionkach typu (a) mogło dojść do ponownego uaktywnienia się organizmu patogennego, w szczepionkach typu (b) zabicie wszystkich chorobotwórczych osobników mogło się nie udać.

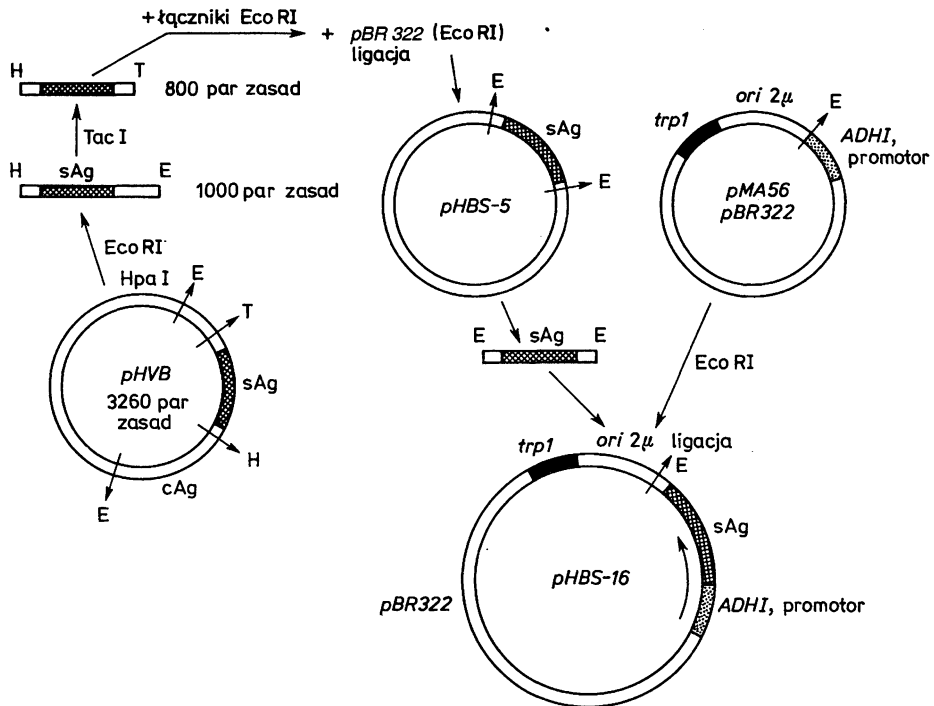
Do wytworzenia szczepionek metodami inżynierii genetycznej używa się: organizmów patogennych nieodwracalnie osłabionych przez delecje określonych genów, wektorów pochodzenia wirusowego zrekombinowanych z genami kodującymi immunogenne białka organizmu patogennego, preparatów immunogennych peptydów i białek uzyskanych metodami inżynierii genetycznej lub syntezy chemicznej.

Głównym problemem w konstruowaniu szczepionek zawierających antygeny powierzchniowe (zazwyczaj glikoproteiny płaszcza wirusów lub ściany komórkowej bakterii), jest właściwa prezentacja antygeny, w formie przypominającej jego natywną konfigurację. Ciekawym osiągnięciem w tej dziedzinie są preparaty szczepionek przeciw HBV, powodującemu ostre i chroniczne zapalenie wątroby typu B (*hepatitis B*). Uważa się, że zapalenie chroniczne może przekształcić się w chorobę nowotworową. Na świecie żyje ok. 200 mln nosicieli HBV.

Wirus HBV ma niewielki genom składający się z 3182 nukleotydów (w części sekwencji — dwuniciowy DNA, w części — DNA jednoniciowy) a jego kapsyd zbudowany jest z glikoproteiny HBsAg. Hepatocyty chorego wydzielają do krwi sferyczne nieinfekcyjne twory, o średnicy 22 nm, zbudowane z HBsAg i lipidów oraz zakaźne, tzw. cząstki Dane'a ($10^{10}/1$ ml krwi) o średnicy 42 nm, zawierające DNA wirusa. Do początku lat 80. jedyną szczepionką przeciw HBV był preparat inaktywowanych formaliną cząstek 22 nm. Ilość takiej szczepionki ograniczona jest dostępnością zainfekowanej surowicy (źródła cząstek) i koniecznością zastosowania bardzo rygorystycznych procedur wykluczających obecność w szczepionce innych elementów infekcyjnych. Problemy te można ominąć konstruując szczepionkę przeciw HBV metodami inżynierii genetycznej.

Sekwencję kodującą HBsAg, zawartą we fragmencie genomu HBV (835 par zasad), zaopatrzone w promotor genu dehydrogenazy alkoholowej *ADHI* i sklonowano w wahadlowym wektorze *E. coli/S. cerevisiae* (rys. 14.1). Nie tylko uzyskano dobry poziom ekspresji genu, ale produkt tej ekspresji miał cechy immunologiczne, fizykochemiczne i strukturalne (obraz w mikroskopie elektronowym) przypominające cząstki 22 nm. Okazało się, że drożdże tworzą duże cząstki — agregaty z syntyzyzowanego HBsAg, polisacharydów i lipidów. Właściwości immunogenne takich preparatów ulepszono przez wprowadzenie przed genem kodującym HBsAg tzw. sekwencji pre-S (koduje 55 aminokwasów współdziałających w rozpoznawaniu hepatocytów przez wirusy). Wydajność syntezy tych białek w drożdżach podniesiono 100-krotnie po dołączeniu rekombinowanych genów do sekwencji regulatorowych drożdżowego genu dehydrogenazy aldehydu 3-P-glicerynowego.

W latach 1984–1992 przeprowadzono 122 próby kliniczne obejmujące 14 800 pacjentów zaszczepionych szczepionką, która została wyprodukowana z białka HBsAg, wytworzonego przez zrekombinowane drożdże. Pacjenci ze wszystkich grup wiekowych tolerowali ją bardzo dobrze, wytwarzając przeciwciała identyczne jak po szczepieniu cząstkami 22 nm. Szczepionka ta, podana



Rys. 14.1. Konstrukcje plazmidów umożliwiające ekspresję powierzchniowego antygeny HBV w drożdżach *S. cerevisiae*; *pMA56* oprócz sekwencji *pBR322* (*ori*) ma drożdżowy marker selekcyjny (*trp1*), *ori* z 2μ DNA i promotor drożdżowego genu dehydrogenazy alkoholowej, *ADHI*. Plazmid *pMA56* zligowano z fragmentem EcoRI/EcoRI zawierającym 800 par zasad sekwencji kodującej HBsAg pochodzącej z plazmidu *pHVB* i namnożonej w plazmidzie *pHS-5*. Uzyskanym plazmidem *pHS-16* transformowano *S. cerevisiae*. Wydajność wytwarzania HBsAg-25 μ g/l. Symbole sekwencji restrykcyjnych: E (Eco RI); H (Hpa I); T (Tac I)

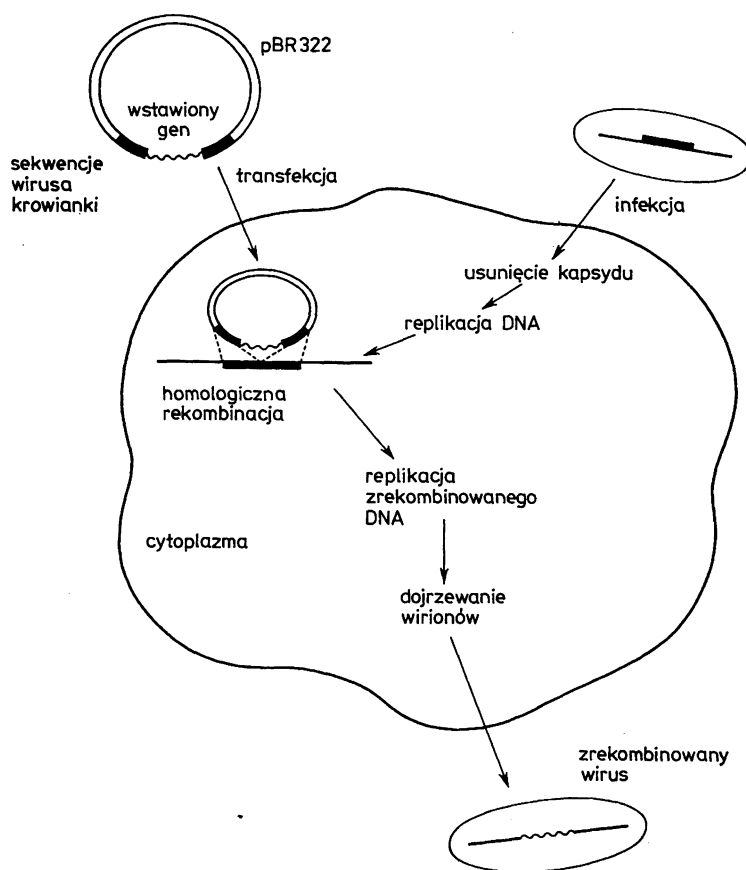
profilaktycznie przedstawicielom trzech grup podwyższonego ryzyka, wykazała również pełną skuteczność ochronną.

Inną strategię postępowania zastosowano w kolejnych próbach konstrukcji innego typu szczepionki przeciw tej samej chorobie. Tym razem gen kodujący HBsAg wprowadzono do genomu wirusa krowianki.

E. Jenner użył 200 lat temu wirusa krowianki jako szczepionki przeciw czarnej ospie. Szczepień takich zaniechano na wniosek Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w roku 1980 i od tej pory uważa się, iż wirus krowianki jest wirusem laboratoryjnym, niespotykanym w przyrodzie. Ma wielu gospodarzy, łatwo hoduje się go *in vitro*, jego DNA replikuje w cytoplazmie zainfekowanej komórki. Produkty transkrypcji obcych genów dołączonych do genomu wirusa krowianki są identyczne z natywnymi; powstające produkty — białka rekombinacyjne mają natywną strukturę i funkcję.

Cechy te pozwalają na użycie wirusa krowianki do wytwarzania żywych, poliwalencyjnych szczepionek dla ludzi i zwierząt. Zasadę metody wprowadza-

nia obcych genów do genomu wirusa krowianki przedstawia rysunek 14.2. Sklonowany w plazmidzie bakteryjnym gen otoczony sekwencjami wirusa krowianki i wprowadzony do komórek zainfekowanych wirusem krowianki ulega homologicznej rekombinacji z DNA wirusa. Rekombinacją steruje się w taki sposób, aby zachodziła w regionach sekwencji nieistotnych dla cyklu życia wirusa. Długość takich sekwencji sprawia, iż wirus krowianki może być jednocześnie zrekombinowany z wieloma heterologicznymi genami. Może też stać się poliwalencyjną szczepionką przeciw kilku patogenom jednocześnie (znany jest np. zestaw genów kodujących trzy antygeny: hemaglutyninę wirusa grypy, HBsAg i glikoproteinę D wirusa opryszczki HSV). Szczepionka przeciw *hepatitis B* była skuteczna w ochronie szympansov przed wirusowym zapaleniem wątroby, powodując powstawanie specyficznych przeciwciał.



Rys. 14.2. Sposób wprowadzania obcych genów do wirusa krowianki. Wybrany gen otoczony sekwencjami wirusa krowianki klonuje się np. w plazmidzie *pBR322*. Takim zrekombinowanym plazmidem transfekuje się komórki równolegle zakażone wirusem krowianki. Replikacja DNA wirusa przebiega w cytoplazmie, kontakt DNA wirusa i plazmidu może zaowocować homologiczną rekombinacją *in vitro*. Zapakowanie zrekombinowanego DNA w trakcie biogenezy wirionów daje pokolenie zrekombinowanych wirusów krowianki

Warto również odnotować próby uzyskania szczepionki przeciw *hepatitis B* z polipeptydowych fragmentów antygeny HBsAg, np. peptydy 117–137 i 139–147 dołączone do odpowiednich nośników wykazywały aktywność antygenową.

W przypadku chorób o etiologii bakteryjnej najczęściej jako potencjalne szczepionki badane są syntetyczne polipeptydy, stanowiące fragmenty odpowiednich toksyn białkowych: dyfterytu (14 aminokwasów), tężca i cholery (12 i 14 aminokwasów).

Szczepionki otrzymane technikami rekombinacji DNA są stabilne; ich stosowaniu nie towarzyszą niepożądane objawy, a proces wytwarzania jest bezpieczny. Metody wytwarzania sprawiają, iż preparaty można stosunkowo szybko modyfikować i dostosowywać do ewentualnych zmian cech patogenego organizmu.

Wiele produktów stosowanych do wytwarzania podobnych szczepionek może być też użytych do diagnostyki odpowiednich zakażeń.

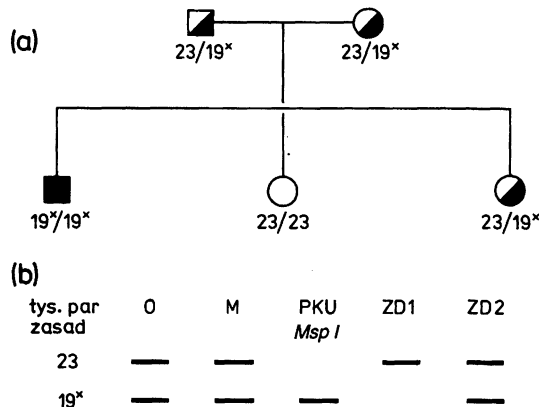
14.2.2.2. Testy diagnostyczne

W ostatnich latach opracowano wiele molekularnych testów diagnostycznych, pozwalających na rozpoznanie choroby przed wystąpieniem objawów. W diagnostyce chorób genetycznych wykorzystano metody hybrydyzacji specyficznych sond molekularnych do odpowiednich regionów genomu, analizę polimorfizmu restrykcyjnego oraz technikę reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). W roku 1990 analizą schorzeń o podłożu genetycznym zajmowało się już ok. 500 laboratoriów klinicznych w Stanach Zjednoczonych (wartość tych usług wyniosła ok. 300 mln \$), a ich klientami były w większości wypadków ciężarne kobiety. W celu zilustrowania zagadnienia omówiona zostanie metoda diagnostyki choroby genetycznej — fenyloketonurii, występującej z częstotliwością zależną od położenia geograficznego, ok. 1 na 5 tys. żywo urodzonych (w Polsce rodzi się rocznie ok. 100 dzieci chorych na fenyloketonurię).

Klasyczną fenyloketonurię, chorobę autosomalną, recesywną, opisano w roku 1934, jej konsekwencjami biochemicznymi są zaburzenia w przemianie aminokwasów aromatycznych. U chorych w surowicy i w moczu gromadzą się metabolity fenyloalaniny, co związane jest z niedoborem hydroksylazy fenyloalaninowej (PAH). Gen kodujący PAH leży na długim ramieniu chromosomu 12, ulega ekspresji w wątrobie i dlatego nie można do wykrycia fenyloketonurii zastosować klasycznych metod diagnostyki prenatalnej (poszukiwanie odpowiednich białek w hodowlach komórek płodu, komórek trofoblastu i komórek z płynu owodniowego). Istnieje prosty i tani test Guthriego stosowany z powodzeniem w pierwszych dniach po urodzeniu, a terapię zachowawczą (dieta uboga w aromatyczne aminokwasy) należy stosować w tym samym okresie, aby uniknąć niedorozwoju umysłowego wywołanego toksycznymi związkami nieodwracalnie uszkadzającymi tkankę mózgową.

Ludzki gen *PAH* zidentyfikowano w banku ludzkiego cDNA i sklonowano w roku 1983, stosując jako sondę molekularną cDNA homologicznego genu szczura. Gen występuje w jednej kopii, koduje PAH, białko składające się z 451 aminokwasów. Fragment genomu człowieka odpowiedzialny za syntezę PAH składa się z 13 egzonów o długościach mieszczących się w przedziale 57–892 par zasad i 12 intronów (1–24 tysięcy par zasad). Pełny gen składa się z egzonów o łącznej długości 2,3 tysięcy par zasad i intronów o łącznej długości 85 tysięcy par zasad.

W badaniach DNA członków rodzin obciążonych fenyloketonurią znaleziono polimorfizm restrykcyjny obszaru genu *PAH* dla ośmiu enzymów: *MspI*, *SphI*, *HindIII*, *EcoRV*, *XmnI*, *BhlII*, *PvuII*. Użycie tych enzymów do analizy DNA dziecka w takiej rodzinie pozwala na postawienie diagnozy co do wystąpienia fenyloketonurii z 98,5-procentową pewnością (rys. 14.3). Klasyczna fenyloketonuria, jak wynika z analizy sekwencji genu *PAH* ludzi zdrowych, chorych i nosicieli, związana jest z zamianą argininy na tryptofan, wywołana substytucją cytozyny na tyminę w egzonie 12.



Rys. 14.3. Polimorfizm restrykcyjny (enzym: *MspI*) genu hydroksylazy fenyloalaninowej (molekularna diagnostyka fenyloketonurii). DNA ojca (O), matki (M), trojga dzieci, z których jedno jest chore (PKU), jedno nosicielem (ZD2), a jedno zdrowe (ZD1) strawiono enzymem *MspI* i poddano analizie Southerna z sondą molekularną prawidłowego cDNA genu *PAH* człowieka. (a) Rodzowód rodziny. (b) Układ prążków elektroforetycznych hybrydujących z sondą. Allel prawidłowy — 23 tys par zasad, allel zmutowany — 19 tys. par zasad

Wiele chorób genetycznych można już diagnozować metodami molekularnymi, niektóre stosowane są rutynowo w specjalistycznych poradniach genetycznych (anemia sierpowata, niektóre typy talasemii). Diagnostyka molekularna stosowana jest także m.in. w stosunku do:

1) Dystrofii mięśniowej Duchenne'a (1 na 3,5 tys. żywo urodzonych). Ludzki gen kodujący glikoproteinę, dystrofinę, którego mutacje odpowiedzialne są za dystrofię mięśniową, zlokalizowano w chromosomie X. Jest to najdłuższy ze znanych w roku 1994 obszarów genów (2,5 mln par zasad).

W teście diagnostycznym wykorzystuje się monoklonalne przeciwciała. Rozważana jest możliwość terapii tych chorych przez wszczepianie im mioblastów, które pochodzą od dawców wykazujących zgodność tkankową z chorym. Obiecujące są również wyniki leczenia myszy transgenicznych *mdx* (mutacja w genie dystrofiny na chromosomie X) metodą wstrzykiwania do włókien mięśni szkieletowych wektorów plazmidowych lub adenowirusów niosących gen kodujący dystrofinę.

2) Mukowiscydozy (najczęściej występująca w białej rasie choroba genetyczna, 1 na 2,5 tys. żywo urodzonych, w Polsce rodzi się co roku ok. 250 dzieci z mukowiscydozą). Ludzki gen kodujący białko CFTR, którego uszkodzenie towarzyszy chorobie, sklonowano w roku 1989 i zlokalizowano w chromosomie 7. Obszar genu ma długość 250 tysięcy par zasad; część kodująca zawarta jest w 27 egzonach. Struktura białka sugeruje, iż kodujący je gen powstał w wyniku podwojenia sekwencji nukleotydowych. Białko CFTR aktywizuje w sposób zależny od cAMP kanał chlorkowy błony cytoplazmatycznej komórek nabłonka. U 75% chorych obserwuje się delecję (oznaczoną jako ΔF_{508}) kodonu fenyloalanionowego w egzonie 10 kodującym domenę CFTR odpowiedzialną za wiązania ATP. W sumie w genie CFTR wykryto ponad 300 mutacji, co na razie uniemożliwia w pełni wiarygodną molekularną diagnozę; jej niezawodność ocenia się na 80%. W roku 1993 rozpoczęto jednocześnie w Stanach Zjednoczonych i w Wielkiej Brytanii leczenie pojedynczych chorych inhalacjami z liposomów lub wektorów, które pochodzą od adenowirusów, niosących prawidłowy gen CFTR.

Sondami molekularnymi można obecnie diagnozować choroby zakaźne wywołane przez mykoplazmę, HIV, wirusy opryszczki, wirusy brodawczaków, wirusa zapalenia wątroby, bakterie wytwarzające białkowe toksyny i in. W wielu testach diagnostycznych wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne: do identyfikacji raka płuc, raka sutka, raka jelita grubego, gruczolaka prostaty i gluczolaka jajników. Wiele firm biotechnologicznych proponuje zestawy diagnostyczne do oceny stężenia cytokin w organizmie pacjenta.

14.2.3. Somatyczna terapia genowa

Diagnostyka chorób dziedzicznych stanowi pierwszy krok na drodze do leczenia przyczynowego tych chorób. Teoretycznie rozważać można dwa typy postępowania terapeutycznych.

Pierwszy, to wprowadzenie genów do komórek rozrodczych lub zygoty przed pierwszym podziałem (p. podrozdz. 14.3.2). Technika transgenizacji człowieka nie była dotychczas rozważana, zarówno ze względu na zawodność, jak i ze względów etycznych. Jednakże w roku 1991 w Stanach Zjednoczonych komisja oceniająca projekty genetyczne z punktu widzenia ich zasadności i celowości postanowiła zająć się problemem zabiegów na rozrodczych komórkach człowieka. Późniejsze prasowe doniesienia (jesień 1993 r.), w których

przeprowadzono manipulacje *in vitro* na kilku komórkowych zarodkach ludzkich, nazwane przez dziennikarzy klonowaniem człowieka, unaocznily konieczność prowadzenia takich dyskusji i kontroli nad projektami podobnych doświadczeń.

Drugi typ terapii obejmuje genetyczne modyfikacje komórek somatycznych. Ze względów technicznych na razie w grę wchodzi jedynie terapia chorób jednogenowych, w których poziom ekspresji genu nie jest czynnikiem decydującym o prawidłowym fenotypie. Na próby terapii somatycznej człowieka wydaje się zezwolenia jedynie w przypadkach schorzeń prowadzących do nieuniknionego zgonu, których nie potrafi się skutecznie leczyć żadnymi innymi metodami.

Próby terapii komórek somatycznych należy poprzedzić: wydzieleniem prawidłowego genu, identyfikacją jego sekwencji regulacyjnych i identyfikacją komórek, w których działa oraz wyborem wydajnych i jednoznacznych metod ich transfekcji. Cykl badań na komórkach zwierzęcych i zwierzętach transgenicznych powinien dostarczyć dowodów na to, że wprowadzony prawidłowy gen działa zgodnie z przewidywaniami i nie narusza metabolizmu komórki biorcy genu oraz całego organizmu. Przyjęto powszechnie dwa warianty dalszego postępowania: włączenia dodatkowych kilku kopii prawidłowego genu do komórek biorców lub wymianę genu defektywnego na prawidłowy.

Prawidłowy gen można wprowadzić do organizmu metodą *ex vivo** lub *in vivo*. Pierwsza polega na wyodrębnieniu docelowych komórek z organizmu chorego, modyfikacji genetycznej *in vitro* i powtórny wprowadzeniu do organizmu tego samego chorego. Druga zakłada wprowadzenie genu (ew. z wektorem) wprost do całego organizmu lub jego tkanki (p. próby terapii mukowiscydozy).

