

Zagórski, Włodzimierz

Sprawozdanie z działalności Towarzystwa : Sprawozdania z działalności Wydziałów TNW : Wydział IV nauk biologicznych : Streszczenia : Rola mitochondrialnej syntezy leucyklo-TRNA w składaniu genowym

Rocznik Towarzystwa Naukowego Warszawskiego 53, 148-152

1990

Artykuł został zdigitalizowany i opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych oraz w kolekcji mazowieckich czasopism regionalnych mazowsze.hist.pl.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach dozwolonego użytku.

ROLA MITOCHONDRIALNEJ SYNTEZY LEUCYKLO-TRNA
W SKŁADANIU GENOWYM

Składanie genowe w mitochondriach jest złożonym procesem zachodzącym w obecności białek kodowych zarówno przez genom jądrowy, jak i mitochondrialny. Jednym z takich białek mitochondrialnych jest maturaza bI4, kodowana przez czwarty intron genu cytochromu b. Mutaza ta kontroluje wycinanie dwu intronów, a mianowicie intronu bI4 (czyli odcinka pre-mRNA cytochromu b, kodującego właśnie też maturazę) oraz intronu aI4. Intron aI4 to czwarty intron genu (*coxI*) kodującego mitochondrialną I podjednostkę oksydazy cytochromowej. Intron aI4, wykazujący wysoką homologię do intronu bI4, również koduje syntezę białka o strukturze prawie identycznej do maturazy bI4, lecz pozbawionego w standardowych warunkach aktywności maturazowej. Ta "prawie identyczność" białka aI4 z maturazą bI4 stała się podstawą identyfikacji kolejnego genu kontrolującego składanie genowe w mitochondriach, a mianowicie jądrowego genu *NAM2*. Punktem wyjściowym było stwierdzenie, iż pewne mutacje pierwotne zlokalizowane w intronie bI4 zatrzymują składanie genowe inaktywując po prostu maturazę bI4. Te mutacje mitochondrialne mogły jednak ulec supresji ekstragenowej pod wpływem dodatkowej mutacji, zlokalizowanej – co było niespodzianką – w genomie jądrowym. Supresja ta objawiała się wówczas, gdy genom mitochondrialny niósł dziką kopię intronu aI4. Innymi słowy, uszkodzenie intronu bI4 ulega supresji w wyniku jądrowej mutacji *NAM2*, pod warunkiem występowania w mitochondriach nie uszkodzonej kopii intronu aI4 (1,2).

Te obserwacje genetyczne stały się podstawą hipotezy, zgodnie z którą jądrowy gen *NAM2* winien kontrolować syntezę białka tworzącego się w cytoplazmie i przedostającego się do mitochondrionu. To hipotetyczne białko wchodziłoby w funkcjonalny kompleks z dziką formą maturazy aI4, nieaktywną w składaniu genowym. W rezultacie nastąpić by miała aktywacja maturazy aI4 i zastąpienie przez nią uszkodzonej przez mutację pierwotną maturazy bI4.

Ten typ hipotezy możliwy jest do zweryfikowania doświadczalnego, przy czym kluczowym dla weryfikacji było określenie budowy genu *NAM2* oraz poznanie produktu tego genu.

Gen *NAM2* został sklonowany i zsekwencjonowany (3). Okazało się, że niesie on otwartą fazę odczytu, pozwalającą na zakodowanie białka zbudowanego z 894 aminokwasów i mającego masę cząsteczkową równą 102 kD. Analiza porównawcza sekwencji genu *NAM2* wskazała na istnienie wysokiej homologii (34% identycznych aminokwasów, 20% podstawień chemicznie konserwatywnych) z syntetazą leucylo-tRNA *Escherichia coli* (SLTA.c). Spostrzeżenie to skłoniło do podjęcia próby izolacji produktu genu *NAM2* i określenia, czy białko to – uwikłane w składaniu genowym w mitochondriach drożdżowych – posiada aktywność mitochondrialnej syntetazy leucylo-tRNA (mtSLT).

Konstrukcja szczepu nad-eksprymującego gen *NAM2*

Wyjściowy szczep drożdży CWO4 (ρ^+ , mit^+) o genotypie *alfa-his 3-11, leu 2-3,112, ade 2-1, ura 3-1, trp 1-1, can 1-100, NAM2⁺* został przekonstruowany w ten sposób, że w wyniku częściowej delecji utracił czynny gen *NAM2*. Szczep ten został transformowany plazmidem YCpGMGO68, niosącym dziką kopię genu *NAM2*, znajdującym się w plazmidzie pod kontrolą promotera UAS *GAL10* i *CYC1* (3). Ekspresja genu *NAM2* jest w takim transformancie, nazwanym HM200/1, reprimowana przez glukozę i indukowana przez galaktozę.

