

Molekularne mechanizmy regulacji ekspresji genów i replikacji DNA

Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn, Katedra Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk

Badania, prowadzone w kierowanym przeze mnie zespole w okresie wykorzystywania środków Subsydium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej były, z jednej strony rozwijaniem tematyki realizowanej poprzednio, a z drugiej strony pozwoliły na rozwinięcie nowych kierunków badań. Ogólnie mówiąc, wszystkie badania były związane z genetyką molekularną. Obiektami badań były zarówno bakterie i bakteriofagi (kontynuacja wcześniejszych badań), jak też organizmy eukariotyczne (nowe projekty), w tym należy zaznaczyć rozpoczęcie badań z zakresu genetyki człowieka.

Poniżej przedstawione są wybrane tematy badawcze spośród kilkunastu projektów aktualnie realizowanych w zespole oraz omówione najważniejsze wyniki tych badań.

1. Regulacja replikacji DNA bakteriofaga lambda

Regulacja replikacji materiału genetycznego jest procesem niezwykle istotnym w życiu każdego organizmu. Każda komórka musi kontrolować ten proces w taki sposób, aby obie komórki potomne otrzymały jak najwierniejsze kopie genomu macierzystego. Pasożyty wewnątrzkomórkowe, takie jak wirusy, które wykorzystują w dużym stopniu mechanizmy komórek gospodarza do namnażania się, muszą bardzo wydajnie produkować kopie swojego materiału genetycznego, aby w stosunkowo krótkim czasie wydać jak najliczniejsze potomstwo. W badaniach mechanizmów regulacji replikacji DNA posługujemy się w naszym laboratorium modelem bakteriofaga λ . Dlaczego wybraliśmy ten właśnie model badawczy? Ostatnio spotyka się głosy, że o tym bakteriofagu wiadomo już prawie wszystko, zatem po co dalej prowadzić nad nim badania? Stwierdzenie, że obecnie wiemy prawie wszystko o jakimkolwiek organizmie, czy nawet pojedynczym procesie biologicznym jest dalekie od stanu faktycznego. Duża porcja zgromadzonej przez lata wiedzy na temat jakiegoś organizmu wydaje się raczej jego zaletą niż wadą w

badaniach, gdzie zamierza się poznać mechanizmy regulacyjne z bardzo dużą dokładnością. Faktycznie, niewiele jest tak dobrze poznanych modeli badawczych jak bakteriofag λ , co uznać trzeba za dużą zaletę tego wirusa, w przypadku badań zmierzających do poznania wyrafinowanych procesów regulacyjnych na poziomie molekularnym.

Bakteriofag λ odegrał kluczową rolę w rozwoju biologii molekularnej. Badania nad tym wirusem dostarczyły podstawowych wiadomości o regulacji i przebiegu takich procesów, jak na przykład inicjacja transkrypcji, antyterminacja transkrypcji, inicjacja replikacji DNA, funkcjonowanie białek szoku termicznego, ogólna i miejscowo-specyficzna rekombinacja DNA, tworzenie się wielobiałkowych i nukleoproteinowych kompleksów czy kontrola rozwoju na etapie wyboru alternatywnych dróg rozwojowych. Mimo obecnego stanu zaawansowania badań genetycznych i biochemicznych nad znacznie bardziej skomplikowanymi organizmami, włącznie z człowiekiem, bakteriofag λ , być może dla niektórych niespodziewanie, nadal odgrywa niezwykle ważną rolę w poznawaniu szczegółów podstawowych procesów biologicznych zachodzących na poziomie molekularnym. Znakomite przykłady popierające to twierdzenie można znaleźć w artykułach przeglądowych opublikowanych w ostatnich latach. Szczególnie jednak praca autorstwa Friedman'a i Court'a (2001) [16] pokazuje dobitnie, że badania prowadzone w oparciu o bakteriofaga λ mogą w dalszym ciągu przynieść rezultaty na najwyższym światowym poziomie i o ogólnobiologicznym znaczeniu. Znamienny jest także tytuł tego artykułu (w wolnym tłumaczeniu): „*Bakteriofag λ : żyje, ma się dobrze i robi swoje*”.