Zasadniczą trudnością (dotychczas nie w pełni rozwiązana) jest znalezienie niezawodnego, powtarzalnego, wydajnego sposobu transfekcji komórek eukariotycznych. Największe nadzieje terapeutyczne wiąże się z zastosowaniem wektorów, które wywodzą się z retrowirusów i adenowirusów. Prowadzi się również próby z pochodnymi wirusów opryszczki, krowianki, polio, Sindbis i innych wirusów RNA. Trwają próby wprowadzania DNA w liposomach i DNA połączonego z substancją rozpoznawaną przez receptory na błonie cytoplazmatycznej, przez wstrzyknięcie wprost do docelowej tkanki.

Kolejną istotną trudnością napotykaną po transfekcji jest charakter ekspresji wprowadzonych genów (przejściowy lub trwały, częściej ten pierwszy). Dalszych badań wymagają próby wprowadzania genów wprost do chorych komórek i tkanek: wątroby, płuc, komórek pnia lub do komórek omywanych przez krążącą krew, która mogłaby transportować produkty ekspresji takich genów do całego organizmu.

Próby somatycznej terapii genowej ulegają szybkiej komercjalizacji: w połowie roku 1993 podjęło je 14 firm w Stanach Zjednoczonych i kilka w Europie

* Zabieg *ex vivo* polega na modyfikacji genetycznej komórek pobranych od pacjenta i wprowadzeniu ich z powrotem do jego organizmu.

Zachodniej. Zaproponowano do akceptacji protokoły terapii takich chorób genetycznych, jak: mukowiscydoza, insulinozależna cukrzyca, karłowatość, rozedma płuc, dziedziczna hipercholesterolemia, liczne hemoglobinopatie, hemofilie, zespół Gauchera, fenyloketonuria, zespół niedoboru odporności, dystrofia mięśniowa Duchenne'a, zespół Lescha – Nyhana, choroba Taya – Sachsa; także chorób nabytych: różnych rodzajów raka, chorób układu krążenia, chorób neurodegeneracyjnych, artretyzmu i AIDS.

W roku 1990 w Doradczym Komitecie Do Spraw Rekombinacyjnego DNA Narodowych Instytutów Zdrowia Stanów Zjednoczonych (NIHRAC) zatwierdzono, jako pierwszą terapię genową, próbę wyznakowania genetycznego limfocytów wydzielonych z litego guza chorego, tzw. TIL (ang. tumor infiltrating lymphocytes). Wprowadzony do limfocytów marker, gen nadający im oporność na neomycynę, pozwolił na śledzenie ich losów po powtórnym wstrzyknięciu do chorego dawcy. W następnym etapie rozwoju tej samej terapii TIL wyizolowane od 30 pacjentów chorych na czerniaka transfekowano *in vitro* genami kodującymi czynnik martwicy nowotworów (TNF) i interleukinę 2 (IL-2). Była to terapia *ex vivo*; uzyskano statystycznie istotne zmniejszenie guzów.

Historycznie drugą terapią genową była próba leczenia najpierw jednej dziewczynki, a potem sześciorga dzieci chorych na ciężki złożony zespół niedoboru odporności, związany z brakiem deaminazy adenozy — ADA. Do krwiobiegu tych pacjentów w październiku roku 1991 wprowadzono limfocyty transfekowane wektorem retrowirusowym z genem *ADA*. Uzyskano oporność na antygeny, normalizację krążących w krwi limfocytów i pojawienie się przeciwciał. Ponieważ limfocyty żyją w krwiobiegu kilka miesięcy, podobny zabieg powtarzano wielokrotnie. Prasa naukowa informowała w końcu roku 1993, że wszystkie dzieci żyją; pierwsza pacjentka poszła do normalnej szkoły.

Szczególna uwaga przypisana zastosowaniom terapii genowej w leczeniu chorób nowotworowych jest w pełni zrozumiała. Wydaje się, że największe nadzieje budzą metody:

(a) pobudzenia odpowiedzi immunologicznej chorego, przez transfekcję TIL genami cytokin;

(b) transfekcji komórek nowotworu *in vitro* genami wybranych cytokin, uniemożliwienie ich dalszej proliferacji przez promieniowanie i wszczepienie podskórne pierwotnemu dawcy, co można porównać do szczepienia przeciwnowotworowego. Zabieg ten u zwierząt daje obiecujące wyniki. Proponuje się wykonanie podobnych prób z pacjentami mającymi raka sutka, płuc, trzustki, gruczołu krokowego, nerki i czerniaka. We wszystkich próbach geny będą wprowadzane za pośrednictwem wektorów pochodnych retrowirusów.

W latach 1989 – 1993 Komitet NIH zatwierdził 52 protokoły terapeutyczne; do prób dopuszczono 100 osób. Z tego 23 próby polegały na wprowadzeniu markera genowego, 29 — na właściwej terapii. W roku 1993 zaaprobowano 9 nowych protokółów, dotyczących prób terapii raka jelita grubego, czerniaka,

mukowiscydozy, choroby Gauchera i AIDS. Żadna z prób przeprowadzonych do końca roku 1993 nie dała w pełni udanych wyników.

Z terapiami genowymi wiąże się również problem patentów. Przyjęty dotychczas tryb postępowania w Stanach Zjednoczonych dopuszcza patentowanie ludzkich sekwencji genowych wykorzystywanych do testów diagnostycznych lub prób terapii. Co prawda w roku 1991 z NIH zgłoszono patent na bank kilkuset sekwencji ludzkiego cDNA, których funkcja nie jest znana, ale Urząd Patentowy Stanów Zjednoczonych nie przyjął tego zgłoszenia. Wydane do końca roku 1991 w Stanach Zjednoczonych patenty dotyczyły m.in. mukowiscydozy (test na prawidłowe i zmutowane sekwencje genu, test na sekwencje regulacyjne genu, linia komórek transfekowana genem), dystrofii mięśniowej Duchenne'a (test polimorfizmu restrykcyjnego, sonda molekularna), płasawicy Huntingtona (test polimorfizmu restrykcyjnego, sztuczny chromosom drożdżowy ze zmutowanym genem), a także różnych form postępowania w leczeniu takich chorób, jak: nowotwory, arterioskleroza, genetycznie uwarunkowana hipercholesterolemia i zespół Alzheimera.

14.2.4. Nowe leki

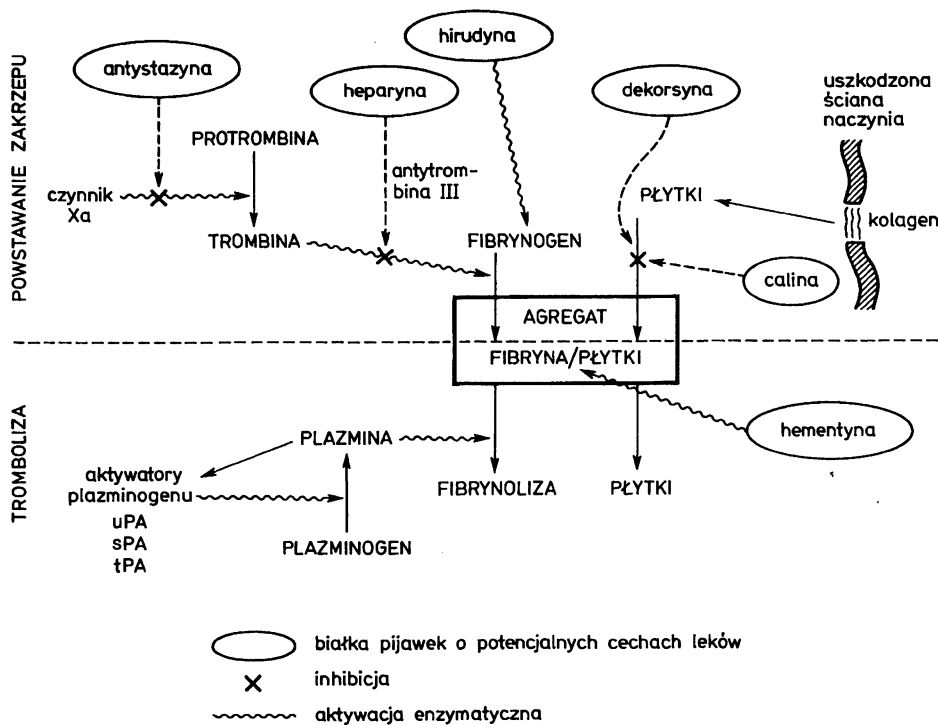
Po wyodrębnieniu kilkunastu genów ludzkich i zwierzęcych, kodujących cytokiny (modelowe prace przeprowadzono na rodzinie genów kodujących interferony) przystąpiono do opracowania technologii wyodrębniania ze zrekombinowanych komórek białek — modulatorów systemu immunologicznego, o potencjalnej aktywności terapeutycznej. Substancje te są już dostępne w ilościach gramowych i kilogramowych (np. IFN α -2a). Z badań aktywności tych białek *in vitro* i *in vivo* wynika, że skutki ich działań są wzajemnie uwarunkowane i mają charakter plejotropowy. Z tego względu uważa się obecnie, iż ich terapeutyczne właściwości będą mogły być w pełni wykorzystane dopiero po pogłębieniu wiedzy o molekularnych i fizjologicznych mechanizmach regulacji aktywności odpowiednich genów i białek w różnych etapach życia organizmu, tkanki i komórki.

W szeroko zakrojonych systematycznych badaniach działania interleukiny 2 (IL2) na nowotwory zwierząt wykazano, iż prawdopodobną przyczyną nieskuteczności przeciwnowotworowej IL2 w próbach klinicznych były bardzo duże dawki (na granicy tolerancji) podawane systemowo. Z kolei wprowadzanie IL2 lokalnie wprost do guzów eksperymentalnie wywołanych u myszy, świnki morskiej i bydła było bardzo efektywne, szczególnie jeżeli u zwierzęcia rozpoczęły się już naturalne procesy obrony immunologicznej przeciw wywołanemu doświadczalnie nowotworowi.

Z tych i podobnych badań płynie wniosek, iż należy dążyć do uzyskania preparatów zawierających cytokininy zmieszane w odpowiednich proporcjach, podawanych chorym jako uzupełnienie i wspomóżenie działania innych leków. Największe zastosowanie cytokin przewiduje się w kombinowanej chemioterapii chorób nowotworowych i wirusowych.

Duży wysiłek włożono w otrzymywanie nowych leków przeciwko chorobom układu krążenia, będących przyczyną najwyższej liczby zgonów, a w szczególności leków rozpuszczających zakrzepy krwi.

Po uszkodzeniu naczynia krwionośnego rozpoczyna się niezwykle złożony cykl procesów, które prowadzą do utworzenia skrzepu kończącego krwotok, a następnie likwidujących zakrzep i udrażniającego naczynie. Prawidłowy ich przebieg decyduje nierzadko o życiu pacjenta. Ze ścianek uszkodzonego naczynia uwalnia się m.in. tzw. tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), serynowa proteaza specyficznie przekształcająca lokalnie plazminogen w plazminę na etapie trombolitycznym (rys. 14.4).



Rys. 14.4. Etapy tworzenia się skrzepu krwi i trombolizy, na które wpływają aktywatory plazminogenu i niektóre białka śliny pijawek

Inne aktywatory plazminogenu u zwierząt poza tPA to: prourokinaza (scuPA), prekursor urokinazy preparowany z moczu i urokinaza, wytwarzana ze scuPA pod działaniem proteazy (plazminy). Urokinaza jest trypsynopodobną serynową proteazą, która przekształca proteolitycznie plazminogen w plazminę.

Jako leki w zatorach naczyń krwionośnych i w zawałe mięśnia sercowego od 30 lat stosuje się urokinazę i streptokinazę. Streptokinaza jest białkiem wytwarzanym przez *Streptococcus* i (podobnie jak urokinaza) przekształca

plazminogen w plazminę w całym krwiobiegu, nie tylko lokalnie w uszkodzonych naczyniach; stąd podawanie tych aktywatorów plazminogenu zwiększa u pacjenta ryzyko uogólnionych krwotoków.

Metody inżynierii genetycznej okazały się użyteczne do uzyskania w dużych ilościach różnych aktywatorów plazminogenu. W firmie Genentech znaleziono linię komórek ludzkich wydajnie syntetyzujących t-PA. Wydzielono z nich i frakcjonowano poliA-mRNA, a poszczególne frakcje użyto w teście translacji *in vitro*. Produkty takiej translacji powtórnie analizowano metodą immunologiczną. Frakcję mRNA kodującą białko strącone przeciwciałami przeciwko t-PA użyto jako matrycy w syntezie cDNA. Pierwsze klonowanie tego cDNA w *E. coli* doprowadziło do znalezienia klonu z częściową sekwencją kodującą t-PA, którego użyto jako sondy molekularnej do dalszego przeszukiwania banku cDNA.

Końcowa konstrukcja przeznaczona do ekspresji genu t-PA składa się z promotora, operatora i sekwencji Shine–Dalgarno operonu tryptofanu *E. coli* dołączonych do sekwencji nukleotydowej kodującej ludzki t-PA. Transformowane tym konstruktem bakterie wytwarzają 50–80 µg t-PA w jednym litrze hodowli. Ekspresję tego genu badano również w liniach komórek myszy i chomika. W połowie lat 80. „rekombinacyjny” t-PA był poddany badaniom klinicznym i jest obecnie stosowany w terapii wielu chorób układu krążenia.

Właściwości terapeutyczne aktywatorów plazminogenu można teraz, kiedy sklonowano ich geny, poprawiać syntetyzując muteiny. Warto przedłużyć czas półtrwania tych białek w krwiobiegu (dla t-PA wynosi on zaledwie 1–4 min), zwiększyć powinowactwo do fibrynogenu, specyficzność i selektywność działania. Czas półtrwania aktywatorów plazminogenu w krwiobiegu ulega wydłużeniu dla mutein z określonymi delecjami i podstawieniami; jest on także dłuższy dla białka nieglikozylowanego. Skuteczność działania t-PA wzrasta także po sprzęgnięciu z przeciwciałami monoklonalnymi i gdy się go wprowadzi jako fuzyjne białko kodowane przez fuzyjny gen fragmentu przeciwciała i fragmentu t-PA.

Po związaniu t-PA z fibrynogenem wzrasta 1000 razy aktywność t-PA, ale przecięcie przez plazminę jednego wiązania peptydowego w t-PA (Arg 275—Ile 276) znacznie obniża to powinowactwo. Skonstruowano zatem muteiny, w których Arg 275 została zastąpiona po kolei wszystkimi aminokwasami: najkorzystniejsze dla trwałości t-PA okazało się podstawienie glutaminą i izoleucyną. Metodami rekombinacji DNA *in vitro* syntetyzowano ponad 100 mutein t-PA.

Jako leki alternatywne w chorobach układu krążenia proponuje się także pochodne wielu białek śliny pijawek (antystazyna, hirudyna, heparyna, deko-rsyna, hementyna) (rys. 14.4). Gen hirudyny sklonowano w *S. cerevisiae* i w *B. subtilis*. Hirudyna jest małą (7 kDa) proteazą specyficznie hydrolizującą fibrynogen. U ludzi i u małąp nie wywołuje reakcji immunologicznej, ani innych skutków ubocznych, likwiduje w całości skrzepy krwi w naczyniach. Syntetyzuje się także krótkie (20 aminokwasów) peptydy — hirugeny — o podobnej do hirudyny aktywności.

Do ciekawych prób syntez leków i lekopodobnych substancji należy przypadek albuminy osocza i hemoglobiny. Alternatywne do źródła naturalnego metody uzyskiwania substancji krwiopochodnych są cenione ze względu na bezpieczeństwo pacjentów (p. HIV przenoszony drogą transfuzji krwi). Ludzka albumina osocza krwi — HSA — jest białkiem utrzymującym w surowicy właściwe ciśnienie osmotyczne, uczestniczy w transporcie cząsteczek hydrofobowych, w tym wielu leków. W leczeniu stosowana jest po szokach i oparzeniach, w uzupełnianiu krwi po zabiegach chirurgicznych oraz w opanowywaniu krwotoków. Roczne światowe zapotrzebowanie na HSA wynosi ok. 300 t. Albuminę uzyskuje się tradycyjnie od dawców krwi i z łożysk płodowych, a koszt produkcji jest niski (2 \$/g), stąd trudno o propozycję ekonomicznie konkurencyjnej technologii wytwarzania HSA. Może być produkowana w przemysłowych szczepach drożdży *Kluyveromyces lactis*. Albumina jest w nich wydajnie wytwarzana i wydzielana do podłoża w prawidłowej formie konformacyjnej. Warto wspomnieć, że uprzednie próby klonowania genu w *E. coli*, *B. subtilis* i *S. cerevisiae* zakończyły się niepowodzeniem ze względu na niski poziom ekspresji i brak sekrecji do podłoża.

Podanie hemoglobiny może zastąpić w wielu przypadkach transfuzję krwi (wypadki, zabiegi chirurgiczne, przechowywanie narządów, terapie przeciwnowotworowe). Zapotrzebowanie światowe ocenia się w tonach, a alternatywne technologie muszą być tanie (ok. 1 \$ za 1 g). Próby wytwarzania w *E. coli* globin wchodzących w skład hemoglobiny nie dały technologicznie obiecujących wyników. Białka identycznie z ludzkimi wytwarzano z niezłą wydajnością w *S. cerevisiae*, ale najbardziej obiecujące wydaje się zastosowanie transgenicznych świń do syntezy.

W doświadczeniu opisanym w roku 1994 wytworzono 1714 zarodków świń, do których wprowadzono ludzkie geny α -globin i β -globin zrekombinowane z sekwencjami regulacyjnymi pochodzącymi z genów kodujących globiny krwi świni. Z 50 zastępczych matek urodziło się w 23 miotach 145 zwierząt, z których 8 było transgenicznych. Wszystkie wykazywały normalny hematokryt, stężenie hemoglobiny i liczbę erytrocytów. Wśród kombinacji α -globin i β -globin nie znaleziono jedynie takiej, która składałaby się z ludzkiej i świńskiej α -globiny. Ekspresja ludzkich globin wahała się od 1 do 24%. W potomstwie świni wytwarzającej najwięcej hemoglobiny 5 z 12 osobników zachowało cechy transgeniczności oraz matczyny poziom ekspresji transgenów. Stosunek globin α/β u tych świń wynosił 2,1. Wyhodowanie jednej transgenicznej świni kosztowało w roku 1994 50 tysięcy \$, w ciągu życia mogłaby ona wytworzyć 1 kg ludzkiej hemoglobiny.

14.3. Organizmy transgeniczne

Nazwę tę przypisano tym organizmom wyższym, do genomu których wprowadzono nowy, heterologiczny gen, przekazywany następnym pokoleniom, zgodnie z prawami genetyki. Techniki uzyskiwania organizmów transgenicznych są różne dla zwierząt i roślin.

14.3.1. Transgeniczne rośliny

14.3.1.1. Plazmidy *Agrobacterium* jako wektory DNA dla roślin dwuliściennych

Poznanie zjawiska transformacji roślin dwuliściennych przez bakterie glebowe z rodziny *Rhizobiaceae* stało się czynnikiem stymulującym rozwój biotechnologii rolnej. Już w latach 20. wykazano, iż bakterie te powodują powstawanie w roślinach dwuliściennych tumorowatych narośli szyjki korzeniowej (*Agrobacterium tumefaciens*) lub tumorowatych korzeni włośnikowych (*Agrobacterium rhizogenes*). Zjawiska te warunkowane są przez duże plazmidy *Ti* (tumor inducing) lub *Ri* (roots inducing) (150–800 tysięcy par zasad).

Plazmidy *Ti* kodują geny odpowiedzialne za syntezę pochodnych aminokwasów o łącznej nazwie opin (oktopiny, nopaliny i agropiny). Bakterie wykorzystują te związki jako źródło węgla. Poza genami kodującymi syntazy opin plazmidy *Ti* niosą geny kierujące katabolizmem opin, geny warunkujące koniugacyjny transfer plazmidu, jego replikację i cechę niezgodności, określające zasięg infekowanych gatunków oraz geny związane z katabolizmem argininy i ornityny. W plazmidach oktopinowym i nopalinowym występują cztery regiony homologii — A, B, C i D (stanowiące ok. 30% plazmidu) o różnym stopniu zgodności sekwencji (30–95%). Region A obejmuje odcinek tzw. T-DNA, długości ok. 23 tysięcy par zasad. Po zakażeniu fragment T ulega integracji z genomem rośliny, przy czym wydaje się, że miejsca integracji mają charakter losowy, a liczba włączanych kopii T-DNA może być różna.

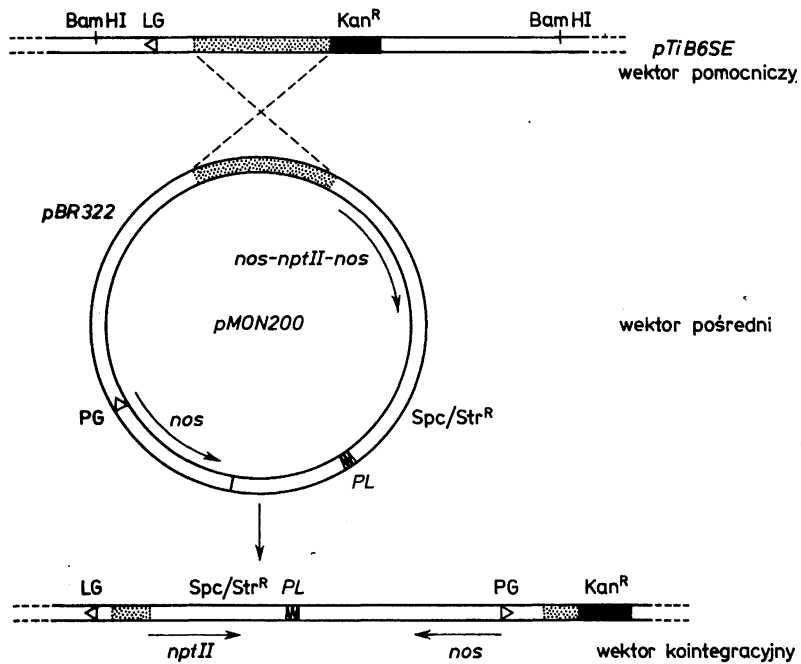
Fragment T koduje dwie klasy genów warunkujących transformowany fenotyp: zaangażowanych w syntezę opin i odpowiedzialnych za biosyntezę regulatorów wzrostu roślin. W syntezie opin biorą udział produkty ekspresji genów syntazy nopaliny lub oktopiny, zależnie od typu plazmidu, natomiast w syntezie regulatorów (cytokininy i auksyny) — geny kodujące transferazę izopentenylu, monoooksygenazę tryptofanową i hydrolazę indoloacetamidu. Na obu końcach fragmentu T leżą krótkie (24–25 par zasad) niemal identyczne powtarzalne sekwencje i ich obecność jest konieczna do integracji T-DNA z genomem komórki roślinnej. W procesie przenoszenia T-DNA uczestniczą także geny plazmidowego regionu homologii D (locus *vir*) i pewne geny chromosomalne bakterii. Proces przeniesienia T-DNA do komórki roślinnej wykazuje podobieństwa do koniugacji. Transfer rozpoczyna się zawsze od prawej granicznej sekwencji i dotyczy jednej nici DNA. Podobieństwo do koniugacji bakteryjnej można widzieć w tworzeniu się na powierzchni bakterii białkowych pili kodowanych przez geny regionu *vir*. Właściwości plazmidu *Ti* pozwoliły na wykorzystanie go jako wektora do wprowadzania obcych genów do roślin dwuliściennych. Stosuje się dwa typy wektorów pochodnych *Ti*: kointegracyjne i binarne.