Transformowany HM200/1 wykazuje specyficzny fenotyp. Nietransformowane komórki o rozerwanym genie *NAM2* mogą rosnąć tylko w wyniku fermentacji, bowiem brak czynnego genu *NAM2* inaktywuje mitochondria i uniemożliwia oddychanie tlenowe. Transformanty posiadają gen *NAM2* (na plazmidzie), lecz nie zużywają glukozy, bowiem glukoza reprimuje ekspresję genu *NAM2*. Transformanty rosną więc wyłącznie w wyniku oddychania tlenowego, zużywając galaktozę.

Komórki transformantów są doskonałym źródłem do izolacji produktu genu *NAM2*, bowiem:

Po pierwsze – promotor galaktozowy jest tzw. „mocnym” promotorem i powoduje masywną nadprodukcję mRNA genu kontrolowanego przez tenże promotor.

Po drugie – transformanty posiadają aktywny aparat mitochondrialny, rosną bowiem wyłącznie w wyniku oddychania tlenowego.

Po trzecie – utrata plazmidu jest letalna, jedynym źródłem energii jest bowiem galaktoza. W sumie rosące na podłożu galaktozowym transformanty winny nad-eksprymować gen *NAM2* i posiadać aktywny aparat mitochondrialny.

Izolacja produktu genu *NAM2*

Podstawowym zagadnieniem przy izolacji swojego białka jest znalezienie prostej metody jego oznaczania. W przypadku białka *NAM2* przyjęto *a priori*, że białko to posiada aktywność enzymatyczną – mtSLT. Założenie to wynikało z rozważań nad strukturą genu *NAM2* oraz ze wstępnych oznaczeń aktywności mtSLT w ekstraktach mitochondrialnych przygotowanych ze szczepów niosących różne mutacje *NAM2*. To przyjęte *a priori* założenie pozwoliło ocenić aktywność enzymatyczną w subfrakcjach komórkowych. Okazało się, że w mitochondriach transformantów HM200/1 aktywność mtSLT była 60 razy wyższa niż w mitochondriach ze szczepu dzikiego. Co więcej, cała aktywność nadproduktowanej syntetazy lokalizowała się w mitochondriach. Można więc było przypuścić, iż rzeczywiście gen *NAM2* kontroluje syntezę mtSLT, nadprodukowane białko *NAM2* zaś posiada powinowactwo do mitochondrii i nie gromadzi się w cytoplazmie.

Opracowana uprzednio (4) metoda izolacji trwałych w przechowywaniu mitochondrii pozwoliła na zgromadzenie odpowiedniej ilości organelli wzbogaconych w mtSLT. W wyniku prostej procedury (5) opartej na lizie mitochondrii w obecności swojego detergentu (0.65% Triton X-100), wysoleniu frakcji biał-

Jak widać, wyizolowana mtSLT jest kolinearna z genem *NAM2*. Translacja rozpoczyna się najprawdopodobniej od kodonu AUG, N-końcowy zasadowo-hydrofobowy peptyd met-leu-ser-arg-pro-ser-ser-arg-phe zostaje odcięty od pierwotnego produktu translacji najprawdopodobniej w czasie transportu do mitochondrii. Czynne białko *NAM2* rozpoczyna się od leucyny.

Dyskusja

Z wykazania identyczności produktu genu *NAM2* z mtSLT wynika zasadniczy fakt. Okazuje się, że syntetazy aminoacylo-tRNA są czynne nie tylko w katalizowaniu standardowych reakcji związanych z aktywacją aminokwasów, ale że enzymy te są zdolne do brania udziału w cięciu i składaniu genowym. Omówione bowiem we wstępie dane genetyczne wskazują, iż mutacje genu *NAM2* wpływają na przebieg składania genów mitochondrialnych.

Zdolność do kontrolowania składania genowych jest cechą nie tylko mtSLT, ale również wydaje się mitochondrialnej syntetazy tyrozylo-tRNA z *N.crassa* (6). Sugeruje to ogólność omawianej kontroli – przynajmniej w przypadku ewolucyjnie zachowawczych systemów ekspresji genetycznej w mitochondriach.

Powstaje oczywiście pytanie, w jaki sposób mtSLT może brać udział w kontroli składania genowego. Wydaje się, że zasadniczy mechanizm składania genowego oparty jest na serii transestryfikacji autokatalizowanych w obrębie wyższego rzędu struktur pre-mRNA. Uporządkowanie tych struktur w sposób umożliwiający prawidłowy przebieg transestryfikacji może wymagać współdziałania swoistych białek, będących specyficznymi „matrycami” przestrzennymi porządkującymi odpowiednie struktury pre-mRNA. Oznacza to, iż należy założyć swoiste oddziaływanie wybranych odcinków pre-mRNA z swoistym(i) rejonem(ami) bryły białkowej.

