

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 33 (2-3)
(113-392) (1987)

1987

tom 33 nr 2-3
PL ISSN 0032-5422



PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 33 ZESZYT 2-3
1987

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 33 (2-3)
(113—392) (1987)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (*Poznań*)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (*Warszawa*)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (*Warszawa*)

Członkowie: S. Angielski (*Gdańsk*), M. Chorąży (*Gliwice*), E. Czuryło (*Warszawa*), M. Fikus (*Warszawa*), E. Gąsior (*Lublin*), M. Gumińska (*Kraków*), D. Hulanicka (*Warszawa*), W. Jachymczyk (*Warszawa*), J. Kwiatkowska (*Wrocław*), S. Lewak (*Warszawa*), A. Morawiecki (*Wrocław*), J. Pawełkiewicz (*Poznań*), K. Raczyńska-Bojanowska (*Warszawa*), L. Wojtczak (*Warszawa*), Z. Zielińska (*Warszawa*)

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ZASTĘPCY REDAKTORA NACZELNEGO

G. Palamarczyk

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

A. Jerzmanowski

Instytut Biochemii UW
ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

SEKRETARZ REDAKCJI

B. Kamińska

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (*Warszawa*), J. Skangiel-Kramska (*Warszawa*), J. Zborowski (*Warszawa*)

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

<http://rcin.org.pl>



PROFESOR DR CHEMII IRENA CHMIELEWSKA
1905—1987

ALBANY, N. Y. 12214
1971-1972

Dnia 17 stycznia 1987 roku zmarła w wieku osiemdziesięciu dwóch lat profesor Irena Chmielewska, wybitna uczona, troskliwy wychowawca kilku pokoleń biochemików warszawskich. Urodziła się dnia 13 lipca 1905 roku w Łodzi. Od wczesnej młodości jednak związała się z Warszawą, gdzie ukończyła gimnazjum a następnie studiowała na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu. Od 1929 roku, kiedy została asystentem w Katedrze Chemii Organicznej UW, Jej działalność na trwałe związała się z Uniwersytetem Warszawskim. Tu, w 1933 roku uzyskała stopień doktora, a w roku 1939, po habilitacji, tytuł docenta w zakresie chemii organicznej. W okresie okupacji kontynuowała pracę dydaktyczną uczestnicząc w tajnym nauczaniu. Bezpośrednio po wojnie powróciła na Uniwersytet wykładając początkowo chemię organiczną, a — począwszy od 1949 roku — biochemię. W roku 1958 dzięki Jej energii, stanowczości i niezwykle talentowi organizacyjnemu powstała na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UW Katedra Biochemii stając się wkrótce, pod Jej kierownictwem, jednym z wiodących w Polsce ośrodków kształcenia biochemików, a także liczącym się w kraju i zagranicą ośrodkiem badawczym. Katedrą tą, przeorganizowaną w 1969 roku w Instytut Biochemii UW, kierowała Profesor nieprzerwanie, aż do przejścia w 1974 roku, na emeryturę.

Wszechstronne i głębokie zainteresowanie procesami chemicznymi przebiegającymi w żywych organizmach rozbudziło się w Niej jeszcze w okresie studiów. Obdarzona niezwykle pasją poznawania, krytycznym umysłem i rzadko spotykaną intuicją stała się badaczem o wyjątkowo szerokich horyzontach. W twórczości naukowej profesor Chmielewskiej, na którą składa się przeszło 100 publikacji, w tym około 80 prac eksperymentalnych, dostrzec można wiele różnych nurtów. Do najważniejszych z nich należą badania budowy chemicznej niektórych barwników i innych swoistych substancji roślinnych, prace nad syntezą i właściwościami witamin i antywitamin K oraz badania metabolizmu aminokwasów i peptydów w tkankach zwierząt. Do najwybitniejszych Jej osiągnięć należą prace nad tautomerią pirononów, które zaowocowały wysunięciem hipotezy odnośnie mechanizmu działania 2-metylochinoonów w biologicznych układach transportu elektronów opublikowanej w 1960 roku w *Biochimica et Biophysica Acta*. Wiele kierunków badawczych zapoczątkowanych przez profesor Chmielewską jest nadal rozwijanych w Instytucie Biochemii UW przez Jej uczniów. Obok prac o znaczeniu czysto poznawczym znaczące miejsce w Jej twórczości naukowej miały prace o wartości praktycznej. W latach powojennych, współpracując z przemysłem farmaceutycznym, uczestniczyła w opracowaniu

produkcji niektórych ważnych leków, między innymi witaminy K, dikumarolu, kwasu lewulinowego oraz hydrolizatu białkowego do wlewań dożylnych. Za opracowanie ostatniego z wymienionych preparatów kierowany przez nią zespół uzyskał w 1951 roku nagrodę państwową. Była także laureatką wielu innych nagród, w tym przyznanej Jej w 1979 roku nagrody Fundacji im. A. Jurzykowskiego. Została odznaczona Krzyżem Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski i medalem Zasłużonego Nauczyciela PRL.