Wektory kointegracyjne powstają w wyniku rekombinacji między wektorem pośrednim namnażanym w *E. coli* i wektorem pomocniczym, pochodzącym z *Agrobacterium*.

Popularny wektor pośredni *pMON200* ma: *ori* z plazmidu *pBR322*, gen markerowy warunkujący oporność na spektynomycynę lub streptomycynę przydatny do identyfikacji transkoniugantów w bakteriach, kilka miejsc restrykcyjnych do włączania wstawek obcego DNA i prawą sekwencję graniczną T-DNA. Zawiera również geny *nos* i *nptII* kodujące syntazę nopaliny i fosfotransferazę neomycyny (oporność na neomycynę i kanamycynę), które umożliwiają identyfikację i selekcję transfekowanych komórek roślinnych.

Wektor pomocniczy, np. *pTiB6S3* ma lewą sekwencję graniczną T-DNA i sekwencje homologiczne do niesionych przez plazmid pośredni, które umożliwią homologiczną rekombinację. Po rekombinacji powstaje wektor kointegracyjny zawierający obie sekwencje graniczne oraz geny umożliwiające selekcję transfekowanych komórek roślinnych zawarte w obrębie T-DNA. Rekombinowane geny włączane są zazwyczaj między genami *nos* i *nptII* (rys. 14.5).

Wektory binarne są plazmidami zdolnymi do replikacji zarówno w *E. coli*, jak i w *Agrobacterium*, dzięki czemu mogą być utrzymywane w *Agrobacterium*



Rys. 14.5. Konstrukcja wektora kointegracyjnego do transformacji roślin. W układzie kointegracyjnym z rozseparowanymi na różnych plazmidach sekwencjami granicznymi, LG i PG, rekombinacja zachodzi przez krótkie sekwencje T-DNA (ST) obecne w obu wektorach. Wektor pomocniczy, *pTiB6SE*, jest pozbawiony sekwencji onkogennych. Wektor pośredni — *pMON200* — składa się z sekwencji *pBR322* (*ori*), regionu nadającego oporność na streptomycynę i spektynomycynę — *Spc/Str^R*, polilinkera do włączania obcych genów — *PL*, genu *nptII* otoczonego sekwencjami regulacyjnymi genu *nos*, genu *nos* i regionu *ST*. *pMON200* nie replikuje w *A. tumefaciens* i może się w nich utrzymać jedynie po rekombinacji z plazmidem pomocniczym. Znajdujący się w *A. tumefaciens* kointegracyjny wektor może transfekować zakażone przez te bakterie rośliny, wprowadzając do ich komórek zrekombinowany gen

bez kointegracji do replikonu plazmidu *Ti*. Omija się wtedy proces rekombinacji, często kończący się niepożądanymi zmianami w potencjalnie niestabilnym obcym, wstawianym genie. Jednym składnikiem układu binarnego jest plazmid mający obie sekwencje graniczne, dominujący roślinny marker selekcyjny, kilka pojedynczych miejsc restrykcyjnych służących do wprowadzania obcych genów i gen oporności na antybiotyki, który umożliwia selekcję w bakteriach. Wektory te mają także replikon typu *pRK2*, *pVS1* (z plazmidu *Pseudomonas*), *pArA4a* (z plazmidu *Agrobacterium*), umożliwiające klonowanie genów w rozmaitych bakteriach.

Drugim składnikiem układu binarnego jest szczep *Agrobacterium* z pomocniczym plazmidem *Ti* dostarczającym funkcji *vir*. W tym plazmidzie usuwa się fragment T-DNA, aby uniemożliwić rekombinację z opisanym wyżej wektorem niosącym zrekombinowany DNA. Tym ostatnim transformuje się szczep *A. tumefaciens* niosący pomocniczy plazmid. Transformowanymi bakteriami zakaża się komórki roślinne.

Ponieważ w wektorach — pochodnych plazmidów *Ti* — usuwa się geny nadające po infekcji komórkom roślinnym fenotyp nowotworowy, traci się jednocześnie prosty system selekcyjny zainfekowanych komórek: ich niezależność od hormonalnych regulatorów wzrostu. W tych układach do selekcji wykorzystuje się zatem dominujące geny markerowe. W większości przypadków korzysta się z fuzji genowej promotora jednej z syntaz opin z genem oporności na antybiotyki: chloramfenikol (*CAT*), kanamycynę (*nptII*), hygromycynę B (*aphII*), metotretksat (*dhfr*).

Różnorodność odpowiedzi różnych gatunków roślin na czynnik selekcyjny sprawia, iż istnieje wiele dróg uzyskiwania transgenicznych roślin w wyniku infekcji bakteriami *A. tumefaciens*, niosącymi zrekombinowany wektor. W pierwszych doświadczeniach uszkodzono łodygę wrażliwej rośliny igłą zakażoną bakteriami i czekano na rozwinięcie się narośli. Po kilku tygodniach wycinano zakażoną tkankę i przenoszono do sterylnej pożywki. W rosnącej grupie komórek (kallus) znajdowały się zarówno nietransformowane, jak i transformowane komórki. W roku 1981 opracowano metodę transfekcji izolowanych protoplastów i regenerację z nich roślin w odpowiednim selekcyjnym podłożu. Metodę tę można stosować do roślin (tytoń, petunia), których protoplasty w hodowli ulegają aktywnym podziałom.

Najdogodniejszą współczesną metodą uzyskiwania transgenicznych roślin jest zakażenie wycinków liści i hodowla w środowisku stymulującym selekcję transformowanych pędów, wyrastających z pominięciem stadium kallusa. Postępowanie to można stosować jedynie w przypadku transfekcji wektorami pozbawionymi genów kodujących regulatory wzrostu roślin.

Kallusy niektórych gatunków roślin (słonecznik, bawełna) udaje się przekształcić w hodowli w zróżnicowane zarodki somatyczne, łatwo pobudzane do wytwarzania roślinek (ang. plantlets). Wydaje się, iż embriogeneza somatyczna oraz powstawanie pędów rozpoczynają się od pojedynczej transformowanej komórki lub klonu komórek.

System oparty na transfekcji komórek roślinnych wektorami pochodzącymi z plazmidów *Ti* stosowany jest także w badaniach sekwencji regulacyjnych genów roślinnych. Do tych sekwencji dołącza się któryś z wcześniej opisanych genów markerowych (reporterowych) i mierzy się poziom jego ekspresji w zależności od stosowanych czynników regulujących aktywność genów roślinnych przez oddziaływanie z promotorem i innymi sekwencjami regulacyjnymi. Za szczególnie użyteczne geny reporterowe uważa się gen *lux*, pochodzący z bakterii lub robaczek świętojańskich, kodujący lucyferazę — enzym, którego jednym z produktów działania jest światło. Aktywność genu mierzy się m.in. przykładając kliszę fotograficzną do zrekombinowanych komórek. Innym często używanym genem reporterowym jest gen kodujący bakteryjną β -glukuronidazę, której aktywność można łatwo oznaczać ilościowo metodami spektrofotometrycznymi. Test ten można stosować również w analizie histologicznej pojedynczych komórek.

Badania aktywności sekwencji regulacyjnych ujawniły znaczną różnorodność odpowiedzi wykazywanej przez poszczególne transformowane komórki. Zjawisko to nazwano efektem pozycyjnym i przypisuje się je wpływowi sekwencji genomu roślinnego otaczających wstawkę obcego genu.

14.3.1.2. Bezwektorowa transfekcja roślin i komórek roślinnych

Opracowanie licznych metod wprowadzania heterologicznych genów do roślin za pośrednictwem *A. tumefaciens* było czynnikiem stymulującym postęp w badaniach alternatywnych dróg bezwektorowej transfekcji protoplastów, komórek i tkanek roślin. W serii wczesnych doświadczeń pokazano, iż można dokonywać transfekcji protoplastów petunii i tytoniu oczyszczonym *Ti* DNA, a także — dowolnym fragmentem DNA. Obcy DNA nie wpływa zauważalnie na rozwój i płodność transgenicznych roślin.

Inkubacja roślinnych protoplastów z linearyzowanym plazmidowym DNA wyposażonym w marker selekcyjny, w warunkach promujących pobranie DNA, prowadzi do otrzymania genetycznie transformowanych klonów komórkowych. Czynniki promocyjne można umownie podzielić na chemiczne i fizyczne. Do czynników chemicznych najczęściej zalicza się glikol polietylenowy (PEG) w alkalicznym środowisku lub poli-L-ornitynę. Dla tytoniu i petunii uzyskiwano wydajność transformacji 0,1–12%. W doświadczeniach tych istotnymi zoptymalizowanymi czynnikami są: moment dodawania czynnika chemicznego (po dodaniu DNA), jego stężenie, obecność jonów magnezu oraz dodanie nośnikowego, eukariotycznego DNA.

Często stosowanym fizycznym czynnikiem promującym transfekcję są krótkotrwałe wysokonapięciowe impulsy elektryczne (elektroporacja). Czas trwania impulsu i jego natężenie (czas rzędu mikro- lub milisekund, impulsy prostokątne lub zanikające wykładniczo, o natężeniach rzędu kilku woltów na centymetr) muszą być dobierane eksperymentalnie. W optymalnych warunkach osiąga się wysoką wydajność transformacji, sięgającą 2–8%.

Zamknięcie zrekombinowanego DNA w lipidowych pęcherzykach (liposomach) zapewnia jego ochronę przed nukleazami. W następstwie fuzji liposomów z protoplastami można uzyskać transformowane komórki, niestety z niską wydajnością. Jest to metoda pracochłonna, a wielkocząsteczkowy DNA nie zawsze udaje się właściwie zapakować do liposomów bez uszkodzeń.

DNA wprowadza się także do protoplastów i komórek roślinnych przez mikroiniekcję. Wysoka wydajność transformacji (ok. 30%) nie równoważy pracochłonności tej metody.

Metoda tzw. „armatki genowej” polega na wstrzeliwaniu drobnych (średnica 0,5–5,0 μm) kuleczek wolframowych opłaszczonych DNA. Próby takie wykonywano na zawiesinach komórek, liściach, zarodkach i tkance merystatycznej, uzyskując 1–10% trwale transformowanych komórek.

Nie jest jasne, czy sposób wprowadzenia DNA do komórek roślinnych wpływa na jego późniejszy los. Zazwyczaj wprowadza się do komórki kilkaset tysięcy kopii heterologicznego genu, a odnajduje po integracji do genomu kilkadziesiąt (transformacja w zawiesinie metodą chemiczną lub fizyczną) lub kilka (inne metody). Liczbę kopii zrekombinowanego genu można w pewnym stopniu kontrolować, zmieniając stosunek liczby komórek (protoplastów) do liczby cząsteczek genu, a także stężenie nośnikowego DNA. Wynik zależy również od gatunku roślin, z którego pochodzą modyfikowane protoplasty.

Informacji o procesie integracji DNA do chromosomu roślinnego dostarczyły głównie badania transformacji protoplastów tytoniu i dlatego wnoski z nich płynące mogą nie mieć charakteru uniwersalnego. Prawdopodobnie integracja wynika z niehomologicznej rekombinacji, w miejscach pęknięć pojedynczych nici DNA. Miejsca integracji w różnych komórkach poddanych transfekcji w tym samym doświadczeniu są różne i raczej przypadkowe.

Zależnie od badanego gatunku rośliny włączany DNA podlega (lub nie) różnego typu przegrupowaniom, prawie nigdy nie udaje się zrekombinować z genomem roślinnym długich (kilkanaście tysięcy par zasad) fragmentów DNA. Z tego powodu znane techniki transfekcji komórek roślinnych nie mogą być użyte do wprowadzania funkcjonalnych zespołów genów eukariotycznych. W trakcie wielu podziałów komórkowych i w procesach różnicowania, mimo braku presji selekcyjnej, heterologiczne geny raz wbudowane do genomu nie zmieniają się.

Pierwsze transgeniczne rośliny (tytoń) otrzymano w roku 1984. Pierwsze zezwolenie na wprowadzenie rośliny transgenicznej do uprawy polowej (pomidor) wydano w Belgii w roku 1986. Pierwsze transgeniczne rośliny na półkach sklepowych (pomidor trwały przy przechowywaniu) pojawiły się w lecie w roku 1994 w Stanach Zjednoczonych. Liczba zezwoleń na uprawę polową na świecie szybko rosła, od 9 — w roku 1987, 33 — w roku 1988, 65 — w roku 1989, 151 — w roku 1990, 208 — w roku 1991, do 393 — w roku 1992. Tylko 10% transgenicznych roślin należy do niejadalnych gatunków.

Do roku 1994 uzyskano transgeniczne odmiany w prawie wszystkich produkcyjnie użytecznych grupach roślin dwuliściennych i niektórych jednoliś-

ciennych. Dotyczy to niewielu ponad 20 gatunków roślin, na 11 gatunków przypada 96% wszystkich prób. Na czele listy znajduje się rzepak (37% doświadczeń), ziemniaki (16%), pomidor (9%), kukurydza (8%), len (6%), soja (5%). Pozostałe doświadczenia wykonano na: ogórku, sałacie, grochu, marchwi, kalafiorze, kapuście, selerze, rzodkiewce, truskawkach, chryzantemach, goździkach, lucernie, słoneczniku, buraku cukrowym, tytoniu, kiwi, petunii, rzodkiewniku, moreli, jabłoni, winorośli, orzechu włoskim, ryżu, życie i szparagach.

Opócz genów strukturalnych udało się wyodrębnić charakterystyczne sekwencje regulacyjne dla ekspresji transgenów: konstytutywnej i indukowanej, a także wyłączać ekspresję wybranych genów przez wprowadzanie sekwencji antysensownych. Wyniki uzyskane w kilkuset testach polowych w Stanach Zjednoczonych i w Europie wskazują na trwałość genetyczną heterologicznych genów w polowych uprawach transgenicznych roślin.

14.3.1.3. Celowość konstrukcji roślin transgenicznych

W obecnym stadium rozwoju technik kontrolowanych modyfikacji genetycznych tworzy się tylko rośliny z jednym transgenem. W zrealizowanych projektach modyfikowano takie cechy, jak: tolerancja na herbicydy (58%), oporność na choroby wirusowe (15%), oporność na owady — szkodniki (10%), jakość produktu (8%) i oporność na zakażenia grzybicze (3%). Wśród jakościowych cech produktów roślinnych modyfikowanych przez transgenizację występuje podwyższenie trwałości przechowywanych pomidorów, podwyższenie tolerancji na zimno i zamrażanie, zmiana spektrum lipidów pod kątem nasycenia kwasów tłuszczowych, zmiana proporcji cukru do skrobi w różnych tkankach roślin, zmiany w składzie aminokwasowym obficie występujących białek.

1) Rośliny uprawne odporne na herbicydy.

Cechy te osiągnięto:

(a) zwielokrotniając liczbę genów kodujących enzym inaktywowany przez dany herbicyd; u rośliny transgenicznej występuje nadprodukcja tego enzymu;

(b) wprowadzając gen kodujący zmienioną formę enzymu, oporną na herbicyd;

(c) wprowadzając gen kodujący enzym, który degraduje herbicyd.

Stosując tego typu podejścia otrzymano transgeniczne rośliny odporne na atrezyne, bromoksynil, 2,4-D, glifosat, fosfinitrycynę i sulfonylomocznik.

Tytoń oporny na 2,4-D uzyskano wprowadzając gen pochodzący z bakterii glebowych *Alcaligenes eutrophus*. Gen ten koduje monoooksygenazę 2,4-dichlorofenoksyoctanu, degradującą herbicyd 2,4-D. W transgenicznej roślinie zbadano ekspresję genu dołączonego do promotorów, konstytutywnego i indukowanego światłem, uzyskując w obu przypadkach rośliny odporne na wysokie dawki herbicydu.

Ochronę petunii przed innym herbicydem — glifosatem — zaburzającym biosyntezę aromatycznych aminokwasów katalizowaną przez enzym (EPSP),

zapewniono po wprowadzeniu 15–20 kopii genu kodującego EPSP. Uzyskano czterokrotne podwyższenie oporności roślin na glifosat. Mimo iż gen kodujący EPSP znajduje się w DNA chloroplastów, a transgeny — w DNA chromosomalnym, to produkt białkowy był przenoszony do chloroplastów. W podobny sposób uzyskano oporną na glifosat odmianę transgeniczną soi, rośliny o dużym znaczeniu produkcyjnym (z upraw soi w Stanach Zjednoczonych zbiera się rocznie 60 mln t nasion, z których uzyskuje się 6 mld kg oleju i 25 mld kg dodatków do pasz i żywności).

2) Rośliny uprawne odporne na zakażenia wirusami

Najpowszechniejszą udaną metodą uodporniania roślin na wirusy jest transgenizacja genami kodującymi białko płaszczka danego wirusa. W ten sposób podwyższono odporności wielu gatunków roślin m.in. na wirusa mozaiki tytoniowej (TMV), wirusy X i Y ziemniaka (PVX, PVY), wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV), wirusa mozaiki ogórka (CMV), wirusa mozaiki lucerny (AIMV) i wirusa karłowatości orzeszków ziemnych (PSV). Hipotezy tłumaczące to zjawisko zakładają zablokowanie przez białko płaszczka specyficznych wewnątrzkomórkowych „receptorów usuwania płaszczka” z infekcyjnych wirionów, bądź też istnienie hipotetycznego stanu dynamicznej równowagi między procesami opłaszczania i usuwania płaszczka, który swobodne białko płaszczka przesuwa w stronę pierwszego.

Zaskoczeniem dla badaczy było uzyskanie zwiększonej oporności na wirusy roślin, do których wprowadzono sekwencje DNA kodujące fragmenty białek związanych z replikacją lub samych replikaz. W takich komórkach, mimo zajścia infekcji, transgeniczne białko poważnie upośledza replikację genomu wirusa.

Ochronę przed wirusami zapewnia także nadprodukcja wirusowego RNA i antysensownego RNA. Być może jest to skutek blokowania przez komplementarne sekwencje RNA sekwencji kodujących genów i (lub) translacji właściwego mRNA.

Obserwowano tzw. krzyżową oporność roślin (roślina zakażona łagodnym szczepem wirusa jest oporna na późniejsze zakażenie odmianą wirulentną) i osiągnięto zwiększoną oporność na wirusy roślin, do których wprowadzono geny kodujące różne białka łagodnych odmian wirusów lub geny kodujące satelitarne RNA.

3) Rośliny odporne na owady — szkodniki i ich gąsienice.

Takie rośliny można uzyskać „ekologicznie czystym” sposobem bądź wprowadzając do roślin gen kodujący toksynę *Bacillus thuringiensis*, bądź gen kodujący inhibitor proteaz serynowych.

Od roku 1961 stosuje się w agrotechnice „ekopestycyd”, białko wytwarzane przez *Bacillus thuringiensis*. Jest to toksyna zabijająca dorosłe owady i ich gąsienice należące do rodzin: *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*. Preparaty toksyny z *B. thuringiensis* nie są trujące dla innych owadów (np. pszczoł) i ludzi. Sądzi się, że wrażliwe owady mają receptor w błonach komórkowych, pośredniczący w transporcie toksyny do wnętrza komórek. W alkalicznym środowis-

ku ich przewodu pokarmowego wywarzana przez bakterie protoksyna, o masie 130 kDa, ulega ograniczonej proteolizie, z wytworzeniem produktu (70 kDa) paraliżującego owada (gąsienicę). Niestety dostępne preparaty toksyny są drogie i ulegają szybkiej degradacji w warunkach naturalnych.

Żeby ograniczyć się do jednego przykładu dotyczącego ekonomicznej zasadności dalszego ulepszania toksyny jako pestycydu, rozpatrzmy wpływ szkodników na uprawy bawełny. Roczne zbiory w samych tylko Stanach Zjednoczonych osiągają wartość 4 mld \$, a straty wynikające z aktywności owadów i nakłady na chemiczną ochronę oceniane są na 650 mln \$. W sezonie plantacja bawełny musi być opryskana 5–8 razy. W badaniach transgenicznej bawełny noszącej gen, który koduje toksynę z *B. thuringiensis*, wykazano wysoką skuteczność ochrony przed szkodnikami, dzięki ekspresji genu toksyny we wszystkich częściach rośliny. Podobnie udaną transgenizację tym samym genem uzyskano w przypadku pomidorów.

Ochronę przed szkodliwymi owadami daje również wprowadzony do roślin gen kodujący 80-aminokwasowe białko wyizolowane z nasion krowiego grochu, będące inhibitorem tripsyny. Białko to nie jest toksyczne dla szczurów i ludzi; chroni skutecznie tytoń przed gąsienicami *Heliothis virescens*.

4) Rośliny przeznaczone do wysokowydajnej produkcji białek heterologicznych.

Ciekawym przykładem takiego wykorzystania techniki transgenizacji są ziemniaki z genem kodującym ludzką albuminę surowicy (HSA) (p. podrozdz. 14.2.4). Gen HSA użyty do transgenizacji zaopatrzone w sekwencję sygnałową pochodzącą z genu pomidora kodującego białko wydzielane poza komórki. Ludzką albuminę wytwarzają i wydzielają do przestrzeni międzykomórkowej komórki bulw transgenicznych ziemniaków. Z tych samych bulw można uzyskiwać skrobię. Obliczono, że po zwiększeniu wydajności ekspresji genu albuminy do poziomu 1–2% białka w bulwach, z 1 ha upraw ziemniaka można będzie uzyskać 12 kg albuminy.

14.3.1.4. Perspektywy zastosowań transgenicznych roślin

Mimo tych licznych przykładów uzyskania wartościowych roślin transgenicznych, modyfikacje genetyczne roślin nie są jeszcze zabiegiem rutynowym, ponieważ wiedza genetyczna i biochemiczna o świecie roślinnym jest mniej rozwinięta niż o zwierzęcym. Nie umiemy w pełni sterować procesami integracji transgenów (rekombinacją) z genomem roślinnym, m.in dlatego, że mało wiadomo o enzymach uczestniczących w rekombinacji. Brakuje szczegółowych danych o stabilności genomu roślinnego, o wpływie wzoru metylacji genów na ich aktywność transkrypcyjną, o wpływie warunków stresowych na modyfikację genomu.