Wydaje się, że badania nad bakteriofagami zyskują także nowy wymiar. Po pierwsze, w dobie genomiki, są to jedyne organizmy, które jako modele badawcze umożliwiają z odpowiednią dokładnością analizę porównawczą całych genomów (Brussow H. i Hendrix, 2002). Po drugie, wobec coraz wyraźniejszego kryzysu w terapii antybiotykowej, spowodowanego pojawianiem się bardzo licznych szczepów bakteryjnych opornych na antybiotyki, coraz więcej pisze się o powrocie do koncepcji terapii bakteriofagowej, czyli używaniu bakteriofagów jako środków antibakteryjnych w medycynie (Sulakvelidze i wsp., 2001). Niestety, niedostatek wyników badań podstawowych opóźnia znacznie prace nad terapią bakteriofagową. Tak dobrze zbadane fagi jak λ są raczej wyjątkiem niż regułą, jeśli chodzi o poznanie

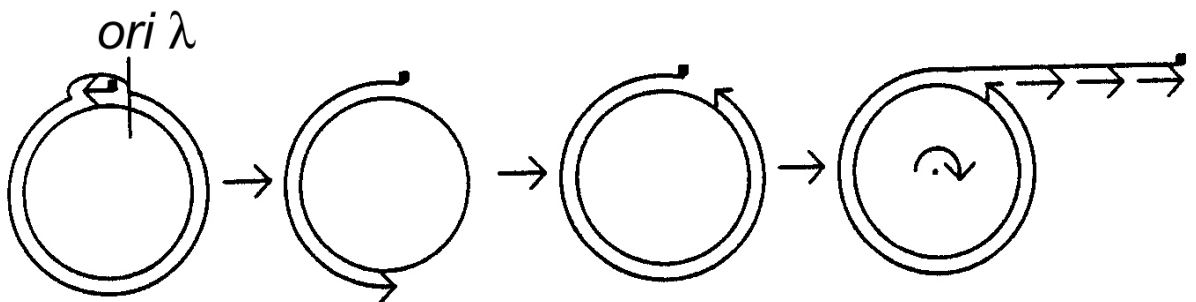
procesów życiowych bakteriofagów. Stąd prace w tym zakresie nabierają coraz większego znaczenia. Okazuje się ponadto, że bakteriofagi mogą stanowić znakomite systemy modelowe do testowania antywirusowej terapii genowej (Lindemann i wsp., 2002). Bakteriofagi to nie tylko potencjalne „lekarstwa” w terapii chorób bakteryjnych, ale także zagrożenie w procesach biotechnologicznych. Zakażenia kultur bakteryjnych w olbrzymich bioreaktorach mogą doprowadzić do ogromnych strat natury ekonomicznej. Badania nad fagiem λ jako modelem mogą być użyteczne w niwelowaniu efektów zakażenia hodowli bakteryjnych bakteriofagami. Nie można zapominać o niedawno odkrytym fakcie, że wiele toksyn bakteryjnych, jak chociażby toksyny Shiga czy toksyna cholery, są kodowane w obrębie profagów znajdujących się w genomach patogennych bakterii. Co więcej, wiele z nich to profagi lambdoidalne. Zatem dokładne poznanie molekularnych postaw regulacji procesów związanych z rozwojem fagów lambdoidalnych może mieć ogromne znaczenie w medycynie. Jeśli chodzi o praktyczne wykorzystanie bakteriofaga λ , to nie sposób nie wspomnieć o licznych wektorach bakteriofagowych wykorzystywanych w inżynierii genetycznej, których konstrukcja była możliwa wyłącznie dzięki znajomości budowy i funkcji genomu faga λ . Poznanie podstaw mechanizmów regulacji replikacji DNA faga λ pozwoliło na stworzenie plazmidowego wektora do klonowania, którego liczbę kopii w komórkach *E. coli* można dowolnie regulować w zakresie od 1 do około 100. Wreszcie warto wspomnieć o systemie służącym do wykrywania mutacji w organizmach ssaków, opartym na elementach genetycznych bakteriofaga λ .

W podsumowaniu można stwierdzić, że bakteriofag λ jest nadal znakomitym modelem badawczym, mogącym przyczynić się do uzyskania wyników o ogólnobiologicznym znaczeniu, a także o znaczeniu praktycznym, szczególnie w medycynie i biotechnologii.

Materiał genetyczny zawarty w główce wirionu λ stanowi liniowa dwuniciowa cząsteczka DNA, z dwunastonukleotydowymi niesparowanymi końcami. Po wnikięciu DNA bakteriofaga λ do komórki *E. coli* następuje cyrkularyzacja tej cząsteczki. We wczesnej fazie rozwoju litycznego replikacja DNA tego wirusa rozpoczyna się w miejscu *ori λ* i przebiega według modelu θ („z kółka w kółko”), w którym potomne nici DNA syntetyzowane są z reguły w obydwu kierunkach od miejsca *origin*. Po kilku (zwykle pięciu lub sześciu) rundach replikacji wczesnej (około

15 minut po infekcji w optymalnych warunkach wzrostu komórki gospodarza) następuje przejście do replikacji według modelu σ („toczącego się koła”). W jej wyniku powstają konkatameryczne struktury DNA złożone z wielu jednostkowych genomów λ , które następnie mogą być pakowane do potomnych, wcześniej uformowanych główek fagowych.