Profesor Irena Chmielewska z głębokim poczuciem obowiązku poświęcała się pracy organizacyjnej na rzecz nauki polskiej. Powołana w 1964 roku na członka korespondenta, a w roku 1971 na członka rzeczywistego PAN z energią i oddaniem uczestniczyła w pracach Akademii, m.in. w latach 1971—73 zasiadała w Prezydium PAN. Była członkiem założycielem, wiceprezesem pierwszego Zarządu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i wieloletnim redaktorem naczelnym „Postępów Biochemii”. Wybitne zasługi profesor Chmielewskiej dla rozwoju polskiej biochemii uhonorowane zostały przyznaniem Jej przez Towarzystwo godności Członka Honorowego. Działalność na rzecz nauki polskiej kontynuowała po przejściu na emeryturę uczestnicząc w pracach rad naukowych kilku instytutów i rad redakcyjnych czasopism naukowych.

W pamięci licznej grupy Jej uczniów i wychowanków, wśród których jest już kilkunastu samodzielnych pracowników nauki, pozostanie przede wszystkim Jej niezwykle silna osobowość. Takie cechy Jej charakteru jak bezkompromisowość, odwaga, wierność słowom i poglądom, upór i konsekwencja w dążeniu do stawianych sobie celów, głębokie zaangażowanie w sprawy nauki polskiej i całego Kraju oraz wielka życzliwość dla ludzi zyskały Jej na zawsze nasz najgłębszy podziw i szacunek. Żegnając w głębokim smutku profesor Irenę Chmielewską mamy świadomość tego, że odszedł od nas nie tylko wielki uczony i organizator nauki, lecz również Człowiek o wielkim sercu — nasz prawdziwy Przyjaciel.

Uczniowie



PROFESOR DR MED. JANUSZ GREGORCZYK
1938—1986

Dnia 11 grudnia 1986 roku zmarł profesor Janusz Gregorczyk, Kierownik Katedry i Zakładu Biochemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie.

Urodził się 10 lipca 1938 roku w Chorzowie, w rodzinie lekarskiej. Szkołę średnią i studia medyczne na Wydziale Lekarskim Śląskiej Akademii Medycznej ukończył z wyróżnieniem. Swoje zainteresowania badawcze realizował już w trakcie studiów w Zakładzie Chemii Fizjologicznej, gdzie pod światłym kierunkiem profesora Stanisława Józkiwicza rozwijał swój talent badacza i dociekliwego naukowca. W 1964 roku uzyskał stopień doktora nauk medycznych w Śląskiej Akademii Medycznej. Za badania zmian biochemicznych towarzyszących działaniu hałasu i ultradźwięków otrzymał nagrodę II stopnia Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego.

W 1965 r. dr Gregorczyk podejmuje pracę w Klinice Chorób Wewnętrznych PAM w Szczecinie i przystępuje energicznie do organizowania nowoczesnego laboratorium biochemicznego. Tworzy specjalistyczny i wielofunkcyjny Zakład Biochemii Klinicznej na skalę regionu i zostaje jego kierownikiem. Z potrzeb środowiska zajmuje się początkowo problemami patologii przewlekłych zatruc dwusiarczkiem węgla. W 1971 r. habilituje się w Śląskiej Akademii Medycznej na podstawie rozprawy o zmianach potokowych we frakcjach subkomórkowych narządów mięszkowych w eksperymentalnym CS_2 . Z tego okresu na uwagę zasługują prace nad przydatnością diagnostyczną oznaczeń izoenzymów dehydrogeazy mleczanowej i jabłczanowej w chorobach wewnętrznych. Inicjuje i rozwija badania metabolizmu lipidów i zmian naczyniowych w przebiegu zatrucia CS_2 . Także w latach następnych jego zainteresowania badawcze dotyczyły patologii biochemicznej układu sercowo-naczyniowego. W 1982 r. Rada Państwowa nadała docentowi Januszowi Gregorczykowi tytuł profesora nadzwyczajnego. Od 1984 r. pełnił funkcję Prorektora do spraw Klinicznych PAM. Był nauczycielem młodzieży akademickiej poczynając od kształcenia w kole naukowym, po wprowadzanie nowoczesnego programu nauczania analityki lekarskiej.