Na te i podobne pytania szuka się na razie odpowiedzi w układach modelowych, *in vitro* i w modelowej roślinie — rzodkiewniku (*Arabidopsis thaliana*). Z badań tych wynika, że rekombinacja w roślinach jest częstym

zjawiskiem, że odgrywają w niej rolę krótkie powtarzające się sekwencje DNA, że najprawdopodobniej w komórce roślinnej istnieje topologicznie wyróżnione „centrum rekombinacji”.

Ważnymi elementami przy transgenizacji rośliny są sekwencje regulacyjne otaczające właściwy gen. Stwierdzono, iż powinny pochodzić z genomów roślin, z wirusów bądź bakterii zakażających rośliny. Znane są konstrukcje, w których zastosowano promotor wirusa mozaiki kalafiora (CaMV), sekwencje regulacyjne plazmidów *A. tumefaciens*, sekwencje promotorów genów sterujących fotosyntezą, leghemoglobiny i lecytyny z nasion soi. Ze względu na ograniczoną wiedzę o pozostałych typach sekwencji regulacyjnych w roślinach (wzmacniających i wyciszających) można tylko postulować wprowadzanie ich w miarę poznawania do przyszłych konstrukcji ukierunkowanych na regulowaną ekspresję transgenów w roślinach. Można sądzić, iż podobnie jak w genotypach zwierzęcych powiększy się repertuar poznanych sekwencji regulacyjnych wykazujących specyficzną tkankową lub o aktywności zależnej od stadium rozwoju rośliny. Byłyby one nieocenione w kontroli skutków transgenizacji roślin.

W doświadczeniach modelowych z transgenicznym tytoniem uzyskano za pomocą światła indukcję genu reporterowego wyposażonego w promotory odpowiedzialnych za fotosyntezę genów pochodzących z grochu i pszenicy. Fragmenty DNA zawierające geny kodujące zapasowe białka nasion soi i fasoli otoczone własnymi sekwencjami regulacyjnymi podlegały tkankowo specyficznej ekspresji (w nasionach) po wprowadzeniu do petunii i tytoniu, w dodatku w tym samym momencie rozwoju nasion, co w roślinie — dawcy genu. Sądzi się, że szczególnie przy przenoszeniu genów między organizmami jedno- i dwuliścinnymi ujawnianie pewnych cech zależy od gatunkowo specyficznych czynników działających w konfiguracji *trans* (np. czynników transkrypcyjnych).

14.3.2. Transgeniczne zwierzęta

Termin „transgeniczne zwierzęta” odnosi się do osobników mających heterologiczny/e gen/y trwale wbudowany/e do komórek rozrodczych. Zwierzęta takie uzyskuje się obecnie trzema metodami:

1) Przez nastrzyknięcie *in vitro* DNA do jednego z przedjądrzy zapłodnionej *in vivo* komórki jajowej, przed pierwszym podziałem. Jest to postępowanie prawie rutynowe i dające powtarzalne wyniki.

2) Przez infekcję wczesnego zarodka zrekombinowanym wektorem pochodzenia wirusowego.

3) Przez modyfikację genetyczną pierwotnych komórek zarodkowych ES (ang. embryo stem) i wprowadzenie ich do zarodka w stadium blastocysty.

Ten ostatni zabieg udaje się (1994 r.) tylko w komórkach myszy. Komórki ES są zdolne do różnicowania się we wszystkie typy komórek, a więc dorosłe myszy pochodzące z tego zabiegu będą składały się z komórek powstałych

z komórek ES oryginalnego zarodka i z komórek ES z transgenem (genetyczna chimera). Dalsze krzyżowanie pozwala uzyskać myszy homozygotyczne pod względem transgenu. Metoda ta pozwala na analizę mutacji recesywnych i dominujących każdego genu.

14.3.2.1. Transgeniczne myszy jako model modyfikacji genotypu do celów biotechnologicznych

Pierwsze doniesienie o udanej próbie transgenizacji zwierząt pojawiło się w roku 1980 (mysz z genem hormonu wzrostu szczura) i do tej pory służy jako przykład doświadczenia modelowego.

Od myszy hormonalnie pobudzonych do superowulacji pobiera się po zapłodnieniu jednokomórkowe zygoty. Następnie ok. 1 pl (pikolitr: 10^{-12} l)

Tabela 14.1. Schemat metody konstrukcji zwierząt transgenicznych

Stadium rozwoju	Rodzaj zabiegów	Efekty wstrzyknięcia genu	O wydajności decyduje:
<p><i>in vivo</i> superowulacja</p> <p>zabieg chirurgiczny</p> <p>zapłodnienie oocytów</p>	<p><i>in vitro</i></p> <p>zebranie zarodków</p> <p>nastrzyknięcie genu</p>	<p>integracja DNA (uszkodzenia mechaniczne)</p>	<p>–pozyskiwanie zarodków</p> <p>–przeżywalność zarodków <i>in vitro</i></p>
<p>podziały przed implantacją</p> <p>implantacja</p> <p>rozwój zarodkowy</p>	<p>przeniesienie do zastępczej matki</p> <p>kontrola implantacji</p>	<p>ekspresja transgenu</p>	<p>–implantacja</p>
narodziny			
<p>dalszy rozwój</p> <p>cechy fenotypowe</p> <p>dojrzałość płciowa</p>	<p>testy: na integrację DNA, na ekspresję genu</p> <p>ocena fenotypu</p> <p>zaplanowanie krzyżówek</p>	<p>efekty fenotypowe</p>	<p>–procent żywych urodzin</p> <p>–integracja</p> <p>–ekspresja molekularna i fenotypowa</p>
<p>potomstwo</p>	<p>testy: na integrację DNA, na ekspresję genu</p>		<p>–płodność</p> <p>–stabilność integracji i ekspresji</p>

roztworu DNA zawierającego 200–2000 liniowych kopii transgenu nastrzykuje się do dowolnego przedjądrza zygoty. Po kilku godzinach dzielące się zarodki (50–75% wydajności) wprowadza się, też przez zabieg chirurgiczny, do jajowodu zastępczej matki i oczekuje rozwinięcia się ciąży. Z urodzonego potomstwa (10–25% wydajności) 15–37% zwierząt dziedziczy wprowadzony obcy gen. Jeżeli wprowadzone geny włączyły się do genomu przed rozpoczęciem podziałów zygoty, to we wszystkich komórkach zarodkowych heterologiczny gen będzie włączony w tej samej pozycji i w tej samej liczbie kopii. Jeżeli do integracji dojdzie po pierwszych podziałach, to zarodki będą się składać z komórek różnych genetycznie (genetyczne chimery) (tab. 14.1).

Procesy prowadzące do integracji heterologicznego DNA do genomu komórki biorcy nie zostały w pełni poznane. Wydaje się, iż zachodzą one w sposób przypadkowy. W początkowym stadium obcy DNA tworzy w jądrze agregaty nie związane z chromosomami, w dalszych procesach prowadzących do integracji znaczną rolę przypisuje się takim reakcjom, jak ligacja i rekombinacja oraz fazie cyklu komórkowego. Istnieje jedno lub dwa miejsca integracji; integruje od jednej do kilkuset kopii obcego genu. W przypadku myszy pewien procent transgenów włącza się we właściwej pozycji genomowej w wyniku homologicznej rekombinacji. Ten proces homologicznej wymiany genów (ang. gene targeting) pozwala także na celowe uszkodzenie badanego genu i uzyskanie tzw. znokautowanych transgenicznych myszy. Metoda ta stwarza duże możliwości badań roli wybranych genów w funkcjonowaniu całego organizmu.

Stabilność obcego genu po utrwaleniu w genomie bywa różna, a zachodzące czasem przegrupowania sekwencji genowych prawdopodobnie wiążą się z rodzajem sekwencji DNA komórki otaczających heterologiczny gen.

Uważa się, że o poziomie ekspresji transgeny decyduje region genomu, w którym doszło do integracji, wzorzec metylacji danego gatunku, trwałość danego mRNA, rodzaj otaczających sekwencji regulacyjnych (promotor, enhancer), rodzaj czynników „trans”, które regulują transkrypcję i translację. W niektórych transgenach elementy regulacyjne typu „cis” (sekwencje DNA) wystarczają do osiągnięcia tkankowo specyficznej ekspresji lub ekspresji zależnej od określonego induktora. Na przykład specyficzną indukcję ciężkimi metalami wykazano dla genów dołączonych do promotora metalotioneiny, indukcję interferonem — dla promotora antygeny MHC-II, promotora genu transferyny przez estrogeny, promotora genu insuliny przez glukozę. W gruczole mlecznym krwi uzyskano ekspresję ludzkiego genu kodującego oksydazę nadtlenkową po jego połączeniu z promotorem genu kwaśnego białka serwatki.

Uzyskanie transgenicznych myszy otworzyło wiele możliwości badawczych ekspresji genów w czasie rozwoju i różnicowania się organizmu, których nie można uzyskać w badaniach pojedynczych komórek po transformacji *in vitro*.

Myszy transgeniczne są wzorcem niektórych chorób genetycznych i nabytych człowieka. Istnieją myszy będące modelami chorób o charakterze dominującym (np. aniria, zespół Waardenberga), chorób sprzężonych z chromo-

somem X (np. zespół Lescha–Nyhana, dystrofia mięśniowa typu Duchenne’a), chorób o charakterze recesywnym i autosomalnym (np. albinizm, choroba Gauchera, mukowiscydoza, anemia sierpowata, β -talasemia) i innych (niedobór odporności, arterioskleroza, inne choroby układu krążenia, choroba Alzheimera, nowotwory, takie jak: retinoblastoma i zespół Li–Fraumeni oraz zaburzenia neuropsychiatryczne).

Dużo nowych informacji z zakresu onkogenezy uzyskano w badaniach myszy transgenizowanych protoonkogenami i onkogenami. Nowotwory powstają w myszach niosących protoonkogen *c-myc*, dołączony do wirusowego promotora lub enhancera genu immunoglobuliny. Nowotwory trzustki indukowane są przez protoonkogen *c-ras* z sekwencjami regulacyjnymi genu elastazy szczura. Skrzyżowanie dwu szczepów transgenicznych myszy, niosących osobno *c-myc* i *v-Ha-ras* doprowadziło do indukcji licznych nowotworów w potomstwie.

Zwierzęta transgeniczne — modele określonych chorób ludzi — mogą być także używane w badaniach przesiewowych substancji terapeutycznych, w badaniach toksykologicznych itp.

14.3.2.2. Transgenizacja zwierząt hodowlanych

Udane transgenizacje myszy nasunęły sugestie zastosowania tej samej techniki do pozyskania transgenicznych zwierząt o znaczeniu produkcyjnym. Postuluje się ukierunkowanie prac w celu:

- (a) stymulacji zwiększenia masy ciała i (lub) wydajności mlecznej po transgenizacji zwierząt hodowlanych genami hormonów wzrostu;
- (b) modyfikacji genotypu zwierząt przez wpływ na poziom ekspresji ich genów lub wprowadzenie nowych genów z tym samym zamiarem;
- (c) poprawy zdrowotności zwierząt dzięki wprowadzeniu genów oporności lub tolerancji na określone choroby.

Pierwsze próby transgenizacji zwierząt hodowlanych genem hormonu wzrostu dotyczyły królików, owiec, bydła, świń, ryb i kurcząt. Zabiegi te okazały się możliwe, chociaż wydajność była bardzo niska, a koszt — wysoki. Na wyniki końcowe trzeba też długo czekać. Porównajmy: końcowa wydajność transgenizacji myszy wynosi 4%, królików — 3%, świń — 1%, a owiec — 0,2%.

Genetyka molekularna zwierząt gospodarczych praktycznie nie istnieje. Wydajność transgenizacji zależy od wielu etapów całego procesu (tab. 14.1), które mogą przebiegać różnie u różnych gatunków. Nawet w tych przypadkach, w których udowodniono istnienie transgenu w zwierzętach poddanych manipulacji genetycznej, rzadko udaje się zaobserwować wpływ produktu genu (hormonu wzrostu) na szybkość przyrostu masy ciała; często transgeniczne zwierzęta są bardziej chorowite, czasem nieplodne. Problemy te wymagają wielu dodatkowych badań biochemicznych, genetycznych i fizjologicznych.

Transgeniczne zwierzęta gospodarcze są także otrzymywane z myślą uzyskania „żyjących reaktorów”. Punktem wyjściowym były uprzednio prowadzo-

ne badania nad syntezą białek mleka ssaków, strukturą i regulacją ekspresji genów α - i β -kazein z kilku gatunków ssaków, genu β -laktoglobuliny owcy, genów kwaśnego białka serwatki (WAP) myszy i szczura, α -laktoglobuliny człowieka, bydła i szczura. Kontrolowana ekspresja genów kodujących określone typy kazein mogłaby doprowadzić do zmian w składzie białek mleka. Opisano np. transgeniczne myszy wytwarzające β -laktoglobulinę owcy i człowieka.

Wydaje się, że próby uzyskania zwierząt transgenicznych wydzielających z mlekiem białka o znaczeniu farmaceutycznym są atrakcyjne. Surowiec ten może być uzyskiwany bez zabijania zwierzęcia, z wysoką wydajnością i niskim kosztem. Heterologiczne białka będą zapewne prawidłowo modyfikowane potranslacyjnie, a liczba żywych „bioreaktorów” może być praktycznie nieograniczona. W trzech firmach farmaceutycznych w Stanach Zjednoczonych, Wielkiej Brytanii i w Holandii prowadzi się prace nad transgenizacją owiec, kóz i bydła w celu wytwarzania ważnych dla lecznictwa substancji w gruczole mlecznym tych zwierząt (α -1-antytrypsyna, t-PA, laktotransferyna, czynniki krzepliwości krwi).

α -1-antytrypsyna jest glikoproteiną surowicy stosowaną w leczeniu rozemdy i chorób degeneracyjnych płuc. Wydzielana jest z surowicy ludzkiej, gdzie jej stężenie wynosi 2 g/l. W Stanach Zjednoczonych ocenia się, iż zapotrzebowanie roczne na ten lek wynosi 4 t. Otrzymano kilkaset transgenicznych owiec, do których wprowadzono ludzki gen α -1-antytrypsyny połączony z promotorem β -laktoglobuliny. 5 z nich rościło normalnie i wydało potomstwo. Poziom ekspresji α -1-antytrypsyny był różny u poszczególnych zwierząt, wynosił od kilku do kilkudziesięciu gramów z litra. Białko można oczyścić do 95% homogenności metodami standardowymi. Jest ono prawidłowo glikozylowane.

Być może, iż nowa technika zaproponowana w roku 1991 przez holenderskich biotechnologów zapowiada przełom w transgenizacji bydła, ponieważ przeniesiona z laboratorium metodyka transgenizacji myszy jest w przypadku bydła zbyt kosztowna: wymaga dwu zabiegów chirurgicznych; czas generacji i ciąży krów jest długi, a ciąża zazwyczaj pojedyncza. Badacze holenderscy uzyskali oocyty z jajników krów po uboju, przeprowadzili w kontrolowanych warunkach zapłodnienie *in vitro*, co pozwoliło na uzyskanie dużej liczby zygot, a także na śledzenie ich dalszego rozwoju przez ok. 9 dni, czyli do stadium moruli. Zygoty (103) wprowadzono następnie do zastępczych matek, a ciąża rozwinęła się w 21 przypadkach. Uzyskano 16 zdrowych cieląt; u dwojga wykryto wprowadzoną do zygot konstrukcję genową (ludzki gen laktoferryny, otoczony sekwencjami regulacyjnymi bydłowej α S₁-kazeiny), u jednego (byczek) była ona identyczna z użytą do nastrzyknięć. Wydajność metody jest zatem porównywalna do klasycznej transgenizacji myszy, a postępowanie łatwiejsze, lepiej kontrolowane i tańsze.

Spektakularnym przykładem uzyskania wartościowych zwierząt transgenicznych są szybko rosnące ryby. Ryby charakteryzują się korzystnie niskim (1,5) współczynnikiem konwersji pokarmu (stosunek masy pokarmu do masy ciała).

Współczynnik ten dla bydła wynosi 12, a dla przemysłowych kur — 1,7. Duża liczba komórek jajowych ryb, łatwość zapłodnienia, a także łatwość hodowania narybku czynią z nich dogodny obiekt do transgenizacji genem hormonu wzrostu.

W pierwszych konstrukcjach genowych wykorzystano promotory genów wirusa *SV40*, mysiego genu metalotioneiny oraz genu β -aktyny karpia i otrzymano transgeniczne karpie, łososie oraz pstrągi. Wprowadzanie obcych genów do ryb mogło jednak spotkać się z niechęcią konsumentów. Z tego powodu zastosowano kasetę ekspresyjną składającą się z cDNA genu hormonu wzrostu łososia otoczonego flankującymi sekwencjami genomowymi tego samego genu i poprzedzonego promotorem genów *AFP* pochodzących z ryb z rodziny węgorzykowatych (*Macrozoarces americanus*). Geny *AFP* kodują białka obniżające temperaturę zamrażania osocza krwi ryb żyjących w bardzo zimnych wodach. Poziom ekspresji tych genów jest regulowany przez temperaturę, w lecie ryby wytwarzają ich mniej, a w zimie więcej. Opisaną konstrukcję genową wstrzyknięto do 800 komórek jajowych, uzyskując 80-procentowy poziom wylęgania narybku i 20-procentową śmiertelność po roku hodowli. Po tym czasie zważono 200 osobników i od 50 najcięższych pobrano krew oraz łuski, przeznaczone do analizy DNA metodą PCR. U sześciu ryb wykryto sekwencje obejmujące region promotorowy i fragment genu; kompletny transgen znaleziono u 9 ryb (1,9% wydajności transgenizacji). Średnia masa ciała ryb transgenicznych przewyższała pięciokrotnie masę ryb kontrolnych; najcięższej — trzynastokrotnie.

14.4. Metody rekombinacji DNA *in vitro* zastosowane do produkcji związków chemicznych

W roku 1981 w Raporcie Biura do Spraw Ocen Technologicznych Kongresu Stanów Zjednoczonych napisano: „Końcowe efekty biotechnologiczne mogą być ogromne, a jedynym czynnikiem ograniczającym je pozostaje wyobraźnia biotechnologów”. Zdanie to świadczy o nadmiernym optymizmie autorów, co potwierdzają losy prognoz wdrożeń biotechnologicznych metod wytwarzania związków chemicznych o znaczeniu przemysłowym. Prognozy te formułowano bez uwzględniania stopnia doskonałości uprzednio eksploatowanych technologii, optymalizowanych często przez wiele lat. Zakładano również, iż biotechnologie nie uzupełnią, a całkowicie wyprą z przemysłu metody klasyczne. Założenia tego rodzaju zawyżały znacznie ocenianą wartość rynkową produktów nowej biotechnologii.

Nowe technologie zazwyczaj polegają na ulepszaniu istniejących procedur, co oczywiście nie wpływa na podaż produktów. Metodami rekombinacji DNA najczęściej konstruuje się nowe szczepy produkcyjne, co w małym stopniu wpływa na koszt finalnego produktu, składający się w głównej mierze z kosztów surowców, zużytej energii i procedur oczyszczania produktu.

W przemyśle chemicznym biotechnologie stosowane są w bardzo wąskim zakresie, jedynie do syntezy biokatalizatorów (enzymów) specyficznych procesów, do syntezy biopolimerów dla medycyny i w produkcji opakowań.

Rozpatrzmy nowy sposób wytwarzania oksydazy glukozy (otrzymywanej dotychczas z *Aspergillus niger*). Jest to enzym używany w przemyśle spożywczym do odtleniania napojów, usuwania glukozy z jajecznego proszku, jako naturalny środek konserwujący żywność, w bioczujnikach mierzących w fermentorach stężenie glukozy i w zestawach diagnostycznych w analizie medycznej. Do genu *A. niger* kodującego oksydazę glukozy dołączono regulacyjne sekwencje nukleotydowe (promotor dający się indukować i sekwencje kierujące sekrecją białka do podłoża), potem wprowadzono je do plazmidowego wektora *S. cerevisiae* i transformowano tym plazmidem drożdże. Tak zrekombinowany szczep zgodnie z założeniami wytwarzał i wydzielał do podłoża oksydazę glukozy z bardzo wysoką wydajnością (3g/litr hodowli). Jest to chyba jedyny opisany przykład tak wysokiej ekspresji i sekrecji dużego białka (masa ok. 400 000 Da) w *S. cerevisiae*. Ze względu na odmienny wzór glikozylacji niż w enzymie natywnym „rekombinacyjna” oksydaza glukozy jest trwalsza i ma szerszy zakres pH optymalnej aktywności niż enzym z *A. niger*.

14.5. Postęp nauki i techniki w rozwoju biotechnologii

Metody rekombinacji DNA *in vitro* znalazły bardzo szerokie zastosowanie w opracowywaniu wielu nowych biotechnologii. Dalszy postęp w tym zakresie będzie wymagać ulepszania i poszerzania zestawów odczynników i metod badawczych: znajdowania i wyodrębniania trwałych, specyficznie działających enzymów, rozwoju analizy krystalograficznej, syntezy nowych biopolimerów, metod badania struktur nadmolekularnych. Coraz większą rolę odgrywać będzie zapewne inżynieria białkowa: projektowanie i synteza mutein. Muteiny umożliwiają analizę konsekwencji zmian struktury pierwszorzędowej białek. Ten kierunek rozwoju pociąga za sobą udoskonalenie przestrzennego programowania cząsteczek i różnych typów ich oddziaływań.

Można oczekiwać, iż sprzężony rozwój inżynierii genetycznej i biotechnologii doprowadzi do dalszego pogłębienia wiedzy o potranslacyjnych modyfikacjach białek. Być może uda się uzyskać takie mikroorganizmy, które byłyby zdolne do glikozylacji białek. Ciągle jeszcze nie są rozwiązane problemy tolerancji immunologicznej organizmu ludzkiego na obce białka (potencjalne leki białkowe, muteiny).

Wiele procesów o potencjalnym znaczeniu biotechnologicznym wymaga optymalizacji w celu podwyższenia wydajności i skrócenia czasu produkcji. Należy opracować nowe metody wykrywania i ilościowej oceny produktów ekspresji genów w pojedynczych klonach zrekombinowanych komórek (przyspieszenie badań przesiewowych). Usprawnieniu produkcji sprzyjałoby także opracowanie jednoznacznych metod kontroli poszczególnych jej etapów, rzad-

ko dotychczasosiągane, skrócenie procesu oczyszczania produktu końcowego, uproszczenie, dziś bardzo kosztownych i czasochłonnych, procedur oceny końcowego produktu (np. w Stanach Zjednoczonych przepisy przewidują 750 różnych badań testujących każdy preparat „rekombinacyjnego” ludzkiego hormonu wzrostu).