Oto pytania, które do niedawna pozostawały bez odpowiedzi: (i) jak dochodzi do przejścia replikacji z modelu θ do replikacji zachodzącej według modelu σ , (ii) w jaki sposób proces ten jest regulowany oraz (iii) co jest sygnałem do zapoczątkowania wydarzeń, prowadzących do tworzenia DNA gotowego do pakowania do kapsydów fagowych. Zaproponowano model przejścia od replikacji θ do replikacji σ (Ryc. 1), który jak dotąd, choć nie udowodniony bezpośrednio, jest powszechnie uznawany. Model ten zakłada, że replikacja σ jest poprzedzana jedną rundą jednokierunkowej replikacji według modelu θ , zainicjowanej w miejscu $ori\lambda$. Po takiej rundzie następuje odsunięcie końca 5' syntetyzowanej nici prowadzącej (ciągłej) przez nowo tworzony koniec 3' tejże nici. Jeśli model ten jest słuszny, to kluczowe pytanie dotyczyło mechanizmu zapoczątkowania jednokierunkowej replikacji DNA λ według modelu θ .



Ryc. 1. Model przejścia replikacji wczesnej (θ) w późną (σ) podczas rozwoju bakteriofaga λ (Dodson i wsp., 1986). Jedna runda jednokierunkowej replikacji typu θ zainicjowanej w miejscu $ori\lambda$ poprzedza odsunięcie końca 5' (zaznaczonego kropką) przez koniec 3' nowosyntetyzowanej nici (grot strzałki). Dla uproszczenia schematu, na rysunku zaznaczono tylko nić rodzicielską, na której zachodzi synteza nici wiodącej.

Aby wytłumaczyć regulację zmiany kierunkowości replikacji inicjowanej z $ori\lambda$ proponowano uprzednio różne hipotezy. Pierwszy model, zaproponowany przez

zespół Rogera McMackena (Learn i wsp., 1993) został opracowany na podstawie badań prowadzonych *in vitro*. Sugerował on, iż wiązanie białka λO do *ori* λ (czyli utworzenie tzw. „O-somu”) pozwala na powstanie aktywnych widełek replikacyjnych na prawo od *origin*, natomiast posuwanie się helikazy na lewo od miejsca *origin* jest zablokowane. Dopiero transkrypcja przebiegająca wzdłuż genu *O* i *ori* λ może destabilizować strukturę „O-somu”, pozwalając na zajście replikacji dwukierunkowej. Zatem transkrypcja rejonu *origin* miałaby decydującą rolę w stymulacji dwukierunkowej replikacji DNA faga λ . Faktycznie, gdy przeprowadzano reakcje replikacji DNA plazmidu λ *in vitro* bez udziału polimerazy RNA, obserwowano niemal wyłącznie replikację jednokierunkową („w prawo” od *origin*). Dodanie do układu polimerazy RNA oraz trójfosforanów rybonukleotydów spowodowało pojawienie się znaczącej frakcji cząsteczek DNA replikujących się dwukierunkowo (Learn i wsp., 1993).

Drugi model, zaproponowany przez zespół Macieja Żylicza i wsp. (1998), opierał się również na badaniach przeprowadzonych *in vitro*. Zgadzał się on z hipotezą, że „O-som” może stanowić barierę na drodze widełek replikacyjnych poruszających się w lewym kierunku od *ori* λ , jednakże sugerował jako punkt zwrotny (w zniesieniu tej bariery i umożliwieniu ruchu widełek replikacyjnych w obydwu kierunkach), degradację białka λO przeprowadzaną przez proteazę ClpP/ClpX. Według tej hipotezy, chwilowe zaburzenia funkcji proteaz powodują zahamowanie degradacji białka λO , co prowadzi do zablokowania ruchu widełek replikacyjnych w jednym z kierunków przez tkwiący w *ori* λ „O-som”. Prowadzić to z kolei miało do inicjacji jednokierunkowej replikacji typu θ , przechodzącej następnie w replikację typu σ .