W 1968 r. ożywia działalność Szczecińskiego Oddziału PTBioch. przewodnicząc do 1975 i w latach 1981—1983 r. Organizuje w tym czasie z Jemu właściwym rozmachem VIII Zjazd PTBioch. i trzykrotnie Dni Biochemiczne PAM, a w 1979 r. Zjazd PTDL. Był członkiem ZG PTBioch. w latach 1969—1971 i 1983—1986, a od 1972 r. należał do Rady Redakcyjnej „Postępów Biochemii”. Był czynny w licznych komisjach i stowarzyszeniach naukowych w kraju. Za działalność naukową, dydaktyczno-organizacyjną i społeczną Profesor otrzymywał wielokrotnie nagrody,

a w 1983 r. został odznaczony Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski. Pozamedyczne zainteresowania profesora objawiały się czynną działalnością w akademickich klubach turystycznych „Gronie” i „Ostańce” w Katowicach oraz w PTTK w Szczecinie, gdzie pełnił odpowiedzialne funkcje. Był przyrodnikiem — humanistą, znawcą historii i literatury.

Profesor Janusz Gregorczyk był ceniony jako lekarz, współpracownik, przyjaciel we wszystkich środowiskach, w których się udzielał. Był niezwykle serdeczny i otwarty dla potrzebujących pomocy, rady i wsparcia. Żarliwy w działaniu i twórczy. Pełen pomysłów i energii. Żądny nowości, wiedzy i nowoczesnych rozwiązań. Entuzjasta postępu i nowych myśli technicznych. Pociągał innych swoją osobowością i radością tworzenia. Z nimi budował swój Zakład i zespół.

Uczniowie i współpracownicy

Od Redakcji

Rozpoczynamy publikację serii artykułów pod ogólnym tytułem „Czynniki wzrostowe”. W bieżącym zeszycie przedstawiamy następujące teksty:

- Czynniki wzrostowe — nowa rodzina peptydów regulacyjnych,
- Interferony jako nieklasyczne hormony współdziałające z czynnikami wzrostowymi,
- Transformujące czynniki wzrostowe,
- Produkty niektórych onkogenów a czynniki wzrostu komórkowego,
- Nobel 1986 w dziedzinie medycyny,

W kolejnych zeszytach zamierzamy zamieścić artykuły omawiające:

- czynnik wzrostowy z płytek krwi,
- czynnik wzrostu nerwu *,
- czynniki wzrostowe a cytoszkielet,
- czynniki wzrostowe a cykl komórkowy.

Zapraszamy Czytelników do dyskusji przedstawionych w artykułach hipotez na temat roli biologicznej i mechanizmów działania czynników wzrostowych.

* W terminologii polskiej przyjęto jako zasadę używanie terminu „czynniki wzrostowe” (po angielsku growth factors). Czynniki pobudzający wzrost komórek nerwowych (po angielsku nerve growth factor) przyjęto określać jako „czynnik wzrostu nerwu”. W tekstach poniżej zamieszczonych nie wszędzie zastosowano konsekwentnie w/w zasadę.

ARTYKUŁY

ANDRZEJ KLEIN *

Czynniki wzrostowe — nowa rodzina peptydów regulacyjnych

Growth factors — a new family of regulatory peptides

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Peptydy regulacyjne
- III. Kontrola wzrostu i różnicowania komórek
- IV. Peptydowe czynniki wzrostowe
 - V. Molekularne podstawy działania czynników wzrostowych
 - V-1. Wielokierunkowy efekt działania czynników wzrostowych
 - V-2. Rola receptorów w regulacji działania czynników wzrostowych
 - V-3. Wewnątrzkomórkowy układ przekazywania sygnału mitogennego
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Regulatory peptides
- III. Control of growth and differentiation
- IV. Peptide growth factors
 - V. Molecular basis of the growth factor action
 - V-1. Pleiotropic effect of growth factors
 - V-2. Involvement of receptors in the regulation of growth factor action
 - V-3. Intracellular messenger system of the mitogenic signal transmission
- VI. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: IL — interleukina, CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii, (M — makrofagów, G — granulocytów), DF — czynnik różnicowania, Sm — somatomedyna, MSA — aktywność stymulująca namnażanie komórek, EP — endogenny pyrogen, LEM — endogenny mediator leukocytozy, HSF — czynnik stymulujący hepatocyty, GnRF — gonadoliberyna, TRF — czynnik zastępujący allogeniczne komórki T, TRH — tyreoliberyna, GF — czynnik wzrostowy, LH — hormon luteinizujący, FSH — hormon pobudzający pęcherzyki Graafa, EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy.