14.6. Bezpieczeństwo biotechnologii dla ekosfery i człowieka

Możliwość niekontrolowanego „przecieku” genetycznie modyfikowanych organizmów z laboratorium do środowiska nie budzi współcześnie obaw i emocji, pod warunkiem zachowania w pracy zasad „dobrej techniki mikrobiologicznej”. Jednakże nadal uznaje się, iż trudne są do przewidzenia skutki świadomego wprowadzania transgenicznych organizmów i zrekombinowanych kwasów nukleinowych do środowiska naturalnego. Takie obawy w środowiskach pozanaukowych wyrażały się niszczeniem poletek z transgenicznymi roślinami (Stany Zjednoczone) i okupacją laboratoriów biologii molekularnej przez agresywne ugrupowania „zielonych” (Niemcy).

W naukowych gronach stawiane są nadal pytania:

(a) czy można w pełni przewidzieć skutki rekombinacji różnych fragmentów DNA?

(b) czy i jakie są naturalne sposoby przekazywania DNA między organizmami, również ewolucyjnie odległymi?

(c) jak trwałe są zrekombinowane organizmy w warunkach naturalnych?

(d) czy można i jakim kosztem spowodować, żeby przemysł biotechnologiczny stał się „szczelny” dla zrekombinowanych organizmów?

Żeby lepiej zrozumieć konkretne obawy i zastrzeżenia rozpatrzmy dwa potencjalne przykłady negatywnego rozwoju sytuacji w wyniku realizacji projektu biotechnologicznego. Pierwszy dotyczyłby możliwości nie kontrolowanego rozprzestrzenienia się w populacji ludzkiej bakterii *E. coli* mającej gen kodujący proinsulinę. Otóż w najkorzystniejszych dla ekspresji pojedynczego genu warunkach jedna bakteria *E. coli* wytwarza dane białko w ilości odpowiadającej 30% białka całkowitego (tj. 10^6 cząsteczek proinsuliny na 1 bakterię). W przewodzie pokarmowym człowieka *E. coli* stanowi 1% flory bakteryjnej (2×10^9 komórek). Gdyby wszystkie komórki *E. coli* wytwarzały proinsulinę, to na dobę powstałoby 0,6 jednostek, podczas gdy zdrowa trzustka produkuje na dobę 30 jednostek.

Drugi przykład dotyczy konsekwencji spożywania przez ludzi i zwierzęta roślin transgenicznych z markerowym genem *nptII* kodującym fosfotransferazę neomycyny, która nadaje oporność na kanamycynę i neomycynę. Można zatem zapytać, czy enzym ten jest toksyczny dla zwierząt i ludzi, czy „spożywane” geny i enzymy (obecne w transgenicznych roślinach) utrudnią terapię tymi antybiotykami chorób dziś nimi leczonych, czy gen ów może być przeniesiony

z rośliny do bakterii patogennych dla człowieka lub np. do bakterii glebowych i z jakim skutkiem. Liczne badania przeprowadzone w tym zakresie pozwalają na udzielenie na wszystkie te pytania odpowiedzi negatywnych. Od wielu lat gen *nptII* stosowany jest jako gen markerowy w transfekcji komórek zwierzęcych oraz ludzkich i nie odnotowano nigdy objawów toksycznych lub jakiegokolwiek wpływu na ich wzrost i podziały. Zarówno DNA, jak i samo białko są szybko trawione w przewodzie pokarmowym. W jelicie cienkim człowieka i w glebie żyje wiele niepatogennych mikroorganizmów opornych na neomycynę.

Tam, gdzie działają odpowiednie komisje ustanawiające przepisy bezpiecznej pracy (Stany Zjednoczone, Wielka Brytania, Niemcy, Francja, Belgia, Holandia) przyjęto, iż decyzje o dopuszczeniu do realizacji projektów wymagających uwolnienia zrekombinowanych organizmów lub zrekombinowanego DNA do środowiska wydawane są dla konkretnych, poszczególnych przypadków. Jednocześnie gromadzi się dane o przekazywaniu DNA między organizmami i o trwałości zrekombinowanych organizmów poza laboratorium.

W badaniach tych krokiem wstępnym jest opracowanie metod wykrywania zrekombinowanych organizmów, w szczególności mikroorganizmów, w środowisku naturalnym: wodzie, powietrzu i glebie, gdzie mogą się znaleźć bądź w wyniku zamierzonych postępowań, bądź jako „przeciek” z laboratorium lub zakładu przemysłowego. Dotychczas stosowane w tym zakresie metody oceniono jako mało czułe i mało specyficzne.

W oznaczeniach ilościowych i jakościowych można wykorzystać markery genetyczne typu funkcjonalnego (np. kodujące cechy oporności na antybiotyki), chromogenne (np. oznacza się barwę kolonii w obecności chromogennego substratu, powszechnie stosowane jest wykrywanie bakterii niosących gen *xyIE*, który w obecności katecholu powoduje wytworzenie żółtego barwnika), wreszcie można użyć sond molekularnych hybrydujących z jednoznaczными sekwencjami nukleotydów w zrekombinowanym organizmie (np. unikatowymi sekwencjami rRNA). Geny markerowe powinny być włączone do genomu badanego organizmu, gdyż w środowisku naturalnym nie podlegają segregacji i stanowią małe obciążenie metaboliczne dla komórki gospodarza.

W ocenie konsekwencji wprowadzenie do środowiska zrekombinowanych mikroorganizmów pomogły dane o rozprzestrzenianiu się nowych, nie zrekombinowanych mikroorganizmów używanych do biologicznej kontroli: chorób roślin, uszkodzeń przez przymrozki, chorób pochodzenia glebowego, biologicznej kontroli owadów i chwastów, rozszerzenia lub intensyfikacji przyswajania atmosferycznego azotu oraz usuwania przemysłowych odpadów. W żadnym z badanych przypadków nie stwierdzono znacznego naruszenia biologicznej równowagi w otoczeniu, w którym uwalniano mikroorganizm. Nawet w przypadku wysokiego miana nowych mikroorganizmów w środowisku, obserwowano jego spadek we wszystkich badanych próbach do bardzo niskich wartości, często już po paru dniach.

W porównaniu z opisanymi badaniami liczba uwolnionych do środowiska zrekombinowanych mikroorganizmów jest niska. Na zlecenie odpowiednich kontrolnych instytucji badano zachowanie w środowisku mikroorganizmów wzbogaconych o plazmid lub mutagenizowanych chemicznie, które nie są zrekombinowane, ale łatwe do odszukania. Od roku 1986 (pierwszy przypadek) do roku 1991 uwolniono na świecie mikroorganizmy do środowiska 27 razy. Ich los był dokładnie monitorowany. Wyniki tych pomiarów upoważniają do wniosku, że procedura wprowadzania do biosfery zrekombinowanych mikroorganizmów i ich dalsze losy nie stwarzają zagrożeń, ale powinny być w przyszłości nadal kontrolowane.

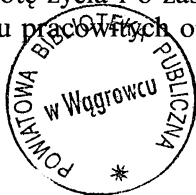
Do końca roku 1991 w Stanach Zjednoczonych i w Europie wykonano ok. 400 prób polowych z transgenicznymi organizmami (głównie roślinami). Rozłożono także przynęty dla dzikich zwierząt zawierające rekombinacyjną szczepionkę przeciw wściekliznie. W Wielkiej Brytanii dopuszczono po raz pierwszy w produkcji żywności żywy, zrekombinowany szczep drożdży piekarniczych.

Prowadzone są intensywne badania bezpieczeństwa pracy w przemyśle stosującym zrekombinowane organizmy. Przyjęto generalną zasadę, że w warunkach przemysłowych dopuszczona jest praca z takimi mikroorganizmami, które mogą wywoływać choroby człowieka, jednakże jest mało prawdopodobne, aby samoistnie przenosiły się one do otoczenia. Do tej klasy należą m.in. *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *hepatitis A, B*, *Toxoplasma*, *Cytomegalovirus*, *Rubella*, wirus Epsteina–Barr.

W przemyśle biotechnologicznym w Holandii skontrolowano pracę fermentorów o pojemności od 7 do 3000 tys. litrów. Nie stwierdzono przecieków mikroorganizmów podczas posiewów, w okolicy fermentorów, przy pobieraniu próbek w systemie zamkniętym i przy wirowaniu. Filtry powietrza dostępne w handlu uniemożliwiają uchodzenie mikroorganizmów z gazami wylotowymi przy fermentacji.

Dzięki współczesnej biotechnologii opracowano metody diagnostyczne umożliwiające molekularnie uwiarygodnione poradnictwo genetyczne. Jednocześnie jednak powstała potencjalna możliwość genetycznej oceny przydatności ludzi do wykonywania pewnych zawodów, która może być nadużywana przez pracodawców, firmy ubezpieczeniowe itp. W rolnictwie podwyższanie wydajności produkcji prowadzi do upadku drobnych gospodarstw wiejskich, odsunięcia ludzi od bezpośredniego kontaktu z przyrodą i do dalszej industrializacji życia. Zmianom ulegają formy pracy ludzkiej: biotechnologie są często (nie zawsze) bezpieczniejsze dla zatrudnionych i mniej skażające środowisko, za to wymagają wyższych kwalifikacji zawodowych personelu. Zagospodarowanie lub usunięcie typowych biotechnologicznych odpadów produkcyjnych może być trudne.

Kiedyś prognozowany, dziś realizowany „nowy wspaniały świat biotechnologii” przechodzi surową próbę życia. Już obecnie widać, jak nie sprawdziło się wiele wczesnych przewidywań i ile zdarzyło się nieoczekiwanych odkryć, skutkujących różnorodnymi zastosowaniami. Zamiast maleć — rośnie liczba fundamentalnych pytań o istotę życia i o zasady, które procesami życiowymi sterują. Przyszłość jest w ręku pracujących optymistów.



INDEKS

Opracowała *Jadwiga Baj*

Gwiazdką oznaczono numery stron, na których hasła znajdują się na rysunku, w podpisie lub w tabeli. Numery stron, na których znajduje się główny opis, są pogrubione.

- aberracje chromosomalne 387, 404
- abiotyczna synteza związków organicznych 413
- acetylaza chloramfenikolu 161
- addycje 185, 240, 254–256, 260
- adenina 38*, 42, 49
- adenoidy 335
- adenowirus(y) 169, 234, 389, 405
 - , jako wektor 450, 451
 - , replikacja 82, 83*
- adenylotransferaza 212
- agregaty 424
- Agrobacterium* 424, 458, 459
 - *tumefaciens* 169, 422, 457, 460
 - *rhizogenes* 457
- agropiny 457
- AIDS 333, 382–384, 452
- akryflawina 260
- aktywator NifA 200
 - NtrC 200
 - plazminogenu (TPA) 427, 455
 - replikacji A1 100
- alarmon 197
 - głodu aminokwasowego 208
 - głodu węglowego 208, 209
- albinizm 468
- albumina osocza (HSA) 443, 456, 464
 - surowicy bydłowej 324
- Alcaligenes eutrophus* 199, 462
- alkaliczna fosfataza 174
- alkilacja 259
- allel(e) 17
 - genów MHC 364, 369
 - *Mo* 314
 - polimorficzne 369
 - wielokrotne 25
- allolaktoza 203
- Altman 415
- α -amanityna 227
- Ames B. 208
- amfipatyczny kwaśny heliks 232
- aminoacylo-tRNA 137–140
- aminokwasy, oznaczenia jednoliterowe 135*
- aminopteryna 342
- 2-aminopuryna (n^2 Pur) 259
- cAMP 207, 208, 450
- ampicylina 273
- amplifikacja DNA, p. reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)
 - genu 283, 396
 - komórek 330
- Anacystis nidulans* 143, 422*
- analiza komputerowa genów 190, 191
 - restrykcyjna 163*
- analogi zasad 259
- anemia sierpowata 25, 449, 468
- anergia 381
- aneuploidia 387, 410, 411
- angiogeneza 387, 407, 408

- aniridia 467
 antygen 323, 324, 328, 329, 333, 335, 364, 376
 – H-Y 318
 – MHC-II 467
 – poliwalentny 324, 325*, 374
 – powierzchniowy Hbs Ag 442, 443, 448
 –, prezentacja 336
 – T 85, 86, 171
 antyodon(y) 136, 137, 140, 145, 149–151
 – mitochondrialne drożdży 145*
 antyonkogeny 290, 392, 403–408, 410, 411
 antystazyna 454*, 455
 antyterminacja, p. transkrypcja, antyterminacja
 antytrombina III 454*
 α -1-antytrypsyna 469
 aparat Golgiego 376
 apolipoproteina 146
 – B 240*, 241
apoptosis, p. apoptoza
 apoptoza 389, 402, 403, 407
 apopresor 205
Arabidopsis 107, 430, 464
 – *thaliana* 181, 464
Archaea 421
Archaeobacteria (p. też archebakterie) 421
 archebakterie (p. też *Archaeobacteria*) 418,
 422*, 425*
 armatka genowa 461
 arterioskleroza 453, 468
 artretyzm 452
Ascomycetes, p. workowce
Aspergillus nidulans 233, 431, 471
 astma 328
 astrocytoma, p. gwiazdziak
 asymilacja NH₃ 199, 210
ataxia-telangiectasia 390
 atenuacja, p. transkrypcja, atenuacja
 atenuator(y) 217, 220
 ATPaza 148, 248*
 Auerbach Ch. 257
 auksotrofia tryptofanowa 152
 auksyny 457
 autonomously replicating sequences (ARS,
 ang.) 87
 autoradiografia 174, 178, 180*
 autoradiogram 176*
 autoregulacja pozytywna 311
 autosomy 20, 308, 310, 317, 321
 autotolerancja 370
 Avery T. 23
Azospirillum sp. 212

Bacillus 33, 68*
 –, fag *SPO1* 198
 –, klonowanie 198
 –, sporulacja 198
 – *subtilis* 422*, 425
 –, terminacja replikacji 106
 – *thuringiensis* 463
 bakterie fotosyntetyzujące purpurowe
 423–425
 – – zielone 425
 bakterie gramdodatnie 425*
 bakteriofag(i) 23, 27, 29, 33, 76
 –, cykl lityczny 33, 34
 –, cykl lizogeniczny 33, 269, 270
 – defektywne 34
 – *G4* 76, 77*
 – łagodne 33, 157
 – *M13* 76, 77*, 166, 168
 – *P1* 3, 68*
 – *P22* 33
 – *Q β* 418
 – *SPO1* 158
 – *T3* 195
 – *T4* 27, 29, 112, 225
 – *T7* 195
 – Φ 29 84
 – Φ X174 76, 77*, 80, 81
 – λ 29, 31, 33, 50, 68*, 165, 192, 222, 269, 270*
 – –, cykl lityczny 269
 – –, integracja 118
 – –, jako wektor 165
 – –, replikacja 71–73, 82
 – –, transkrypcja 98, 222
 bakulowirus 169, 443
 bank genów 158, 168, 173, 177, 188, 279, 303
 – ludzkiego cDNA 449
 barwniki akrydynowe 260
 bazofile 328
 bending (ang), p. DNA, zaginanie
 Bennett 344
 Benzer S. 27
 Berg P. 203
 białaczki 386, 389, 390, 400
 – chroniczna mielocytarna 406
 – ostra promielocytarna 400
 – pre B-ALL 400
 białko(a), acylacja 439, 443
 – antyterminacyjne 207
 – CAP 118, 208, 209
 – chorionu 283
 – CRP 208
 – env 393*
 –, fosforylacja 439, 443
 – fuzyjne 440, 455

- białko(a) G 397, 398, 406, 408
 – gag 393*
 – GAP 398, 399, 402, 406
 –, glikozylacja 169, 439, 443
 – heterologiczne 464
 – histonopodobne 117, 118
 – HIV 383
 – IHF 118, 200, 269, 270*
 – jądrowe 82, 83*
 – kodowane przez protoonkogeny 397–402, 406
 – macierzy jądrowej 88, 89*, 119
 – MHC 333, 334
 –, mostki S–S 168
 – NF1 406
 – niehistonowe 118–120, 122
 – onc 397
 – PCNA 97, 100
 – pol 393*
 – promotorowe 87
 –, proteoliza 443
 – Ras 397–399, 401*, 402, 406
 – RecA 249*, 263, 264, 267*, 268
 –, regulacja stabilności 246, 247
 – regulatorowe 295, 302
 – rybosomalne 144*
 – SSB 82, 84, 90, 94, 102
 – stresowe 72, 198, 247
 – struktury chromatyny 88, 89*
 – szoku cieplnego 247
 – towarzyszące 247
 – typu heliks–skręt–heliks 232*, 233
 – zrekombinowane 443
 biblioteka genów, p. bank genów
 biocujniki 471
 biokatalizatory 471
 biomodulatory 444
 biopolimery 471
 biotechnologia 429
 –, bezpieczeństwo 472–474
 – medyczna 444
 biotyna 174
 Bishop J.M. 395
 blastocysta 305*, 306, 465
 blastoderma 294
 – syncytialna 296, 298
 – komórkowa 298
 blastomery 284
 –, determinacja rozwojowa 285, 286
 bliźnięta 364
 Boveri T. 281
 branch migration (ang.), p. przesuwanie rozgałęzienia
Brevibacterium 442
 Bridges C.B. 309
 Brimacombe 142
 brodawczak HPV 405
 – skóry 386
 bromek etyldyny 39, 41, 163
 5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktozyd,
 p. X-gal
 bromoksynil 462
 bromouracyl (BrUra) 259
 bruzdkowanie 284, 294
 bulion pierwotny 413, 416, 420*
- Caenorhabditis elegans* 290, 291, 303, 308, 311
 –, budowa 291
 –, gen *lin-14* 292
 – genom 291
 –, mutant *unc-86* 291
 –, rozwój 291–293
 –, sekwencjonowanie 181
 –, transpozony 271*
 Calladine C.R. 45, 47
 cap (ang.), p. czapeczka
 CAP, p. białko CAP
 catabolite activator protein (ang.), p. białko
 CAP
 Cech T. 236, 414, 415
 –, model redagowania 242, 243
 cecha dominująca 16, 17*
 – recesywna 16, 17*
 celularyzacja 98
 centralny dogmat genetyczny 25, 412
 centromer 21, 109, 122, 126, 131, 169, 283, 365
 chaperone (ang.), p. białka towarzyszące
 Chase M. 23
 chemioterapia 453
 chiazmy 23
 chimera 305*, 306
 – genetyczna 466
Chlamydomonas 35
 chloramfenikol 271, 423, 459
 chloroplasty, pochodzenie endosymbiotyczne
 423–425, 436
 –, rRNA 142
 chłoniak 389, 403
 – Burkitta 389, 396
 choroba(y) Alzheimerera, p. zespół Alzheimerera
 – autosomalne 448, 468
 – Gauchera 468
 – genetyczne 448, 449
 – –, diagnostyka 183, 444
 – – jednogenowe 451
 – – o charakterze dominującym 467

- choroba(y) genetyczne o charakterze recesywnym 468
- —, terapia 444
 - Huntingtona p. płasawica Huntingtona
 - nowotworowe (p. też nowotwory, raki) 445, 453
 - Taya–Sachsa 452
 - układu krążenia 454, 455, 468
 - wirusowe 453
 - zakaźne 450
- chów wsobny 353, 362, 364, 366
- chromosom 119–121
- chromatydy 19, 21
- siostrzane 126*
- chromatyna 53, 119, 120, 127, 285, 299, 300*, 380
- aktywna transkrypcyjnie 128, 129
 - , despiralizacja 284
 - interfazowa 125
 - , miejsca nadwrażliwe na nukleazy 130, 131
 - muszki owocowej 122
 - płciowa 314
 - , stan aktywny 284
 - , włókno 123 –125, 130
 - —, model solenoidu 124
 - — 10 nm 123, 124,
 - — 39 nm 124, 128, 130
- chromofor flawoproteinowy 259
- chromosom(y) 19, 290, 307, 344, 369, 405, 406, 408, 448
- , aberracje 19, 20
 - bakteryjny 30, 62, 115
 - eukariotyczne 106, 118, 126
 - homologiczne 21, 261, 289
 - olbrzymie 283
 - metafazowy 125, 128
 - politeniczne 19, 20*, 283, 284, 310
 - X 130, 285, 308–311, 314, 318, 320, 449, 468
 - Y 308, 309, 313, 315–319, 435, 436
- chromosome jumping (ang.), p. skoki po chromosomie
- chromosome walking (ang.), p. kroczenie wzdłuż chromosomu oraz wędrówka po chromosomie
- chromosomowa teoria dziedziczności 19
- ciałka inkluzyjne 440
- ciałko Barra 314
- „cis”, p. układ cis
- cistron 27
- Clostridium* 442, 474
- Collins J. 168
- concerted evolution (ang.), p. ewolucja zespołowa
- consensus 196
- Correns E. 16
- cos, p. sekwencje cos
- CpG islands (ang), p. sekwencje CpG
- Crick F. 23, 59, 60*, 137, 145, 434, 435
- crossing-over 21, 22, 33, 184, 261, 263*–265, 272, 275, 316–318
- niewzajemny 432
- CRP, p. białka CRP
- cukrzyca insulino-zależna 451
- C-value paradox (ang.), p. paradoks zawartości DNA
- Cyanophora paradoxa* 424
- cyclic AMP receptor protein (ang.), p. białko CRP
- cyjanelle 424
- cyjanobakterie 423, 425*
- cyklaza adenylowa 207, 399
- cykliny 398, 399
- cytochrom c 421
- cytokineza 283
- cytokiny 457
- cytokiny (p. też limfokiny, interleukiny) 323, 324*, 333, 334, 372–375, 382, 450, 453
- , geny 365*, 370
 - , GM-CSF 373
 - , TNF 373, 443
- cytoliza 325
- Cytomegalovirus* 474
- cytozyna 38*, 42
- czapeczka 229*
- czarna ospa 446
- czas utajenia 386
- cząsteczki adaptatorowe 136
- cząstki Dane’a 445
- nukleoproteinowe (VLP) 278
- czerniak 452
- człowiek 303, 314, 315, 318
- , geny rRNA 432
 - , mt rRNA 142
 - , sekwencjonowanie genomu 181
- czynnik(i) AP-1 399
- CPF 244
 - E1A 234
 - inicjacyjne IF1, IF2, IF3 140
 - kancerogenne (p. też kancerogeny i karcinogeny) 388, 391
 - krzepliwości krwi 427, 428, 469
 - martwicy nowotworów (TNF) 452
 - MPF 398
 - mutagenne 409
 - rakotwórcze, p. czynniki kancerogenne
 - rozprzestrzeniania 387, 409