Oba powyższe modele, mimo że oparte na bardzo wyrafinowanych i przeprowadzonych precyzyjnie badaniach *in vitro* okazały się niezgodne z wynikami z badań *in vivo*. Badania przeprowadzone w naszym zespole wykazały bowiem istnienie stabilnej struktury kompleksu replikacyjnego λ , który jest dziedziczony przez jedną z dwóch potomnych kopii DNA po każdej rundzie replikacji i nie ulega destabilizacji, mimo zachodzącej transkrypcji w rejonie *ori* λ (Węgrzyn i Węgrzyn, 2001; Potrykus i wsp., 2002). Ponadto wykazaliśmy, że zarówno brak jak i nadmiar

proteazy ClpP/ClpX nie wpływa znacząco na replikację DNA bakteriofaga λ w komórkach gospodarza (Szalewska i wsp., 1994).

Badania przeprowadzone przez nas *in vivo* sugerują, iż procesy przegrupowania struktury preprimosomu $ori\lambda$ - λ O- λ P-DnaB, przy udziale białek szoku termicznego, DnaK, DnaJ i GrpE oraz umieszczenia helikazy DnaB (uwolnionej od blokującej jej aktywność białka λ P) w odpowiednich miejscach w orientacji pozwalającej następnie na replikację w dwóch kierunkach, są powiązane z aktywacją transkrypcyjną $ori\lambda$, zachodzącą podczas transkrypcji inicjowanej z promotora p_R (Węgrzyn i Węgrzyn, 2001). W związku z tym, mniej efektywna transkrypcja z promotora p_R mogłaby powodować obniżenie poziomu aktywacji transkrypcyjnej $ori\lambda$, a to z kolei, powodowałoby zainstalowanie tylko jednego kompleksu helikazy DnaB. Zdarzenia te prowadziłyby do zainicjowania replikacji jednokierunkowej. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa bakteryjne białko DnaA, które pozytywnie reguluje transkrypcję z promotora p_R (Szalewska-Pałasz i wsp., 1998; Glinkowska i wsp., 2003). Zatem aktywność białka DnaA jest niezbędna do częstego inicjowania dwukierunkowej replikacji typu θ z $ori\lambda$ w komórkach *E. coli*. Zaproponowana przez nas hipoteza, poparta licznymi doświadczeniami z zastosowaniem licznych mutantów oraz technik mikroskopii elektronowej, analizy intermedatów replikacyjnych po dwukierunkowej elektroforezie agarozowej DNA oraz analizy znakowanych produktów replikacji DNA po ultrawirowaniu w gradiencie stężeń chlorku cezu, zakłada, iż po kilku rundach replikacji według modelu dwukierunkowej θ w komórce pojawia się wiele kopii genomu λ (około 50 kopii po 5-6 rundach replikacyjnych). Pojawienie się wielu kopi genomu λ , w powiązaniu z występowaniem dużej liczby miejsc wiążących DnaA w obrębie DNA λ , powoduje wymiarczkowanie białka DnaA w komórce. Taka sytuacja może prowadzić do mało wydajnej aktywacji transkrypcyjnej $ori\lambda$, która z kolei może wystarczać na zainicjowanie tylko jednokierunkowej replikacji typu θ , która następnie przechodzi w replikację typu σ (Barańska i wsp., 2001, 2002).

2. Biologiczna rola luminescencji bakterii

Bioluminescencja, czyli wytwarzanie światła przez żywe organizmy, jest procesem rozpowszechnionym w przyrodzie. Do emisji światła zdolne są tak

różnorodne organizmy jak bakterie, grzyby i zwierzęta (zarówno bezkręgowce jak i kręgowce). Podstawą wytwarzania światła przez organizmy jest reakcja utleniania związku zwanego lucyferyną (należy do grupy związków o bardzo różnej budowie chemicznej) przez enzym – lucyferazę.

Proces wytwarzania światła przez bakterie pochłania do kilkunastu procent energii komórkowej. W związku z tym proces luminescencji musi mieć duże znaczenie dla tych organizmów, gdyż w przeciwnym razie zostałyby wyeliminowane w drodze ewolucji jako niekorzystny energetycznie. Rolę wytwarzania światła przez zwierzęta można stosunkowo łatwo przypisać komunikowaniu się różnych osobników tego samego gatunku, odstraszaniu lub myleniu napastnika czy też zwabianiu ofiary. Biologiczna rola luminescencji bakterii pozostawała przez długi czas nieznana. Dotyczy to w szczególności luminescencyjnych bakterii wolnożyjących, chociaż nie jest też łatwo wytłumaczyć, jaka jest konkretna korzyść z emisji światła dla bakterii, żyjących w symbiozie ze zwierzętami. Bakterie mogą emitować światło, ale nie potrafią odbierać bodźców świetlnych. Nie można też zakładać w tym przypadku odstraszania napastnika ani zwabiania ofiary.