Analiza sekwencji genu *NAM2* sugeruje, iż pewne części tego białka (o wysokiej homologii z SLTE.c) są zaangażowane w przebieg katalizowania aminoacylacji, inne zaś (o sekwencjach nieobecnych w enzymie bakteryjnym) mogłyby brać udział w katalizie składania genowego (3).

Wstępnie można więc założyć, iż rejony mtSLT oddziaływujące z pre-mRNA mogą być inne od rejonów wiążących tRNA^{Leu}. To proste założenie, iż obie funkcje enzymatyczne rozdzielone są między dwie różne domeny cząsteczki mtSLT, może nie być prawdziwe. Po pierwsze, tego typu dychotomiczne analizy zjawisk biochemicznych najczęściej są zawodne. Po drugie, wstępne badania (W.Z., dane nie opublikowane) wskazują, iż mtSLT rzeczywiście oddziałuje z mitochondrialnym pre-mRNA. Oddziaływanie to wyraża się zahamowaniem aktywności syntetazowej enzymu w obecności uzyskanych *in vitro* transkryptów niosących sekwencje mitochondrialnego intronu bI4. Inhibicja ta jednakże ma charakter mieszany – częściowo kompetycyjny, częściowo może brać udział zarówno domena wiążąca tRNA^{Leu}, jak i odcinki białka nie zaangażowane bezpośrednio w wiązaniu tRNA^{Leu}.

Doświadczenia inhibicyjne, niezależnie od ich interpretacji, wskazują, iż rzeczywiście – mtSLT wiąże się z mitochondrialnym pre-mRNA, co jest zgodne z założeniem udziału tego enzymu w składaniu genomu.

Piśmiennictwo

1. Dujardin, G., Jacq, C., Slonimski, P.P. *Nature* **298**: 628-632, (1982).
2. Dujardin, G., Labouesse, M., Netter, P., Slonimski, P.P. In: „Mitochondria 1983”, Eds. R.J. Schweyen, R. Wolf, F. Kaudewitz, pp. 233-250.
3. Herbert, C., Labouesse, M., Dujardin, G., Slonimski, P.P. *EMBO Journal* **7**: 473-483, (1988)
4. Kozłowski, M., Zagórski, W. *Anal. Biochem.* **172**:332-391, (1988).
5. Zagórski, W., Castaing, B., Labouesse, M., Herbert, C.J., Martin, R., Slonimski, P.P.J. *Cell Biol.*, (in press).
6. Akins, Lambowitz, A.M. *Cell* **50**: 331-345, (1987).

Waldemar Roszkowski-Śliż

ROLA ENDOGENNEJ FLORY BAKTERYJNEJ DLA PRAWIDŁOWEJ FUNKCJI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Jednym z najistotniejszych zagadnień dotyczących antybiotykoterapii, poza oddziaływaniem antybiotyków na bakterie, jest ich interakcja z organizmem gospodarza. Zgromadzono znaczną ilość informacji dotyczących oddziaływania antybiotyków na układ pokarmowy, wydalniczy i nerwowy. Dysponujemy natomiast skąpą ilością danych dotyczących oddziaływania antybiotyków na układ immunologiczny. Dane dotyczące tego zagadnienia są często ze sobą sprzeczne i pochodzą z doświadczeń, w których stosowano antybiotyki w stężeniach znacznie odbiegających od stężeń terapeutycznych.

W badaniach własnych podjęto próbę takiej oceny stosując antybiotyki zarówno w stężeniach, jak i reżimie podawania w sposób zbliżony do sytuacji terapeutycznej. Wszystkie doświadczenia wykonywano na myszach szczepów wsobnych stosując antybiotyki przez okres co najmniej 7 dni.

W pierwszej fazie badań oceniano dwa podstawowe parametry: odporność typu komórkowego mierzoną testem nadwrażliwości typu opóźnionego na oxalolon oraz odporność humoralną mierzoną liczbą komórek śledzionowych produkujących przeciwciała klasy IgG i IgM. Zbadano w ten sposób około 50 antybiotyków reprezentujących różne grupy farmakologiczne. W tej liczbie znaleziono kilka antybiotyków wywierających działanie immunosupresyjne, a wśród nich najsilniej wyrażony efekt posiadała mezlocylina.

W związku z powyższym dalsze badania nad wyjaśnieniem zjawiska immunosupresji wywołanej antybiotykami wykonywane były przy użyciu modelu terapii mezlocyliną. Stwierdzono, że zahamowanie reakcji immunologicznej, komórkowej i humoralnej utrzymuje się do dwóch tygodni po zakończeniu