- czynnik(i) sigma 193, **198–200**, 230
 – stymulujące wzrost kolonii 441
 – TBT 232, 234
 – TDF 315
 – Tdy 315
 – terminacyjne 140
 – TFIIR 415*
 – – eukariotyczne 226, **227, 228**, 230, **232–234**
 – – kodowane przez protoonkogeny 397–399, 401*, 402, 408
 – – prokariotyczne 52, 53, 295, 296, 299, 415, 465
 – – VIII 443
 – – epidermalny (EGF) 427, 428
 – – fibroblastów (FGH) 286
 – – hepatocytów 409
 – – płytek krwi 191
 – – TGFβ 408
 – – Xa 454
- 2,4 D 462
 Dawkins R. 434
 dehydrogenaza alkoholowa kukurydzy 428
 – 3-fosfoglicerynianu (GAPDH) 428
 dekorsyna 454*, 455
 deksametazol 131
 dekstran 376
 delecja(e) 20, 240, 250, 254–256, 260, 271, 274*, 275, 299, 317, 318, 379, 384, 403, 404, 410, 440
 – ΔF₅₀₈ 450
 – klonalna 371, 381,
 – urydyn 148
 –, wytwarzanie 185, 186*
 deoksyrybonukleotydy 37–39
 2-deoksyryboza 37
 determinacja płci 307–321
 – człowieka 319, 320
 – *Drosophila* 308–313
 – ssaków 313–321
 –, zaburzenia 321
 determinanty antygenowe 324, 325*, 327, 330*, 338, 342, 364, 374
 deaminaza adenozy (ADA) 452
 diagnostyka chorób genetycznych 448, 449
 – – zakaźnych 450
 – genowa 439
 – prenatalna 448
Dictyostelium discoideum 422*
 dimery pirymidynowe 258, 259
 diminucja chromatyny 281, 283
 dinitrofenol 324, 325
 discriminator (ang.), p. dyskryminator
 displacement loop (ang.), p. pętla D
 długie terminalne powtórzenia (LTR) 276, 277*
 DNA, analiza rentgenowska 45, 47
 –, cDNA 146, 158, 173, 449, 455
 – chloroplastowy (ct DNA) 35, 423, 424
 –, denaturacja 49
 – domena(y) 115, **125, 126**
 – – białkowa 426–429
 – – efektorowa 325, 326*
 – – homeotyczna 233
 –, – B 44, 46, 113, 131, 132*
 –, – krzyżowa 131–133
 –, – plektonemiczna (przepleciona) 57, 58
 –, – solenoidowa (toroidalna) 57, 58
 –, – trójniciowa 131–133
 –, – Z 40, 42, 131–133
 –, G-DNA 108
 – jądrowy 423
 – kinetoplastowy 50
 –, konformacja 47, 48, 52
 – mitochondrialny (mtDNA) 35, 50, 73–75, 423, 424, 430
 –, msDNA 225
 –, nić H i L 73 –75*
 –, pętle 53, 54, 55, 73, 74, 214
 –, rozkręcanie 49
 – samolubny 430, **434**
 – satelitarny 123, 126, 432
 –, struktura typu A 40, 47*
 –, struktury krzyżowe 58
 – swobodny 36
 –, T-DNA 457, 458
 – unwinding element (ang.), p. sekwencje DUE
 –, właściwości topologiczne 55, 56*
 –, zginanie 49–53, 68, 122, 209, 214
 –, zrelaksowanie 116
 DNaza 175*
 – I 40, 41*
 – V 98
 DNP p. dinitrofenol
 dobór naturalny 413, 421, 430
 Doolittle W. 434
 dopełniacz, p. system dopełniacza
 dosage compensation (ang.), p. mechanizm kompensacji
 Drew H.R. 45, 47
 Dreyer 344
Drosophila 234, 285, 290, 304*, 305, 307, 308
 –, chromosomy olbrzymie 19
 –, – politeniczne 19

- Drosophila* determinacja płci 308–313
 – , geny kierujące rozwojem 293–303
 – *melanogaster* 19, 25, 62, 63*, 279, 283, 302
 – – , geny supresorowe procesu nowotworowego 407
 – – , polimeraza RNA 227
 – – , transpozony 271*
 – , rozwój 294
 – , rRNA 432
 drożdże 265
 – piekarnicze, szczep zrekombinowany 474
 – , plazmidy 87
 – , poliubikwityna 247
 – , retrotranspozony 278
 – , szok cieplny 247
 – , transpozony 271*
 drzewo genealogiczne 421, 425
 – – na podstawie sekwencji 16S rRNA 421, 422*
 – – , mtDNA człowieka 435
 duplikacje 271, 307, 310, 346, 348, 404, 426, 436
 – , w rodzinie globin ssaków 426*
 dyferencjacja, p. różnicowanie się
 dymorfizm płciowy 309, 312
 dysfunkcje hormonalne 388
 dyskryminator 196*, 197
 dysmutaza nadtlenkowa 443
 dystrofia mięśniowa Duchenne'a 449, 452, 468
 dystrofina 449, 450
 dziedziczenie cytoplazmatyczne 35
 – niemendłowskie 409
 – pozachromosomalne (pozajądrowe) 36
- editing (ang.), p. mRNA, redagowanie
 edukacja grasicowa 365, 370
 edytosom 142, 147
 efekt letalny 258
 – mateczny 296
 – mutagenny 249*
 – mutatorowy 249*, 254
 – pozycyjny 460
 EGF 443
 egg polarity genes (ang.), p. geny polarności jaja
 egzonukleaza(y) 91*, 185, 249*, 252
 – III z *E. coli* 185, 186*, 199
 – 3' 242
 egzony 236, 240, 245, 345, 346, 426–428, 449, 450
 – , tasowanie 427, 428, 430, 437
 ekdyson 84
 ekopestycyd 463
 ekspresja genu 173, 439
 ektoderma 285, 306
 elektroforeza w żelu agarozowym 57, 160, 176*
 – – – poliakrylamidowym 41*, 50, 160, 178–182
 elektroporacja 172, 460
 embrionalny nowotwór mięśni 290
 endocytoza 374
 endoderma 285
 endomitoza 283
 endonukleaza 91*, 119, 185, 242, 249*
 – AP 259
 – UV (UVRABCD) 258, 259
 endosymbionty 425
 enhancer(y) (wzmacniacz(e)) 131, 200, 210, 212, 213, 214, 230, 231, 232, 299, 396
Enterobacteriaceae 67
 enzymy lizosomalne 334
 – reperujące 253
 – restrykcyjne 157*, 158, 159, 160, 163*, 185, 189*
 epitopy immunogenne 444
 erytrocyty 283, 293
 erytropoetyna 441, 444
Escherichia coli 29, 30, 32, 33, 52, 62, 63*, 422*, 429, 457, 458
 – , asymilacja NH₃ 210
 – , – primosomów 70
 – , – rybosomalne 144
 – , – SSB 102
 – , błędy translacji 154, 155
 – , czynniki sigma 199
 – , genom 110, 115
 – , klonowanie 442, 472
 – , *oriC* 67–69, 71*
 – , replikacja DNA 67–71, 105, 106
 – , sekwencjonowanie 181
 – , system SOS 268
 – , topoizomeraza 103
 – , transkrypcja 216
 – , transpozony 271*
 estrogeny 467
 estry forbolu 386, 398
 etykieta genomowa 417, 418
Eubacteria 421, 422*, 425*
 euchromatyna 127, 128
 eukarionty (p. też *Eukaryota*) 430
 – , ewolucja 420*
Eukaryota (p. też eukarionty) 192, 226, 237, 421, 425*, 439
 ewolucja genów 191

- ewolucja genów organellarnych 425
 – mtDNA 435
 –, ślepy zaulek 425
 – zespołowa 431
 exon shuffling (ang.), p. tasowanie egzonów
- F⁻ 30*, 31*
 F⁺ 30*
- fagi, p. bakteriofagi
 fagocytoza 325, 327, 334, 383
 fagocyty mononuklearne 335, 336
 faktory elongacyjne 140, 417
 fasola 465
 faza S 405
 – G1 87, 405
 fenotyp 26
 –, nowotworowy 391, 403
 fenylketonuria 448, 449, 452
 –, diagnostyka molekularna 449*
 fermentory 474
 fibroblasty 362
 fibronektyna 427
 fibryna 454*
 fibrynogen 454*, 455
 figura Hollidaya 263*, 264, 267*
 – krzyżowa 264
 filtr nitrocelulozowy 176*, 177*
 firmy biotechnologiczne 440
 – –, Amgen 440, 441
 – –, Biogen 441
 – –, Centocor 440
 – –, Chiron 440, 441
 – –, Genentech 440, 441
 – –, Genzyme 441
Flavobacterium heparinum 422*
 footprint (ang.), p. technika odcisku stopy
 forma replikacyjna (RF) 76
 formylometionina 205*
 fosfinotrycyna 462
 fosfodiesteraza 399
 fosforybozylotransferaza hipoksantynowa
 (HGPRT) 342
 fosfotransferaza neomycyny 458, 472
 fotodimery pirymidyn 258, 267
 fotoliaza DNA 249*, 258
 fotoreaktywacja 249, 267
 fotosynteza 423, 425
 fragment Klenowa 92, 174
 fragmenty Okazaki 64, 65, 70, 78, 80, 90, 92, 96,
 97, 99, 101, 267
 Fuller B. 55
 fuzja genów 396, 410, 440
 – komórkowa 403
- galaktoza 234, 235
 β -galaktozyd 201–203
 β -galaktozydaza 161, 163, 165, 173, 201–203,
 208*
 β -galaktozydopermeaza 201, 203
 gametogeneza 289
 gamety 18
 Gamow 134
 gap genes (ang.) 302
 gel shift (ang.), p. test spowolnienia migracji
 w żelu
 gen(y) A 80
 – *abd-A* 299, 300*
 – *Abd-B* 299–302
 – *ADA* 452
 – *ADHI* 168
 – *AFP* 470
 – *ampR* 274
 – *Antp* 301
 – *APC* 404, 406
 – *aphII* 459
 – *Apl2* 147
 – *appA* 199
 – *aroH* 206, 207
 – autosomowe 316, 321
 – *bcd (bicoid)* 296, 297
 – białek szoku cieplnego 129
 – *bolA* 199
 – *BRCAl* 404
 – *CDC2, CDC9, CDC17* 97, 98*, 101
 – ciągle 192
 – *c-onc*, p. protoonkogeny
 – *cro* 223
 – *crp* 208
 – *cya* 208
 – *da* 310
 – *dam* 254
 – *DCC* 406
 – *Deformed* 301, 305
 – *dhfr* 459
 – *dnaA, dnaB, dnaC, dnaG, dnaT* 68, 70*, 90*,
 93–95*
 – *dsx* 312, 313
 – dysmutazy nadtlenkowej 436
 – *en (engrailed)* 297*, 298, 302
 – *env* 171, 277, 393*, 394
 – *eve (even-skipped)* 297, 298
 – *flaI* 199, 200
 – *flbB* 199
 – *ftz (fushi tarazu)* 297, 298
 – fuzyjny 400
 – *gag* 171, 277, 278, 393, 394
 – *gal* 34, 35

- gen(y) *GAL4*, *GAL10*, *GAL80* 234*, 235
- *GALI* 168
 - *glnA*, *glnD*, *glnF* 199, 211–213
 - *hairy* 297*
 - *hb* (*hunchback*) 296, 297
 - histonu H3 436
 - heterologiczne 442, 461
 - homeotyczne 295, 299, 300, 305, 307
 - homologiczne 174, 178
 - hormonu wzrostu 468
 - housekeeping 235, 285
 - *Hox-1.5*, *Hox-2*, *Hox-2.3*, *Hox-2.5* 301, 303, 305, 306
 - *htrA* 199
 - , identyfikacja 279
 - immunoglobulin, p. immunoglobuliny, geny
 - *int* 269
 - *Ir* 366
 - *ix* 313
 - jądrowe 436
 - *katE*, *katF* 199, 200
 - α i β kazeiny 469
 - *Kn1* (*Knotted-1*) 306, 307
 - *kni* (*knirps*) 297
 - konserwowane 178
 - kontrolujące liczbę podziałów komórek 389
 - , konwersja 264–267, 432
 - *Kr* (*Krüppel*) 297
 - kwaśnego białka serwatki 467
 - *lacA*, *lacI*, *lacY*, *lacZ* 201–203, 256
 - β -laktoglobuliny 469
 - *LCFS2* 404
 - *LEU2* 169*
 - *lin-14* 292
 - , lokalizacja 279
 - *lux* 460
 - markerowe, p. geny reporterowe
 - *MAT Pi* 307
 - *MCC* 404, 406
 - *MEN-1* 404
 - milczące 146
 - *MIP1* 98*
 - mitochondrialne 236, 241
 - *mle* 311
 - *msl-1*, *msh-2*, *msh-3* 311
 - *mutD*, *mutH*, *mutL*, *mutS*, *mutU* 93*, 249*, 252–254
 - *N* 223, 224
 - *nef* 383*
 - *NFI* 404, 406
 - nieciągłe 227, 383*
 - *nifL* 213
 - *nm23* 408
 - *nos* (*nanos*) 296, 458
 - *nptII* 458, 459, 472, 473
 - *nth* 249*
 - *ntrA*, *ntrC* 199, 200, 211, 212
 - *onc* 392, 394, p. też onkogeny i protoonkogeny
 - *p53* 404–406, 410
 - *paired* 297*
 - *Pdha-1*, *Pdha-2* 433
 - *Pgk-1*, *Pgk-2* 433
 - *phr* 249*
 - podzielone 439
 - *pol* 171, 277, 278, 393*, 394
 - *Pol1*, *Pol2*, *Pol3*, *PolX* 97, 98*
 - *polA*, *polB*, *polC* 90*, 92–94
 - polarności jaja 295, 296, 299, 301, 307
 - polarności segmentów 298, 307
 - polihedryny 443
 - *priA*, *priB*, *priC* 70*
 - *PTP γ* 404
 - *RAG1*, *RAG2* 351
 - *Rb* 404, 405
 - *recA*, *recB*, *recC*, *recD* 249*, 263, 264
 - *Rd* 290
 - recesywne 19
 - regulatorowe 284, 294, 295*
 - *rep* 70*
 - reporterowe 354, 459, 460, 456
 - *rev* 383*
 - *REV3* 99
 - *rho* 218
 - rRNA 229, 236, 431, 432
 - tRNA 229, 237*
 - *RP11*, *RP12* 97
 - *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD*, *rpoF*, *rpoH*, *rpoN* 193, 198–200, 212, 218
 - rybosomowe 129
 - segmentacji 295, 296–299, 301
 - *sis-a*, *sis-b* 310, 311
 - *snf* 310
 - sprzężone 19, 21*, 299, 307
 - – z płcią 316
 - *SRY* 320
 - *ssb* 70*
 - supresorowy 189
 - – przerzutowania 408
 - – transformacji nowotworowej, p. antyonkogeny
 - *Sxl* 308, 310, 311, 312
 - *tat* 383*
 - *TDF* 317, 318
 - *tnpA*, *tnpB*, *tnpR* 273–276
 - *topA* 103

- gen(y) *tra* (*E. coli*) 31
- *tra* (*Drosophila*) 311, 312
 - , transfer horyzontalny 436
 - transferyny 467
 - transformujące (*v-onc*), p. onkogeny
 - α -tropomiozyny 245
 - *trpA*, *trpB*, *trpC*, *trpD*, *trpE* 206*, 207, 220*
 - *tus* 105
 - *Ubx* 299–302
 - *umuC*, *umuD* 269
 - *unc-86* 291, 292
 - *ung* 249*
 - *upr* 383*
 - *wvrA*, *wvrB*, *wvrC*, *wvrD* 249*, 253*, 258, 269
 - *wg* (*wingless*) 298, 302
 - witelogeniny 53
 - *WT* 404, 406
 - *VHL* 404
 - *vif* 383*
 - *vpu* 383*
 - , wymiana homologiczna 467
 - *xis* 270
 - *xthD* 199
 - *ZFY* 318, 319
- gene disruption (ang.), p. rozbitcie genu
- gene targeting (ang.), p. homologiczna wymiana genów
- genetic make-up (ang.), p. konstytucja genetyczna
- genetyka klasyczna 15
- genom(y) bakteryjny, napięcia torsyjne 113–117
- *E. coli* 110
 - mitochondrialny 418, 421
 - , wielkość 110*
 - wiroidów 111
 - wirusów 111–113
- genomic tag (ang.), p. etykieta genomowa
- Gilbert W. 203, 420, 426, 429
- , hipoteza tasowania egzonów 427, 428
- G-kwartet 107
- glifosfat 462
- glikol polietylenowy (PEG) 460
- glikoproteina(y) 382
- D wirusa opryszczki HSV 447
 - HBsAg 445, 447
- glikozylacja białek 442, 443, 471
- glikozylaza uracylowa DNA 249*, 255, 256, 260
- glista 281
- globina(y) 285
- α 426, 456
 - β 25, 426, 456
 - – płodowe 426
- glukoamylaza 443
- β -glukuronidaza 460
- głodzenie 198
- głód aminokwasowy 197, 208, 216, 219
- węglowy 207, 208
- główny układ zgodności tkankowej (MHC) 364
- – – –, białka 362, 364–370
 - – – –, klasy I 361*–363, 365*–369, 372–375, 381
 - – – –, klasy II 362, 263, 365*–369, 372–375
 - – – –, geny 364–366, 369, 370
 - – – –, udział w nowotworzeniu 407, 409
- GM-CSF, p. cytokiny
- gorące miejsca 256, 273
- Gorini L. 152, 153
- granulocyty 373
- gratuitous inducer (ang.), p. induktor bezinteresowny
- Griffith F. 23
- gruczolakorak prostaty 450
- jajników 450
- gruczolakorakowatość mnoga wewnątrzdzielnicza 390
- rodzinna jelita grubego 390
- gruczoły limfatyczne 335, 336
- guanina 38*, 42
- guanozynotrifosforan (GTP) (p. też czapeczka) 230
- guide RNA (ang.), p. RNA przewodni
- Gurdon J.B. 281
- guz lity 387
- nowotworowy 343
 - Wilmsa 390, 403, 404, 406
- gwiazdziak 404, 406
- gyraza 115*–117, 197, **104–105**
- Haemophilus* 33
- Halobacterium volcani* 422*
- Halococcus morrhuae* 422*
- halofile 422*, 425*
- Hansenula polymorpha* 442
- hapten 324, 325*, 329, 353
- heat shock (ang.), p. szok cieplny
- helikaza(y) 70*, 86, **102**, 106, 258
- DnaB 69, 72*, 76, 106
 - PriA 97
 - Rep 80
 - replikacyjna 69, 85
- heliks podwójny 37, 39, 45
- –, badania krystalograficzne 39, 40

- heliks podwójny, bruzda 44, 45*, 48, 50
 – —, kąt skręcenia 39
 – —, prawoskrętność 42
 – —, skok 40–42, 45*, 50, 57
 – potrójny 43
 α -heliks 301
 helix–turn–helix (ang.), p. struktura heliks–skręt–heliks
 helper viruses (ang.), p. wirusy wspomagające
 hem 426
 hemaglutynina wirusa grypy 447
 hementyna 454*, 455
 hemofilia 452
 hemoglobina 25, 426, 456
 hemoglobinopatie 452
 heparyna 194, 454*, 455
hepatitis B, p. zapalenie wątroby typu B
 hepatocyty 445
 hermafrodyta 321
 Hershey A.D. 23
 heterochromatyna 127, 128, 281
 heterodupleks 254, 262*–264, 267
 heterokarion 27
 heterozygota 16 –18, 21
 Hfr 30*, 31
 high mobility group (ang.), p. białka HMG
 Hinnen A. 168
 hipercholesterolemia 452, 453
 hiperplazja 386
 hipoksantyna 342
 hipoteza endosymbiotyczna 423
 – Gai 436
 – tolerancji 137, 145
 hirudyna 443, 454*, 455
 hirugeny 455
 histamina 328
 histon(y) 41, 44, 50, **118**, 119, 121, 122, 127, 129, 130, 232, 245, 421
 – , acetylacja 130
 – H1 118 –121*, 123, 130
 – H1° 118
 – H2A 117–119, 121*, 127, 130
 – H2B 118, 119, 121*, 127, 130, 244
 – H4 118, 119, 121*, 127, 130
 – H5 118
 – , udział w replikacji 100
 histone-like proteins (ang.), p. białka histonopodobne
 histydyna, biosynteza 24*
 HLA 369
 Hohn B. 168
 Holliday R. 263
 homeoboks **301**–303, 306, 307
 homeodomena 301–303, 306, 307
 homeotic genes (ang.), p. geny homeotyczne
 homeotic selector genes (ang.), p. geny homeotyczne
 homologiczna wymiana genów 467
Homo sapiens (p. też człowiek) 422*
 – —, ewolucja 107
 – —, telomery 435, 436
 homozygota 18, 21, 291
 hormon wzrostu 441
 hot spots (ang.), p. gorące miejsca
 housekeeping genes (ang.) 235, 285
 human leukocyte antigen (ang.), p. HLA
 hybrydyzacja 173
 – *in situ* 279, 294, 318, 320
 – kolonijna 177, 178
 – łyśkowa 177*, 190
 – , technika „northern” 174
 – , technika „southern” 174, 176*
 hydroksylaza fenyloalaninowa (PAH) 448
 – indoloacetamidu 457
 hygromycyna 459
 IFN- α 373
 IFN α -2a 453
 IFN- β 373
 IFN- γ 373, 380
 IFN- β 373
 IFN- γ 373, 380
 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, p. immunoglobuliny
 immediate hypersensitivity (ang.), p. nadwrażliwość typu wczesnego
 immortalizacja komórek 389, 403, 408
 immunoglobuliny (Ig, p. też przeciwciała) 323, 329, 330
 – , budowa 326*
 – , geny 244, 344
 – , – , mutacje somatyczne 332, 344, 353
 – , – , organizacja 344–353, 380
 – , – , regulacja transkrypcji 354, 355
 – , – , rekombinacje somatyczne 344, 348–351
 – IgA 326 –328, 331, 332, 379, 380
 – IgD 326–328, 331, 378, 380
 – IgE 326–328, 331, 379, 380
 – IgG 326–328, 331, 332, 379, 380
 – – , model cząsteczki 339*
 – IgM 326 –328, 331, 332, 377–380
 – – , schemat cząsteczki 327*
 – , klasy 326, 327*
 – , superrodziny 366, 369
 – , źródła różnorodności 352, 360
 implantacja 466
 imprinting 288, 289, 409

- imprinting genomowy u myszy 289*
 – genomu rodzicielskiego 288, 290
 indukcja 200, 201
 –, operon laktozowy 201–205
 – różnicowania 285
 – – mezodermalna 286
 induktor 202, 284
 – bezinteresowny 202
 Ingram V.M. 25
 inhibitor proteaz serynowych 463
 insercja 251, 384
 – faga λ 269
 – urydyn 148
 –, wytwarzanie 185
 insulina 285, 441
 integrująca 277, 278, 382
 interferon 453, 467
 – α 441, 442
 – β 441
 – γ 441
 interleukina(y) 372
 – IL-2 373 – 376, 443, 452, 453
 – IL-3 373
 – IL-4 373, 376, 380
 – IL-5 376
 – IL-6 373, 376
 – IL-7 373
 interseks 309, 310*, 312
 interseksualizm 313
 intron(y) 173, 188, 225, 227, 228, 230, 231, **236**,
 349, **429**, **430**, 432 – 434
 –, *Arabidopsis* 430
 – bliźniaczy 430
 –, drożdże 430
 –, fag T4 416
 –, genom ludzki 429
 –, grupy 236, 238*
 –, pochodzenie 430
 –, *Tetrahymena* 415
 –, wycinanie **236–239**, 415
 – ω 430
 intron homing (ang.) 430
 inwazyjność, p. komórki nowotworowe
 inwersja 271, 274*
 inżynieria białkowa 471
 – genetyczna 36, 156, 197
 iperyt 257
 IPTG, p. izopropylotiogalaktozyd
 IRS, p. wewnętrzny odcinek resolucji
 izopropylotiogalaktozyd 202
 izotyp 326