Rees i wsp. (1998) wysunęli hipotezę, że enzymatyczny proces prowadzący do produkcji kwantów światła mógł ewoluować jako mechanizm detoksyfikacji reaktywnych form tlenu. Faktycznie, uzyskane niedawno dane doświadczalne sugerują, że w pewnych warunkach aktywność lucyferazy w komórkach *Vibrio harveyi* (luminescencyjnej bakterii morskiej) pozwala na efektywniejszą neutralizację toksycznych metabolitów, pojawiających się w wyniku stresu oksydacyjnego (Szpilewska i wsp., 2003). Jednakże te same badania wskazały, że za tę ochronną rolę odpowiedzialna jest wyłącznie lucyferaza, bez udziału innych enzymów koniecznych do efektywnej luminescencji, zatem wytwarzanie światła jest w tym przypadku zbędne.

Nowe światło na problem biologicznej roli bioluminescencji bakterii rzuciły nasze badania, w których izolowaliśmy mutanty *V. harveyi* po mutagenezie transpozonowej. Otrzymaliśmy kolekcję mutantów niosących transpozon w różnych rejonach chromosomu. Dokładniejsza analiza fenotypów tych mutantów wykazała, że utrata zdolności do świecenia była skorelowana z podwyższoną wrażliwością na promieniowanie UV. Okazało się, że mutanty niezdolne do produkcji światła (i to zarówno te, które nie miały aktywnej lucyferazy jak i te niosące defekt w innym genie,

niezbędnym do produkcji substratu dla lucyferazy) mają obniżoną zdolność do naprawy DNA, gdy po naświetlaniu promieniami UV hodowano je w ciemności, ale nie, gdy dalszą hodowlę prowadzono przy dostępnym świetle widzialnego. Zaproponowaliśmy zatem, że bakterie luminescencyjne mogą mieć wewnętrzne źródło światła, które stymuluje naprawę DNA dzięki aktywacji fotolizazy (Czyż i wsp., 2000). Hipotezę tę poparły doświadczenia, w których do bakterii *E. coli*, naturalnie niezdolnej do produkcji światła, wprowadziliśmy geny *V. harveyi* warunkujące luminescencję. Zdolne do luminescencji komórki *E. coli* okazały się znacznie bardziej odporne na promieniowanie UV niż komórki dzikiego typu. Różnic tych nie obserwowaliśmy w mutantach *phr*, niezdolnych do fotoreaktywacji z powodu braku aktywności fotolizazy.

Wydaje się, że dla bakterii żyjących w środowisku morskim efektywna naprawa DNA przez fotoreaktywację może mieć bardzo istotne znaczenie. Bakterie te, żyjąc w toni wodnej na różnych głębokościach, mają bardzo utrudniony dostęp do światła słonecznego. Wytworzenie wewnętrznego źródła światła zapewnia aktywność fotolizazy niezależnie od warunków zewnętrznych.

W świetle powyższej hipotezy osobny problem stanowi regulacja efektywności luminescencji przez zmysł gęstościowy. Jeśli hipoteza o stymulacji fotoreaktywacji przez bioluminescencję jest słuszna, to wydajna produkcja światła powinna zachodzić niezależnie od gęstości bakterii, przynajmniej w warunkach zagrożenia komórki czynnikami mutagennymi. Wykazaliśmy, że geny kodujące białka niezbędne w procesie luminescencji znajdują się pod negatywną kontrolą represora LexA, czyli są częścią regulonu SOS (Czyż i wsp., 2000). Wydajność luminescencji zwiększa się znacznie, nawet w hodowlach bakteryjnych o niewielkiej gęstości, po ich naświetlaniu promieniami UV (Czyż i wsp., 2000). Można zatem sugerować, że regulacja luminescencji poprzez zmysł gęstościowy polega na przygotowaniu bakterii do detoksyfikacji różnych związków i efektywnej naprawy DNA w warunkach dużego zagęszczenia komórek, co zwykle wiąże się z pojawieniem się w środowisku zwiększonego poziomu toksycznych metabolitów i innych substancji mutagennych.