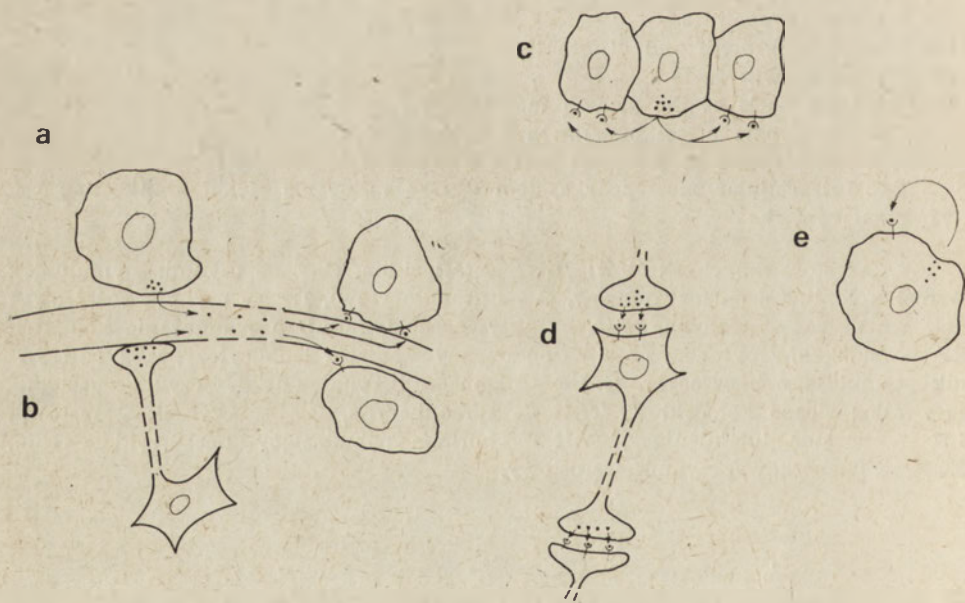
* Doc. dr hab., Zakład Biochemii Zwierząt, IBM UJ,
31-120 Kraków, al. Mickiewicza 3

I. Wstęp

Od odkrycia pierwszego „chemicznego posłańca” — sekretyny [1] minęło 85 lat, lecz mimo to poznanie dalszych peptydów o podobnych właściwościach przebiegało stosunkowo wolno i przez szereg dziesięcioleci ograniczone było przede wszystkim do hormonów. Wprowadzenie bardzo czułych metod radioimmunologicznych i radioreceptorowych oraz nowych technik rozdzielczych przyniosło w okresie ostatnich 10—15 lat bardzo wiele doniesień na temat nieznanych dotąd peptydów o aktywności: hormonalnej, neurohormonalnej, neurotransmisyjnej, neuromodulacyjnej, immunoregulacyjnej czy mitogennej. Wszystkie te peptydy pośredniczą w przekazywaniu informacji biologicznej pomiędzy komórkami organizmów żywych i określane są często wspólną nazwą peptydów regulacyjnych.

II. Peptydy regulacyjne

Trudno określić dzisiaj precyzyjnie jak liczna jest rodzina peptydów regulacyjnych. Do roku 1985 poznano całkowicie sekwencję aminokwasową około 70-ciu różnych peptydów regulacyjnych ssaków, a eksponentyjny wzrost liczby związków scharakteryzowanych strukturalnie w latach 1970—1985 [2] sugeruje, że jest ich znacznie więcej. Sposób



Ryc. 1. Przekaz informacji biologicznej na drogach: endokrynnej (a), neuroendokrynnej (b), parakrynnej (c), neuroparakrynnej (d) i autokrynnej (e).

przekazu informacji biologicznej jest wspólny dla większości znanych peptydów regulacyjnych i odbywa się poprzez swoiste receptory usytuowane w błonie plazmatycznej komórek docelowych. Różna może być droga, na której peptydy regulacyjne przenoszone są od komórek wydzielniczych do komórek docelowych, a także różny może być charakter i mechanizm odpowiedzi komórkowej.