 Jacob F. 201

 jajnik 315, 316, 321
 jajo, polarność składników 285
 jąderko 228, 283
 jąderko 228, 283
 jądro 245, 424
 –, eliminacja 283
 – interfazowe 126, 127, 313
 Jenner E. 446
 jeżowiec 244, 285, 303, 436
 junk DNA (ang.), p. śmieci molekularne

 kallus 459
 kanał chlorkowy błony cytoplazmatycznej 450
 – jonowy 362
 kanamycyna 271, 458, 472
 kancerogen(y) (p. też karcinogeny) 388
 kancerogeneza 388, 392
 kanoniczna sekwencja nukleotydowa 220
 kapsyd 111–113*
 – wirusa HIV 382, 383*
 karboksylaza rybulozobisfosforanu (karboksylaza rybulozo-1,5-difosforanu) 247, 424
 karcinogeny 260
 kariotyp 317, 320
 karłowatość 451
 kasetta ekspresyjna 443
 kaskada ekspresji genów 223
 – – – regulatorowych 308, 309*, 311
 – enzymatyczna 211
 – transkrypcji 198
 – – genów rzęskowych 199
 katalaza 199
 katar sienny 328
 katechol 473
 katenacja 105, 213
 katenat 214
 kinaza(y) białkowe C 398, 402
 – glicerofosforanowa (PGK) 428
 – polinukleotydowa 174
 – serynowa 397
 – serynowo-treoninowa 397, 398, 402
 – tymidylanowa (TK) 342
 – tyrozynowa 363, 397, 398
 kinetochor 126
Klebsiella pneumoniae 199, 212, 214,
 klonowanie DNA 157*, 158, 439
 – – komputerowe 190
 – – w komórkach eukariotycznych 170*
 – – za pomocą kosmidów 167
 Klug A. 50
Kluyveromyces lactis 442, 456
 knock-out genowy, p. rozbicie genu
 Knudson 403

- koacerwaty 413
kod genetyczny 135*
– –, ewolucja 418
– –, uniwersalność 147, 148, 418
– –, odstępstwa 144–146, 418
kodon(y) 134, 137, 150
– *amber* 136, 151, 152
– inicjacyjny 135*, 140, 141
– mitochondrialne 144*, 145*
– nonsensowny 241
– *ochre* 136, 147
– *opal* 136
– terminacyjny 135*, 140, 219
– – „przeciekający” 154
kointegracja 459
kointegrat 275, 276
kolagenaza IV 387
komórki B, p. limfocyty B
– fagocytarne 323
– folikularne, p. komórki pęcherzykowe
– hybrydowe 342
– Leydiga 315
– –, inwazyjność 387, 407, 410
– –, mobilność 387
– odpornościowe 323
– pęcherzykowe 315*, 316
– plazmatyczne 324, 328, 330*, 331, 336, 376
– pnia 293, 305, 331
– prapłciowe 315, 316
– Sertoliego 315
– sterydogenne 316
– T, p. limfocyty T
– tuczne 328
komórkowe geny *onc*, p. protoonkogeny
kompartamentacja 419
kompetencja 33
kompleks *Antennapedia (ANT-C)* 299, 301, 304*
– antygen – przeciwciało 340
– *bithorax (BX-C)* 299–301, 304*
– *HOX* 303, 304*, 306
– ORC 87
– Rec BCD 264
– rybosomowy 140
komplementacja 26*, 27
– wewnętrzna 29
– α 163
koniugacja bakteryjna 29, 30–32, 263, 457
– – przerywana 31*, 32
– chromosomów 317
konstytucja genetyczna 390
kontrola negatywna 207, 209
– pozytywna 209, 223
kontrolowana samodestrukcja komórek, p. apoptoza
konwersja genów, p. gen(y)
kosmidy 167*, 168, 188
kostniakomięsak 290, 404, 405
kotransdukcja 33, 35
kotransformacja 33
kręgowce 285, 303
kroczenie wzdłuż chromosomu (p. też wędrówka po chromosomie) 318
kryminalistyka 183
krzyżowa oporność roślin 463
krzyżowanie wsobne 16
krzyżówka(i) odwrotne 36
– testowa 21, 22
– trzypunktowa 22
– wsteczna 18
kukurydza 306
–, rRNA 142, 432
–, transpozony 271, 272
kura 303
kumermycyna 105*
kwas nalidyksynowy (NAL) 105*
– oksolinowy (OXO) 105*
– retinowy 286
– tetrahydrofoliowy 342
kwaśna fosfataza 199

Lactobacillus 442
Lagerkvist 145, 146
lagging strand (ang.), p. widelki replikacyjne, nić opóźniona
 β -laktamaza 273
laktotransferyna 469
laktoza 201–203
laminy 125
lariat 238*
leading strand (ang.), p. widelki replikacyjne, nić prowadząca
Lederberg J. 30
Leishmania 240*, 241
leki 453–456
– pochodzenia rekombinacyjnego 441
– przeciwnowotworowe 43
leming 320
lepkie końce 159*, 160, 185
– – *cos* 165
leucine zippers (ang.), p. suwaki leucynowe
leukocyty 373*
ligacja 157, 185, 189*
ligaza(y) DNA 100, 158, 253, 268,
– – bakteryjne 101, 264

- ligaza(y) DNA eukariotyczne 101
 – – fagów T4 i T7 101
 – – polinukleotydowe 101
 – RNA 242
 limfocyty 323, 292, 335
 – B 323, 324*, 328, 330, 331, 333, 335*, 351, 353, 354, 362, 364, 366, 372, 373*, 374, 403
 – –, aktywacja 375*, 376
 – –, autotolerancja 381, 382
 – –, czapeczka 374
 – –, dojrzewanie i różnicowanie 329*, 344, 348
 – –, proliferacja 374
 – T 323, 324*, 333, 335*, 351, 355–364, 372, 373*, 375, 382
 – – pomocnicze (T_H) 324*, 333, 334*, 356, 362, 366
 – – –, autostymulacja 374
 – – –, funkcje 366
 – – – cytolityczne (T_C) 333, 334*, 356, 362, 364
 – – –, aktywacja 374
 – – –, prekursorzy 370
 – – –, selekcja w grasicy 371
 limfokiny 323, 372, 380
 limfotoksyna LT 362, 373
 –, geny 370
 linker DNA (ang.), p. łącznik
 lipopolisacharyd (LPS) 376
 liposomy 450, 451, 461
 liza 324*, 327, 333, 361, 362
 lizozym 381, 443
 locus *vir* 457
 long terminal repeats (ang.), p. sekwencje LTR
 loss of heterozygoty (ang.), p. utrata heterozygotyczności
 LPS, p. lipopolisacharyd
 LTR, p. sekwencje LTR oraz p. długie terminalne powtórzenia
 lucyferaza 460
 Lwoff A. 201
 łańcuchy przeciwciał lekkie (L) 325, 326, 336, 338, 347*, 349
 – – – typu λ 331, 337, 344, 349
 – – – typu χ 331, 337, 344, 345*, 349
 – – ciężkie (H) 325, 326, 337, 338, 347*, 349, 376
 – – – J 327
 – – –, domeny stałe i zmienne 337*, 338
 – – –, przegrupowania genu 379
 – – –, rejon nadzmienny (CDR) 337*, 340*, 341*
 – – –, synteza 348*
 – – – typu α, δ, ε, γ, μ 331
 – – –, typy 327*, 379
 łącznik 119, 121, 124
 łożysko 286
 łysinki 177, 189
 MacCarty M. 23
 MacFarlane Burnet F. 330
 MacLeod C.M. 23
 Maizels 417
 makrofagi 323, 327, 328, 333, 334, 335, 362, 363, 366, 373, 375, 376
 –, aktywacja 374
 makronukleus 122, 281
 mapa genetyczna 22, 31, 67
 – restrykcyjna 160, 161, 163*, 190
 – – *pBR322* 165*
 – – *pUC19* 166*
 mapowanie genów 31*–33
 MAR (ang. matrix associated regions) 125, 127
 Margulis L. 436
 marker 161
 – selekcyjny 184
 matriks jądrowa 125, 127
 maturaza 430
 maxicircles (ang.) 241
 minicircles (ang.) 241
 McClintok B. 272
 mechanizm(y) epigenetyczne 387
 – insercji promotora 394
 – kompensacyjny 308, 310, 311, 313
 – neodarwinowskie 436
 mejoza 23, 126, 250, 261
 Mendel G. 16, 19
 –, prawo I 18, 35
 –, – II 18, 19, 35
 Messing J. 166
 metalotioneina 467
 metanogeny 422*, 425*
 metanosulfonian etylowy (EMS) 259
 – metylowy (MMS) 259
 metastaza, p. przerzut
Methanobacterium formicum 422*
Methanococcus vanelii 422*
Methanospirillum hungatei 422*
 metotretksat 459
 metylacja cytozyny 130
 – DNA 130, 205, 288, 289, 314
 – histonów 118
 metylaza(y) 159, 253*, 254
 – Dam 70, 71*
 3-metyloadeninoglikozydaza 249*
 5-metylocytozyna 255, 256*

- 7-metyloguanozyna 141
mezoderma 285, 306
MHC, p. główny układ zgodności tkankowej
micF, p. RNA
miejsca AP 255, 259, 260
– *attB* 269, 270*
– *attP* 269, 270*
– *nut* 223*, 224
– *rbs* 218*
– restrykcyjne 459
– *rut* 218, 219
mięczaki 283, 285
mięśaki 389
migdałki 335
 β -mikroglobulina 369
mikroiniekcje 461
– DNA 172
mikroskamieliny 413
mikrotubule 126
Miller 413
mioblasty 450
mitochondria, pochodzenie endosymbiotyczne
423–425, 436
– redagowanie RNA 241
–, rRNA 142
mitochondrialna Ewa 435
mitogen 388
mitorybosomy 143
mitoza 126
mobilność, p. komórki nowotworowe
model solenoidu 124
– Wezuwiusza 433
modulator(y) systemu immunologicznego 453
modyfikacje potranslacyjne białek 439, 443
molekularne skamieliny 417, 421
monocyty 334, 335
Monod J. 201
monooksygenaza 2,4-dichlorofenoksyoctanu
462
– tryptofanowa 457
monosom 140, 141
morfogen(y) 286, 296
morfogeneza, kontrola genetyczna 290
Morgan T. 19, 21, 22, 261
motywy immunoglobulinowe 337
mouse mammary tumor virus (ang.), p. wirus
MMTV
muchówki 281, 283
mukowiscydoza 190, 540, 451, 452, 468
Muller H.J. 257
Mus musculus 63*
muszka owocowa, p. *Drosophila melanogaster*
mutacja(e) 20, 25, 59, 436
– *Antennapedia (Antp)* 293
– antymutatorowe 252
– *bithorax (bx)* 293
– chromosomalne 387
–, częstość 248, 269
– delecyjne 216
– heterochroniczne 292
– homeotyczne 293
– indukowane 257–259
– missens 218, 418
– mutatorowe 252
– nonsens 189*, 190, 219
–, polarność 219*
– prezygotyczna 404
– punktowe 151, 216, 240, 250–253, 264, 380,
384, 396
– rozwojowe 202, 293
– somatyczne genów immunoglobulin, p. im-
munoglobuliny, geny
– spontaniczne 255, 380, 409
– w procesie nowotworzenia 391
– wsteczne 250
mutagen(y) 257
– chemiczne 259, 260
– fizyczne 257
mutanty alleliczne 26
– auksotroficzne, p. pokarmowe
– *dna* 67
– homeotyczne 306
– homozygotyczne 306
– pokarmowe 24, 260
– „quick stop” 67
– „slow stop” 67
muteiny 439, 455, 471
mutageneza 381
– indukowana 259
– *in vitro* 423
– kierunkowa, p. ukierunkowana
– spontaniczna 251, 252
– sterowana 187
– ukierunkowana 152, 221, 168, 183–188
mutator 187*
Mycoplasma 418, 419*
myeloma, p. szpiczak
Myopus schisticolor 320
mysz(y) 303–305, 315,
– bezgrasicza 391
–, genom 433
– naga, p. mysz bezgrasicza
–, sekwencjonowanie 181
– transgeniczne 185, 288, 341, 371, 372*, 381,
450, 466
– – znokautowane 467

Myxococcus xanthus 225

- nadwrażliwość typu wczesnego 328
napięcia torsyjne 113–117, 127, 133
naprawa DNA (p. też reperacja) 55, 92, 99
– mutagenna 99
– poreplikacyjna 435
neodarwinizm 412, 413
neomycyna 305, 458, 472
neurofibromatoza 404
neurony dopaminergiczne 291, 292*
neutrofile 373*
nici „cofnięte” 186
niczenie 285
nick translation (ang.) 92, 93*, 99, 174, 175*
nić opóźniona 97
– prowadząca 97
niedobór immunologiczny ciężki złożony (SCID) 371
– odporności 468
nieśmiertelność komórki 389
Niremburg M.W. 135
nitrogenaza 214
nondysjunkcja 404
nopaliny 457, 558
northern, p. hybrydyzacja
nosiciel HBV 445
nowobiocyna 105*
nowotwór(y) (p. też raki) 389, 390, 468
–, etiologia 388, 389
– nadnerczy 404
– nerki 406
– nosogardzieli 389
– przysadki 404
– przytarczyc 404
– trzustki 404
– Wilmsa 290
– złośliwe 385, 403, 406
– –, cechy charakterystyczne 385
nukleaza(y) 44, 56, 108, 128, 461
– *Micococcus* 119, 121
– restrykcyjne 44
– S1 185, 186*
nukleoplazmina 127
nukleosom 41, 44, 48, 50, 53, 55, 57, 97, 100, 119–123, 129
–, formowanie 127*
–, pozycjonowanie 51, 53
–, rdzeń 119–121, 129*
– *S. cerevisiae* 122
numeratorzy 310
- Ochoa S. 135
- „oczko” replikacyjne (p. też widełki replikacyjne) 61, 65, 66*
odcisk stopy, p. technika „odcisk stopy”
oddychanie tlenowe 423, 425
odpowiedź immunologiczna 323, 365, 372, 380
– – humoralna 323, 324*, 333
– – komórkowa 323, 324*, 333
– – pierwotna 323, 324*, 333
– – wtórna 332*, 376, 381
– stresowa 198, 199
– ścisła 197
odróżnicowanie tkanek 282
odwrotna transkrypcja 225, 271*, 277*, 420*
– – mRNA 278
– transkryptaza 159, 171, 276–278, 382–384, 392, 394
odwrócone powtórzenia 272
oksydaza glukozy 443, 471
– nadtlenkowa 467
oktopiny 457
olej krotonowy 386
onkogen(y) (*v-onc*) 191, 395, 396
– *bcl-2* 402, 403
– *myc* 406
– *ras* 406
– retrowirusów 233
– *v-scr* 394
onkogeneza 468
oocyt 283, 286, 296, 315, 316, 446, 469
oogeneza 313, 314
Oparin A. 413
– teoria 414
operon(y) 439,
– *ara* 208
– biosyntezy cysteiny 194
– biosyntezy tryptofanu 205–207, 220*, 445,
– fermentacji arabinozy 194
– fermentacji melibiozy 194
– *gal* 208, 273
– *glnALG* 212
– kataboliczne 209
– laktozowy 201–205, 208, 256
– *nif* 212–214
– *ntr* 210
– *trp*, p. operon biosyntezy tryptofanu
opiny 457
organelle komórkowe 423
organizmy transgeniczne 279, 439, 456
Orgel L. 434, 435
oriH 73, 74
ori wirusów Papova 85
origin recognition complex (ORC) (ang.), p. kompleks ORC

- origin recognition element (ang.), p. sekwencje
ORE
 orzęski 281, 415
 —, odstępstwa od uniwersalności kodu 418, 419
 osobniki aneuploidalne 314
 — transgeniczne 312
 osteosarkoma (*osteosarcoma*), p. kostniako-
 mięsak
 — faga λ 167*, 168
 — wirusa HIV 382, 283*
 „otwarte okna” chromatyny, p. chromatyna,
 miejsca nadwrażliwe na nukleazy
 ootestis 321
 owady 283
Oxytricha nova 107, 422*
- packing ratio (ang.), p. współczynnik upa-
 kowania
 pair-rule genes (ang.) 298
 palce cynkowe 233*, 302, 307, 318
 pamięć immunologiczna 332, 381
 papaina 227*
 papilloma (ang.), p. brodawczak
 paradoks zawartości DNA 432
 paradygmat biologii molekularnej 146
Paramecium 82, 107, 419*
 paramyksowirus 241
 parasegment(y) 297–300
 partenogeneza 286
 pary typu Hoogsteena 42–44
 — — Watsona–Cricka 42–44
 pasożyty jelitowe 380
 — skóry 380
 patenty 453
 PCR p. reakcja łańcuchowa polimerazy
 penicylina 273
 permeaza β -galaktozydów, p. β -galaktozydo-
 permeaza
 pestycydy 464
 petunia 459, 460, 465
Photobacter leiognathi 436
Physarum 107, 228, 241
 — *polycephalum* 148
Pichia pastoris 443
 pili 457
 — płciowe 31
 pierścienice 285, 303, 307
 pierwotne komórki zarodkowe (ES) 465
 pikornawirusy 113
Pisum sativum 63*
 plazmid(y) 27, 30, 36, 65, 157, 161, 273
 — *pAra4a* 459
 — *pBR322* 79, 163, 446*, 447*, 458
 — —, mapa restrykcyjna 165
 — *ColEI* 66, 73 163
 — drożdży 87
 — — 2μ 36
 — *F* 68*
 —, formy 163*
 — *pMA56* 446*
 — *pMSO2* 162*, 163*
 — *pRK2* 459
 — *pTiB6S3* 458
 — *pUC* 162, 163
 — *pVSI* 459
 — *Ri* 457
 — *Ti* 457, 459
 plazmina 454, 455
 plazminogen 454, 455
 płasowica Huntingtona 453
 płazy 283
 płeć somatyczna 309, 312, 313
 płytki krwi 454*
 podwzgórze 373*
 podział komórkowy niesymetryczny 293
 — — symetryczny 292
 pokolenie F_1 16, 17*, 36, 381
 — F_2 16, 36
 pokrzywka 328
 poliadenylacja 243 245, 349, 378, 379
 poliaminy 113
 policistron 201
 polilinker 163, 165, 166, 168, 169, 443, 458*
 poli-L-ornityna 460
 polimeraza(y) DNA 60, 65, 66, 81, 82, 89,
90–99, 352
 — bakteryjne 90*
 — I 73, 76, 79, 80, 90*, **91–92**, 174, 180*,
 195*, 253*, 255, 258, 264, 267, 268
 — — II 90*, **92–93**
 — — III 73, 80, 90*, **93*–97**, 252, 258, 267,
 — eukariotyczne 97–99
 — — α 86, 97, 99, 102, 406
 — — β 98, 100*
 — — δ 97, 99, 100, 102
 — — ϵ 97, 99, 102
 — — γ 74, 98
 — termostabilna 182, 183*
 — zależna od RNA, p. odwrotna transkryp-
 taza
 polimeraza(y) RNA 44, 66*, 76, 116, 117, 129,
 155, 204*, 215, 218, 223, 419
 — — eukariotyczne I 226, 227, **228**, 230,
 — — — II 226, 227, **230**, **231**, 243
 — — — III 226, 227, **228–230**
 — — człowieka 433

- polimeraza(y) RNA eukariotyczne owadów 415
- poliA 244
 - prokariotyczna 192, **193–196**
 - – podjednostki 193–195*
 - – faga T3 195
 - – faga T7 195
- polimorfizm miejsc restrykcyjnych (RFLP) 435
- restrykcyjny 448, 449, 452
- polipowatość jelita grubego 406
- polisacharydy pneumokoków 376
- politenizacja 283
- poliubikwityna 247
- polymerase stuttering (ang.) 241
- pory jądrowe 127
- poślizg polimerazy DNA III 254
- praorganizm, p. progenota
- prawa Mendla, p. Mendel
- prawo czystości gamet, p. Mendel
- niezależnej segregacji cech, p. Mendel
- prebiałka 443
- predyspozycje genetyczne 388, 390
- pre-rRNA 228, 239
- presja selekcyjna 442
- prezentacja antygeny 355, 356, 360, 363, 366, 375, 376, 445
- primaza 64, 69, 75*–78, 85, 90
- DnaG 70
 - eukariotyczna 97, 100*
- primosom 64, 76, 77*, 79*, 102
- , białka 70
- primosome assembly site (ang.) 78
- proces nowotworowy 386
- –, indukcja 386, 389, 411
 - –, promocja 386, 411
 - –, progresja 386, 387, 411
 - zapalny 373*
- prochloroplasty 425
- proeukariont 425
- profag 34, 269, 270*
- profaza mejotyczna 23, 314, 316
- proflawina 260
- progenota 412, 414, **419**, 420*, 425*, 430, 437
- progresja, p. proces nowotworowy
- projekt sekwencjonowania i mapowania genu człowieka 169
- Prokaryota* 192, 439
- , ewolucja 420*
- proliferaacja komórek 398, 399
- proliferating cell nuclear antigen (ang.), p. białko PCNA
- promieniowanie jonizujące 257
- rentgenowskie (X) 251, 391
 - ultrafioletowe (UV) 34, 56, 199, 257, 258, 282, 391
- promiscuous DNA, p. DNA swobodny
- promitochondria 425
- promotor(y) eukariotyczne 87, 229*, 445
- genów chloroplastowych 423
 - prokariotyczne 67, 186, 193–195, **196–198**, 200, 209, 423
- prostaglandyny 373*
- proteaza 277, 278
- serynowa 454
 - –, rodzina 427
- proteoliza 440
- proteosom 247
- protoonkogen(y) (*c-onc*) 246, 395, 396, 411
- , aktywacja 396
 - *c-abl* 399
 - *c-myc* 396, 468
 - *c-raf* 398
 - *c-ras* 406, 468
 - *c-src* 399
 - , przekształcanie w onkogeny 396
- protoplasty 459–461
- protoplastyzacja 172
- prototoksyna *Bacillus thuringiensis* 463
- protrombina 454*
- provirus 170, 171, 276, 278, 382, 384*, 392, 393*–395
- przeciwciała (p. też immunoglobuliny) 323, 324*, 325*, 366
- , dojrzewanie powinowactwa 332
 - , domeny 347
 - , klasy 327*
 - , mechanizmy wytwarzania 330
 - membranowe 380
 - monoklonalne 336, **342–343**, 441, 450, 455
 - –, wytwarzanie 343*
 - , struktura 336, 337*, 380
 - , rejony nadzmiennie 337*, 347, 352, 380
 - , rejony zmienne 337*, 340, 344, 380
 - transgeniczne 381
 - wczesne 327
 - , wiązanie determinant antygenowych 325*
 - wtórne 379, 380
 - , wydzielanie 376, 380
- przedjądrze 287, 288, 465, 467
- przegrupowania wewnętrzne 440
- przełączanie izotypów 360, 379
- przerzywniki 196*, 431, 434
- przerzuty 386–388, 407–410
- przeźreń peryplazmatyczna 442
- przesuwanie rozgałęzienia 264
- przeszczepy, odrzucanie 364, 365