Jeśli rolą luminescencji bakterii jest faktycznie stymulacja naprawy DNA, to możliwe stałoby się wytłumaczenie, w jaki sposób doszło do powstania i wczesnej ewolucji tego procesu. Problemem bowiem jest wyobrażenie sobie doboru naturalnego, który faworyzowałby komórki wytwarzające niewielką ilość światła,

niewidzialnego jeszcze gołym okiem (Takiej intensywności światło mogły jedynie emitować pierwsze organizmy, u których pojawiła się aktywność lucyferazy). Ta niewielka ilość światła mogła jednak wystarczać do stymulacji naprawy DNA. Warto w tym miejscu zauważyć, że zmodyfikowane genetycznie komórki *E. coli* wytwarzają światło mierzalne w luminometrze, ale niewidzialne gołym okiem. Przeprowadziliśmy doświadczenia, w których zmieszano ze sobą hodowle komórek *V. harveyi* dzikiego typu oraz mutantów niezdolnych do luminescencji, tak aby uzyskać stosunek obu typów komórek zbliżony do 1:1. Następnie hodowle były prowadzone w ciemności. W tych warunkach, w okresie kilku dni, w hodowli zaczynały dominować nieświecące mutanty. Wystarczyła jednak niewielka codzienna dawka promieniowania UV, aby sytuacja diametralnie się odwróciła – w takiej hodowli zdecydowanie dominowały bakterie luminescencyjne. Wyniki te skłoniły nas do zaproponowania, że stymulacja naprawy DNA mogła być napędem ewolucyjnym w rozwoju systemów bioluminescencyjnych (Czyż i wsp., 2003).

3. Molekularne mechanizmy zmienności genetycznie uwarunkowanych chorób człowieka z grupy mukopolisacharydoz – potencjalne możliwości rokowania przebiegu choroby i prób leczenia

Od niedawna, w kierowanym przeze mnie zespole rozpoczęliśmy prace nad kilkoma projektami z zakresu genetyki człowieka. Otwarcie tej nowej tematyki badawczej było możliwe między innymi dzięki środkom uzyskanym w ramach Subsydium. Poniżej, przedstawiam jeden z tych tematów, dotyczący genetycznie uwarunkowanych lizosomalnych chorób spichrzeniowych z grupy mukopolisacharydoz.

Mukopolisacharydozy (w skrócie: MPS) są rzadkimi chorobami genetycznymi, dziedziczonymi w sposób autosomalny recesywny (z wyjątkiem mukopolisacharydozy typu II - MPS II, która dziedziczy się w sposób sprzężony z chromosomem X). Przyczyną każdej z mukopolisacharydoz jest defekt swoistego enzymu lizosomalnego, biorącego udział w degradacji mukopolisacharydów.

Mukopolisacharydy, obecnie częściej nazywane glikozoaminoglikanami (w skrócie GAG) są związkami chemicznymi produkowanymi przez większość tkanek w organizmach ssaków. Odpowiedzialne są one między innymi za prawidłową strukturę i funkcjonowanie tkanki łącznej, za odpowiednie komunikowanie się

między komórkami (włączając w to udział w przekazywaniu sygnałów dzięki wspomaganemu łączeniu się białek sygnałowych z ich receptorami w błonach komórkowych) i za możliwość prawidłowego przenikania różnych substancji do tkanek. Większość glikozoaminoglikanów występuje w postaci peptydoglikanów. Są one związane kowalencyjnie (zwykle poprzez resztę seryny) z odpowiednim peptydem. W prawidłowej komórce zachodzi stały metabolizm glikozoaminoglikanów, tzn. synteza nowych i degradacja starszych cząsteczek. Rozkład tych związków w komórkach odbywa się w lizosomach przy udziale kilkunastu enzymów, specyficznym kierowanych do tych organelli.

W przypadku braku lub znacznego obniżenia aktywności jednego z enzymów odpowiedzialnych za rozkład mukopolisacharydów, nie są one degradowane i gromadzą się w lizosomach oraz przestrzeni międzykomórkowej. Niewydolność aparatu lizosomalnego stymuluje wiele procesów kompensacyjnych, po wyczerpaniu których zaburzeniu ulega złożona funkcja i struktura komórki, prowadząc do jej zniszczenia, a w następstwie tego do charakterystycznych objawów klinicznych. W patomechanizmie tych chorób kluczowe znaczenie mają nie tylko mechaniczne skutki spichrzania, ale również efekt toksyczny i uszkodzający gromadzonych związków oraz cytokin. W zależności od rodzaju brakującego enzymu zaangażowanego w rozkład glikozoaminoglikanów wyróżnia się poszczególne typy i podtypy mukopolisacharydozy.

Gromadzenie się mukopolisacharydów w lizosomach powoduje stopniowe upośledzenie funkcji komórek, tkanek i praktycznie wszystkich narządów. Choroby te mają charakter postępujący i średni czas przeżycia wynosi kilkanaście lat. Specyficznym i trudno wytłumaczalnym problemem jest różnorodność objawów chorobowych oraz przebiegu choroby u różnych osób. Dobrym przykładem jest mukopolisacharydoza typu I (MPS I), gdzie obserwuje się przypadki stosunkowo łagodne, kiedy to chorzy mogą dożywać nie tylko wieku dojrzałego, ale żyć kilkadziesiąt lat, przy czym nie obserwuje się zaburzeń ze strony centralnego układu nerwowego (tzw. forma MPS I-S, czyli choroba Scheie). Formy pośrednie (MPS I-H/S, choroba Hurler-Scheie), jak również ciężkie przypadki, gdzie już w wieku kilku lat występuje znaczne upośledzenie funkcjonowania centralnego układu nerwowego i szybkie zmiany degeneracyjne w innych narządach (MPS I-H, choroba Hurler) prowadzą do bardzo wczesnej śmierci. MPS I jest klasycznym przykładem różnorodności przebiegu mukopolisacharydoz u różnych chorych, ale podobne

zjawiska zachodzą także w przypadku pozostałych chorób z tej grupy (Neufeld i Muenzer, 1995). Ta sama choroba może przebiegać różnie u różnych osób nie tylko w zależności od typu choroby, ale także w obrębie tego samego typu MPS, czasem nawet w obrębie jednej rodziny. W przypadku MPS I początkowo sądzono, że przebieg choroby uzależniony jest bezpośrednio od rodzaju mutacji w genie kodującym alfa-L-iduronidazę i że najcięższa postać MPS I-H związana jest z całkowitym brakiem aktywności tego enzymu. Im wyższa jest aktywność resztkowa enzymu, tym przebieg choroby może być łżejszy. Późniejsze badania nie potwierdziły jednak tej, wydawałoby się logicznej i bardzo prawdopodobnej hipotezy. Okazało się, że bardzo często nie ma ewidentnego związku między postacią choroby a obecnością konkretnej mutacji w genie kodującym alfa-L-iduronidazę (gen IUDA), jak też z aktywnością tego enzymu w badanych tkankach. Dla przykładu, opisano klinicznie zdrową osobę ze znacznym niedoborem alfa-L-iduronidazy (praca przeglądowa: Neufeld i Muenzer, 1995). Podobne doniesienia notowano także w badaniach nad próbą optymalizacji metody diagnostyki prenatalnej. Natomiast w fibroblastach wyizolowanych od jednego z chorych wykazujących typowe objawy choroby Hurler poziom aktywności alfa-L-iduronidazy był kilkakrotnie wyższy niż u innych chorych z łagodniejszym przebiegiem MPS I. W niektórych typach mukopolisachrydoz (m. in. MPS I i MPS III A) opisywano przypadki rodzeństwa, gdzie występowały te same zmutowane allele, a jednocześnie obserwowane były bardzo duże różnice w przebiegu chorób (praca przeglądowa: Neufeld i Muenzer, 1995). Stanowi to trudność w przewidywaniu przebiegu choroby u danej osoby, a co za tym idzie, w doborze odpowiedniego postępowania terapeutycznego.

Rokowanie przebiegu mukopolisacharydoz jest niezwykle istotne dla postępowania klinicznego, gdyż, z jednej strony, chorzy nadają się do częstych zabiegów chirurgicznych, a z drugiej, każdy taki zabieg jest dla nich zagrożeniem życia. Rokowanie takie jest niezwykle trudne, a w zasadzie w większości przypadków niemal niemożliwe, ze względu na omówiony brak jednoznacznych zależności pomiędzy przebiegiem klinicznym choroby a typem mutacji i resztkową aktywnością danego enzymu. Do tej pory nie przedstawiono satysfakcjonującego wyjaśnienia mechanizmu tej niezgodności. Nie ma też potencjalnej metody umożliwiającej skuteczne rokowanie przebiegu mukopolisacharydoz na podstawie analiz genetycznych lub biochemicznych.

Na podstawie analizy ogólnego modelu genetycznej regulacji metabolizmu glikozaaminoglikanów zaproponowaliśmy ostatnio (Węgrzyn i wsp., 2004), że o przebiegu mukopolisacharydozy decyduje nie tylko kinetyka degradacji glikozaaminoglikanów w lizosomach (czyli poziom i aktywność hydrolaz za tę degradację odpowiedzialnych), lecz także kinetyka ich syntezy. Zatem rokowanie co do przebiegu choroby powinno uwzględniać nie tylko rodzaj mutacji oraz poziom resztkowej aktywności danej hydrolazy, lecz także poziom syntezy glikozaaminoglikanów. Hipoteza ta jest co prawda sprzeczna z panującym do niedawna poglądem, że synteza glikozaaminoglikanów zachodzi w organizmie na stałym poziomie, ale istnieją przekonujące dowody eksperymentalne, że proces ten jest precyzyjnie regulowany w komórce. Wychodząc z założenia, że poziom syntezy tych związków może być kluczowy dla przebiegu choroby, podjęliśmy próby uzyskania potencjalnego leku, obniżającego poziom syntezy mukopolisacharydów w komórkach. Uzyskaliśmy pierwsze zachęcające wyniki w hodowlach komórkowych.