- pseudogeny 146, 365, 421, 434,
 – γ -aktyny 433
 – globinowe 433
 – 5S rRNA 431
Pseudomonas 442, 459
 – *syringae* 199
 – *testosteroni* 422*
 PSTV, p. wiroid PSTV
 pszenica 143
 ptaki 286
 Ptashne 234
 puzy 284
- rak genomów 435
 rak(i) 389, 452
 – gruczołu krokowego 452
 – jajnika 404
 – jelita grubego 404
 – kości 290
 – nerek 404, 407
 – odbytu 406
 – okrężnicy 404, 406
 – pęcherza 404
 – płuc 404, 406, 407, 450, 452
 – skóry 259, 386
 – sutka 390, 403–406, 450
 – szyjki macicy 389
 – trzustki 452
 – wątroby 389
 ramka odczytu 146
 – otwarta 147, 148, 181, 190, 312, 320
 –, zmiana 95, 251, 260, 349, 351, 359
 reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) **182**,
183, 190, 429, 448
 reakcja SOS 249*
 – transestryfikacji, p. redagowanie, modele
 rearanżacje chromosomów 410
 receptor(y) CD4 356, 363, 369, 371*, 382, 283
 – CD8 356, 363, 369, 371*
 – czynników wzrostu 398
 – glukokortykoidów 53
 – lipoproteiny niskiej gęstości 428
 – TCR 333, 336, 355–364, 366, 370, 371,
 374, 382
 – –, budowa 356*, 357
 – –, organizacja genów 357*, 358
 – –, źródła różnorodności 358–360
 – tyroksyny 400
 redagowanie transkryptów **146–148**, 240–243
 – –, modele 242, 243
 region pseudoautosomowy 316, 317*, 319
 regiony regulatorowe 300*
 regulacja autokrynną wzrostu 403
 – azotowa 210–215
 – katabolizmu galaktozy 234
 – negatywna, p. kontrola negatywna
 – podziałów komórkowych 400
 – rozwoju ssaków 280
 regulator pozytywny 207
 regulon cAMP–CAP 210
 – *ntr* 212
 – stresu cieplnego 198
 reguły Watsona–Cricka 136, 140
 rekombinacja 25, 249, 250, 261, 351
 – homologiczna (uprawniona) 172, 249,
261–263, 272, 274*, 275, 278, 305, 447,
 458, 467
 – *in vitro* 438, 440
 –, jednostki 22
 – nieuprawniona 272
 – somatyczna genów immunoglobulin, p. im-
 munoglobuliny, geny
 –, udział w reoperacji 267, 268
 – u roślin 464, 465
 – wewnątrzgenowa 25, 27
 – wzajemna 274*
 – zlokalizowana 269
 rekombinazy 350*, 351, 358
 reoperacja przez rekombinację 267, 268
 – przez wycinanie 253, 255, 258, 259, 265, 267
 –, system SOS 268, 269
 replikacja DNA 25, 55, 58
 – adenowirusa 82
 – asymetryczna 66
 –, białka inicjatorowe 61
 –, –wspomagające **101–105**
 –, elongacja 89
 –, inicjacja 62, 65, 66, 68*, 131
 –, –eukariotyczna 84*, 88
 –, –faga λ 71–73
 –, mitochondrialny DNA 65, 66
 –, model obracającego się koła 65, 66*
 –, model przemieszczającej się pętli (typ Θ)
 65, 66*
 –, model Watsona i Cricka 60
 –, mutanty 66, 67
 –, „origin” 61, 62*, 65–67, 109
 – plazmidu *ColEI* 66
 –, startery 82
 –, terminacja 62*, 65, **105–109**
 replikacja wirusa Polio 84
 – wirusa SV40 84
 replikaza(y) DNA 90, 91, 97, 417, 419
 replikon(y) 62, 459
 – liniowe 81, 84
 –, wielkość 63

- replisom 64, 90, 99, 100
 represja **200, 201**
 – glukozowa, p. represja kataboliczna
 – kataboliczna 207–210
 – operonu biosyntezy tryptofanu 205–207
 represor 51–53, 207, 284, 434
 – laktozowy (Lac) 118, 202–204
 – LexA 268
 – tryptofanowy 52, 205
 – λ 54
 resolucja 276
 –, odcinek 273*
 resolwaza 57, 273, 275
 restrykcja cytolityczna 361
 restryktazy, p. enzymy restrykcyjne
 retardation assay (ang.), p. test spowolnienia migracji w żelu
 retikulum endoplazmatyczne (siateczka śródplazmatyczna) 376
 retinoblastoma, p. siatkówczak oka
 retinoidy 387
 retropseudogeny 433
 retrotranspozony(y) 271*, 276, 433
 – *cial* 279
 – *copia* 271*, 278
 – *TAP* 279
 – *Ty* 271*, 278, 279
 retrotranspozycja 433
 retrowirusy 169, 245, 276–278, 382, 389, 391, 392
 –, cykl życiowy 392, 393*
 – HTLVI, HTLVII, HIV 171
 –, integracja DNA 277*
 –, jako wektory 443, 451, 452
 – onkogenne 394
 rewersja ekstragenowa 151
 rewertaza, p. odwrotna transkryptaza
rhabdosarcoma 290
Rhizobiaceae 457
Rhizobium 212, 424, 457
 ribosome binding site (ang.), p. miejsce *rbs*
 RNA 119, 414
 – I i II 73
 – antysensowny 224, 294, 463
 – eukariotyczny 141
 –, funkcje biologiczne 415*
 –, – katalityczne 415
 – hn 235, 237
 –, mRNA 134, 415*
 –, –, obróbka 168
 –, –, okres półtrwania 246
 –, –, pre mRNA 146, 147
 –, –, redagowanie 146, **147–148**
 –, –, składanie 349, 359*, 377*–379*
 –, – snRNA 228, 230, 237, 244, 415
 –, –, stabilność 246
 –, – starterowy 64, 69, 70, 92, 97, 107
 –, rRNA 25, 141, **142–143**, 228, 415*, 421, 422
 –, –, organizacja genów 228*
 –, tRNA 25, 136, **149–155**
 –, –, aminoacylacja 150
 –, –, dojrzewanie 149
 –, – eukariotyczny 227
 –, – izoakceptorowy 136, 145
 –, –, pętla 149
 –, –, ramiona 149, 152
 –, –, struktura trzeciorzędowa 149
 –, – supresorowy 151, 152
 RNaza 277, 278
 – H 73, 74, 92
 – P 415
 rodniki hydroksylowe 40, 41*
 rodzina(y) Alu 433
 – genów 346
 – Li–Fraumeni 405
 – wielogenowe 430–432
 rogowacenie białe śluzówek 387
 rośliny, odróżnicowanie tkanek 282
 –, poliadenylacja 243
 – transgeniczne **457–465**, 472
 –, –, oporność na choroby wirusowe 463
 –, –, oporność na owady 463, 464
 –, –, przykłady 462
 –, –, tolerancja na herbicydy 462
 rozbicie genu 184
 rozedma płuc 452
 rozrost, p. hiperplazja
 rozwój mozaikowy 285
 różnicowanie 280, 281
 – komórkowe 402
Rubella 474
 ruchome elementy, p. transpozony
 rybonukleaza 215
 rybonukleoproteiny (RNP) 418
 rybosomy 136, 153
 –, białka 143, 144
 – chloroplastowe 423, 424
 – eukariotyczne 141
 –, podjednostki 137, 140
 – prokariotyczne 423, 424
 –, struktura 141, 142
 rybosomowa syntetaza peptydylotRNA 138
 rybozylacja histonów 118
 rybozomy 415, 416, 418, 429
 ryby transgeniczne 469, 470

- ryfampicyna 196
 rzodkiewnik, p. *Arabidopsis*
- Saccharomyces cerevisiae* 36, 63, 419*, 422, 429, 442, 443, 445, 471
 – —, białka rybosomalne 144*
 – —, introny 433
 – —, nukleosomy 122
 – —, poliadenylacja 242
 – —, rRNA mitochondrialny 142
 – —, sekwencjonowanie 181
 – —, telomery 107
- Salmonella typhimurium*, asymilacja NH₃ 199, 210
 – —, biosynteza histydyny 24*
 – —, test Amesa 260
- Sanger F. 203, 420
 Sapienza C. 434
 Schimmel 152
Schizosaccharomyces pombe 320, 442
- SCID, p. niedobór immunologiczny ciężki złożony
- sekrecja białek 443
- sekwencja(e) Alu 433, 434
 – antysensowne 462
 – ARS 87, 88*
 – *cos* 165, 167*, 168
 – CpG 285
 – DUE 84
 – enhancerowe (p. też enhancery) 85
 – insercyjne (IS) 272, 273
 – intronowe 168
 – kanoniczna 196, 209
 – LTR 171, 382, 383*, 392–394, 396
 – najwyższej zgodności 196
 – ORE 84
 – *ori* 161, 168
 – osłabiające transkrypcję p. silencery
 – palindromowa 131, 160, 204–206, 208, 212*, 216
 – *Pax* 302
 – powtarzające się 432, 457, 465
 – Pribnowa 196
 – promotorowe 131
 – przerywnikowe p. przerywniki
 – regulatorowe 299
 – *res* 276
 – Shine–Dalgarno 455
 – stykowe intron–egzon 182
 – TATA 49, 230, 231*, 235, 254
 – TATAAT, p. sekwencja Pribnowa
 – telomerowe, p. telomery
 – *ter* 105
 – UAS 235
 – uniwersalne rRNA 143
 – wspomagające 84*, 85
 – wiążąca IHF 214
 – wiążące białka 181–182
- sekwencjonowanie DNA 168, 178, 203, 420, 435
 – genomu człowieka 421
 – genomu drożdży 421
 – metoda Maxama i Gilberta 178
 – metoda Sangera 179, 180
- selekcja klonalna w produkcji przeciwciał 330, 331, 336, 349, 378
 – wewnątrzgenomowa 434
- selfish DNA (ang.), p. DNA samolubny
- senescence genes (ang.), p. geny kontrolujące liczbę podziałów komórek
- Serratia* 442
- seryna 82
- siatkówczak oka 390, 403–406, 468
- silencer(y) (sekwencje osłabiające transkrypcję) 131, 232, 354*, 355
- single strand binding proteins (ang.), p. białka SSB
- sklerotom 303
- składanie genów 415
 – RNA 236
 – transkryptu 227
- skoki po chromosomie 188
- skorupiaki 281, 283
- skrzep krwi 454*, 455
- soja 463, 465
- solenoid 124, 128
- sonda molekularna 174, 178, 188, 190, 448, 452, 473
 – —, cDNA 294
 – —, hybrydyzacja 303
 – — transpozonowa 279
- SOS, p. reakcja SOS, reperacja SOS i system SOS
- Southern E. 174
- southern, p. hybrydyzacja
- spacers (ang.), p. przerywniki
- spaghetti-like model (ang.) 125
- spektynomycyna 458
- spermatogeneza 313–316
- spermatogonia 315
- spirochety 425*
- spliceosom 237, 239*, 240*, 415
- splicing (ang.), p. składanie RNA
 – alternatywny 240, 245
- sporulacja 198
- sprzężenie między genami 33

- sprzężenie zwrotne dodatnie 203, 301
 – – ujemne 206
 ssaki 243, 286, 308, 419*
 stacking (ang.) 45
 stany przedrakowe 386
Staphylococcus aureus 474
 starter(y) 182, 183*
 stawonogi 285
Streptococcus 454, 474
 streptokinaza 443, 454
 streptolydigena 194
Streptomyces 442
 streptomycyna 152, 153, 458
 stres cieplny, p. szok cieplny
 Struhl K. 234
 struktura *cap* 141
 – heliks–skręt–heliks 301, 355, 400
 – liścia koniczyny 149
 – palindromowa 86
 – „szpilki do włosów” 64, 75, 76, 78, 82, 108, 141, 216, 217*, 221, 223*
 strunowce 303
Styela 285
Stylonychia 107
 – *mytilus* 133
 substytucje nukleotydowe 421, 423, 435
Sulfolobus sulfataricus 422*
 sulfometylomocznik 462
 superheliks DNA 54, 56, 57, 104, 111, 114*, 115, 197
 – dodatni 114, 129
 – lewoskrętny 50, 68
 –, liczba opleceń (Lk) 57, 58
 –, – skrętów (Tw) 56–58
 –, – zwojów (Wr) 56, 58
 –, relaksowanie 105
 –, skręty ujemne 115*, 116
 – ujemny 114, 129
 superowulacja 466
 supresja 218, 349
 – fenotypowa 152
 supresor 190
 – nowotworów 290
 suwaki leucynowe 233, 234*, 400, 408
 symbionty 423
 syndrom SCID 351
 syntaza glutaminianu 211
 syntetaza aminoacylo-tRNA 149, 151, 155
 – antranilowa 220*
 – glutaminy 211–213*
 – indoglicerofosforanu 220
 – tryptofanowa 220
 – tymidylanowa 225
 system dopełniacza 327, 328, 340
 – –, geny 365*, 370
 – MAT 302
 – Nif 212
 – regulacyjny Cer 210
 – SOS (p. też reakcja SOS i reperacja SOS) 268, 269
 szczepionka 444–448
 – poliwalencyjna 446, 447
 – przeciw HIV 384
 – przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby 445–448
 – – – – rekombinacyjna 442
 – przeciw wścieklicznie 474
 szkarłupnie 283
 szok chemiczny 198
 – cieplny 198, 199
 Szostak J. 416
 szpiczak 336, 344, 345*, 355
 szpik kostny 293, 324, 328, 342, 353, 370, 373*, 374
 sztuczny chromosom drożdżowy (YAC) 169, 453
 śmieci molekularne 434
 śwynie transgeniczne 456
 talasemia 449, 468
 tandem repeats (ang.) 431
 tarcza imaginalna 301
 Tarkowski A.K. 286
 TATA box (ang.), p. sekwencja TATA
 TBP (ang. TATA binding protein) 231
 technika PCR, p. reakcja łańcuchowa polimerazy
 – „odcisk stopy” 181
 telomer(y) 82, 106–109, 126, 169, 365
 –, funkcje 107
 telomeraza 107–109*, 126, 415*
 terapia chorób 441
 – *ex vivo* 452
 – genowa, somatyczna 171, 439, 450–453
 terminalna urydylotransferaza 242
 terminalne powtórzenia δ 278
 terminator(y) transkrypcji 215, 216, 220, 223
 – – operonów 216
 – –, struktura 217*
 – – wewnętrzne 216, 218, 219
 termoacidofile 422*, 425*
 test(y) Ames 260
 – diagnostyczne, molekularne 448–450
 – Guthriego 448
 – komplementacji 203, 204

- test(y) na alleliczność (na komplementację) 26, 27
- rewersji fenotypu nowotworowego 392
 - spowolnienia migracji w żelu 182
- testosteron 315, 321
- tetracyklina 273
- Tetrahymena* 107, 228, 415
- *thermophila* 122, 236
- tępe końce 159*, 160
- Thermoproteus tenax* 422*
- tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) 449, 454, 455, 469
- TNF, p. cytokiny
- toksyna(y) białkowe 450
- cholery 448
 - dyfterytu 448
 - tężca 448
- topnienie DNA 193
- topoizomeraza(y) 41, 56, 89, **103–105**, 127, 131
- I 116, 117, 197
 - II 125
 - NFII 83*
- torebka pęcherzyków jajnikowych 315*, 316
- Toxoplasma* 474
- t-PA, p. tkankowy aktywator plazminogenu
- „trans”, p. układ *trans*
- transacetylaza galaktozydowa 201
- transdukcja 29, **33–35**, 157, 263, 396
- ogólna 32*
 - ograniczona 33, 34*, 35
- transfekcja 170*, **172**, 406, 447*, 451, 452
- roślin 460–462
- transfer koniugacyjny plazmidu 457
- transferaza deoksyrybonukleotydowa 352
- izopentylu 457
 - peptydylowa 415
- transformacja 157
- bakteryjna 23, 29, **33**, 163, 172, 263
 - drożdży 168
 - nowotworowa 342, 389, 390, 395, 406, 408, 410
 - roślin 458
- transgen(y) 349, 456, 462, 467
- , poziom ekspresji 467
- transgenizacja 169
- zwierząt hodowlanych 468–470
- transgenom 172
- transient expression (ang.), p. przejściowa ekspresja
- transkoniuganty 458
- transkrypcja 55, 58, 65
- , aktywatory 44, 82
 - , antyterminacja 220, **222–224**
 - , atenuacja 205, 216, **220–222**
 - , elongacja 193, 195*
 - , inicjacja 49, 52, 193–195*, 197, 207, 216, 222
 - , –poronna 193
 - , preinicjacja 53
 - prokariotyczna 192, 197
 - , represory 44, 117
 - , sekwencje promotorowe 65
 - , terminacja 131, 193, **215, 216**, 221, 244
- translacja 134, **137–141**
- bakteryjna 138*, 139*
 - , częstość błędów 154, 155
 - , dwuznaczność 152–155
 - eukariotyczna 141
 - –, inicjacja 141, 205, 207, 345
- translokacja(e) 20, 318, 396, 400, 403, 410
- chromosomowe 288, 290
- transmisja sygnału mitogennego 398, 401*, 407
- transpozaza 271–273*, 279
- transpozon(y) 23, 250, **270–276**, 434
- bakteryjne 272–276
 - typu *Tn* 273–276
- transpozycja 250, 251, 256, 271, 274
- replikatywna 276
- transwersja 251*, 252
- treonina 82
- trinitrofenol 325
- trofoblast 286, 287
- trombina 427, 454*
- tromboliza 454*
- Trypanosoma* 50
- *brucei* 148, 422*
 - , redagowanie RNA 148, 240*, 241
 - , rRNA mitochondrialny 142
 - , telomery 107
- tryplet, p. kodon
- Tschermak W. 19
- β -tubulina 246
- TUTaza, p. terminalna urydylotransferaza
- twintron (ang.), p. intron bliźniaczy
- tymina 38*, 42, 49
- tymiwirusy 113
- tymocyty 370
- tymozyna 82
- tytoń 459–461, 465
- ubikwitynacja histonów 118, 246
- układ limfatyczny 335
- *cis* 26, 27, 204, 213, 224
 - *trans* 26, 27, 203, 204, 213
- unikatowe sekwencje rRNA 473
- urokinaza świni 427, 454

- urydylotransferaza 211
 ustalenie ojcostwa 183
 utrata heterozygotyczności 404
- Varmus H.E.. 395
 de Vries H. 19
Vicia faba 63*
 VLP 278
- Watson J.D. 23, 59, 60
 Weiner 417
 wektor(y) 36, 157, 158, 161, 440, 442, 443, 451
 – bakteryjne 161–165
 – bifunkcyjny 168
 – binarny 457, 458
 – drożdżowe 168, 169
 – ekspresyjne 165
 – kointegracyjne 457, 458*
 – plazmidowe 161–165
 – pochodne bakteriofagów 165–168, 189*, 190
 – pomocniczy 457, 458
 – pośredni 458
 – retrowirusowy 170*, 171
 – sekrecyjny 440
 – wahadłowe 442, 445
 – wyższych eukariontów 169–171
 – zrekombinowany 165
 wędrówka po chromosomie 188
 węzeł zarodkowy 286
 White J. 55
 wiązanie fosfodiesterowe 37, 38*
 – peptydowe 138*, 139, 149
 widełki replikacyjne 60–62*, 69*, 87–89, 103, 104
 – –, formy 65, 66*
 – –, nić opóźniona i prowadząca 61
 – –, przemieszczanie się białek SSB 102
 – –, schemat budowy 100
 Wilson A. 435
 wirion 382, 384*, 392, 447*
 wiroid PSTV 111
 wirus(y) bakteryjne, p. bakteriofagi
 – białaczki limfocytów T (TLV1) 388–390
 – Epsteina–Barr 388–390, 474
 – grupy brodawczaków 388–390, 450
 – HIV 333, 382–384, 450,
 – karłowatości orzeszków ziemnych (PSV) 463
 – krowianki 169, 446, 447, 451
 – mięsaka Rousa (RSV) 394
 – MMTV 131
 – mozaiki kalafiora 169, 243
 – – lucerny (AIMV) 463
 – – tytoniu (TMV) 112, 463
 – onkogenne (transformujące) 389, 390, 394, 495*
 – opryszczki 389, 451
 – pałeczkowate 112
 – papilioma 169
 – Papova 85
 – polio 451
 – PSTV 111
 – sferyczne 112, 113
 – SV40 84, 85*, 123, 169, 405
 – wspomagające 394
 – X i Y ziemniaka (PVX, PVY) 463
 – zapalenia wątroby HBV 388–390, 445, 450
 włókno chromatynowe, p. chromatyna
 wobble hypothesis (ang.), p. hipoteza tolerancji
 workowce 265
 wrażliwość na UV 249
 współczynnik upakowania 127, 128
 wyłączenie alleliczne 349, 358, 364, 381
 wzmacniacz (p. też enhancer) 354, 355
- Xenopus* 284, 302
 – *laevis* 53, 63*, 127, 422*
xeroderma pigmentosum 259, 390
 X-gal 163, 173
- YAC, p. sztuczny chromosom drożdżowy
 Ya-Ming Hou 152
 Yanofsky Ch. 221
Yarrowia lipolytica 443
 yeast artificial chromosome, p. sztuczny chromosom drożdżowy
- zapalenie wątroby typu B 445
 zapłodnienie *in vitro* 469
 zarodek 298
 – androgenetyczny 287
 – gynogenetyczny 287
 – ssaka 288
 zasady azotowe 37, 38*
 zawał mięśnia sercowego 454
Zea mays 422*
 zegar molekularny 421, 435
 zespół Alzheimera 453, 468
 – chorobowy Pradel–Williego 290
 – feminizujących jąder 321
 – Klinefeltera 314
 – Lescha–Nyhana 452, 468
 – Li–Fraumeni 390, 468

zespół niedoboru odporności 452

– Turnera 314

– Waardenberga 467

ziemniak 464

zinc fingers (ang.), p. palce cynkowe

złącza intron–egzon 237, 239*

zmiana ramki odczytu, p. ramka odczytu

zmiany premutacyjne 250

zmiennosc antygenowa 384

zrakowacenie komórki, p. transformacja nowo-
tworowa

związki fluoryzujące 174

zwielokrotnienia zawartości DNA 283

zwierzęta transgeniczne 451, 465–470

Zymomonas 442

żaba 281, 282, 303

żachwy 285