CYTOWANA LITERATURA:

- Barańska S., Gabig M, Węgrzyn A., Hernandez P., Schwartzman J.S., Helinski D., **Węgrzyn G.** (2001) Regulation of the switch from bacteriophage λ early (theta) to late (sigma) DNA replication mode. ***Microbiology* 147: 535-547**
- Barańska S., Konopa G., **Węgrzyn G.** (2002) Directionality of λ plasmid DNA replication carried out by the heritable replication complex. ***Nucleic Acids Res.* 30: 1176-1181**
- Brussow H., Hendrix R. W. (2002) Phage genomics: small is beautiful. ***Cell* 108: 13-16**
- Czyż A., Wróbel B., **Węgrzyn G.** (2000) *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair, ***Microbiology* 146: 283-288**
- Czyż A., Plata K., **Węgrzyn G.** (2003) Stimulation of DNA repair as an evolutionary drive for bacterial luminescence. ***Luminescence* 18: 140-144**
- Dodson M., Echols H., Wickner S., Alfano C., Mensa-Wilmot K., Gomes B., LeBowitz J., Roberts J.D., McMacken R. (1986) Specialized nucleoprotein structures at the origin of replication of bacteriophage λ : localized unwinding of duplex DNA by a six protein reaction. ***Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7638-7642**
- Friedman D. I., Court D. L. (2001) Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing. ***Curr. Opin. Microbiol.* 4: 201-207**
- Glinkowska M., Majka J., Messer W., **Węgrzyn G.** (2003) The mechanism of regulation of bacteriophage λ p_R promoter activity by *Escherichia coli* DnaA protein. ***J. Biol. Chem.* 278: 22250-22256.**
- Learn B., Karzai A.W., McMacken R. (1993) Transcription stimulates the establishment of bidirectional λ DNA replication *in vitro*. ***Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 59: 389-402**

- Lindemann B. F., Klug C., Schwinhorst A. (2002) Evolution of bacteriophage in continuous culture: a model system to test antiviral gene therapies for the emergence of phage escape mutants. **J. Virol.** **76**: 5784-5792
- Neufeld E. F., Muenzer J. (1995) The mucopolysaccharidoses. W: Scriver C. R., Beaudet E. L., Sly W. S., Valle D. (Red.) The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, str. 2465
- Potrykus K., Barańska S., Węgrzyn A., **Węgrzyn G.** (2002) Composition of the λ plasmid heritable replication complex. **Biochem. J.** **364**: 857-862
- Rees J-P., De Wergifosse B., Noiset O., Dubuisson M., Jansens B., Thompson E. M. (1998) The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defense mechanisms into deep-sea communication tools, **J. Exp. Biol.** **201**: 1211-1221
- Sulakvelidze A., Alavidze, Z., Morris Jr. J. G. (2001) Bacteriophage therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.** **45**: 649-659
- Szalewska A., **Węgrzyn G.**, Taylor K. (1994) Neither absence nor excess of λ O initiator – digesting ClpXP protease affects λ plasmid or phage replication in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** **13**: 469-474
- Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn A., Błaszczak A., Taylor K., **Węgrzyn G.** (1998) DnaA-stimulated transcriptional activation of *ori λ* : *Escherichia coli* RNA polymerase β subunit as a transcriptional activator contact site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**: 4241-4246
- Szpilewska H., Czyż A., **Węgrzyn G.** (2003) Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress. **Curr. Microbiol.** **47**: 379-382
- Węgrzyn A., **Węgrzyn G.** (2001) Inheritance of the replication complex: a unique or common phenomenon in the control of DNA replication? **Arch. Microbiol.** **175**: 86-93
- Węgrzyn G.**, Węgrzyn A., Tyłki-Szymańska A. (2004) A general model for genetic regulation of turnover of glycosaminoglycans suggests a possible procedure for prediction of severity and clinical progress of mucopolysaccharidoses. **Med. Hypoth.** **62**: 986-992
- Żylicz M., Liberek K., Wawrzynów A., Geogropoulos C. (1998) Formation of the preprimosome protects λ O from RNA transcription-dependent proteolysis by ClpP/ClpX. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**: 15259-15263