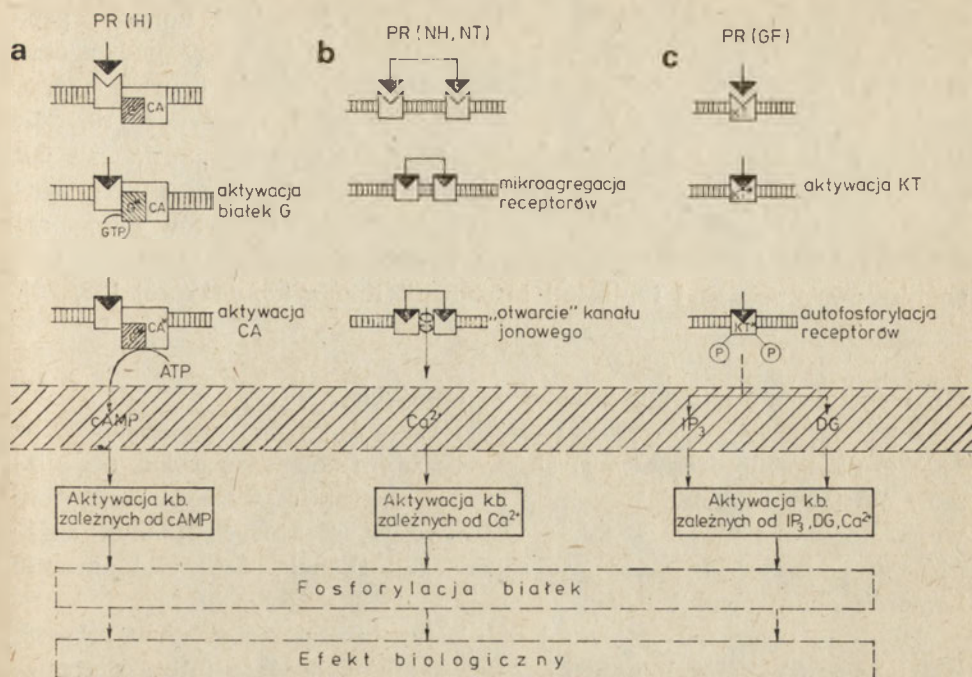
Przyjmuje się obecnie trzy podstawowe sposoby przekazywania informacji międzykomórkowej, w których pośredniczą peptydy: endokryny, parakryny i autokryny (Ryc. 1). Transport endokryny, w którym peptyd regulacyjny syntetyzowany przez wyspecjalizowane komórki, wydzielany jest do krwioobiegu i przenoszony z krwią do komórek docelowych (Ryc. 1a). Ten sposób transportu jest typowy dla hormonów dokrewnych. Podobny sposób przenoszenia informacji biologicznej przyjmuje się dla peptydów regulacyjnych wydzielanych do krwioobiegu z zakończeń komórek nerwowych (tzw. transport neuroendokryny — Ryc. 1b), charakterystyczny między innymi dla neurohormonów podwzgórza. Hipoteza transportu parakrynnego zakłada, że peptydy regulacyjne są przenoszone na drodze dyfuzji międzykomórkowej (Ryc. 1c). Przypuszczalnie wiele hormonów, neurohormonów i czynników wzrostowych działa lokalnie na tej drodze. Podobny sposób transportu (neuroparakryny) przyjmuje się w przypadku przenoszenia sygnału poprzez synapsy chemiczne w obrębie układu nerwowego (Ryc. 1d). Hipoteza regulacji autokryny przyjmuje, że komórkami docelowymi są te same komórki, które syntetyzują i wydzielają peptyd regulacyjny (Ryc. 1e). Regulacja autokryna ma przypuszczalnie istotne znaczenie w kontroli wzrostu komórek neoplastycznych [3], aczkolwiek autoregulacja jest zjawiskiem wielokrotnie stwierdzanym także w hodowlach komórek nie-transformowanych [4, 5, 6]. Fizjologiczne znaczenie regulacji autokryny pozostaje narazie w sferze hipotez.

Opisane możliwości transportu peptydów regulacyjnych nie oznaczają jednak, że każdy peptyd regulacyjny posiada jeden określony sposób przenoszenia informacji od komórek wydzielniczych do komórek docelowych. Ten sam peptyd może być przenoszony na różnych drogach w zależności od jego funkcji fizjologicznej i rodzaju tkanki docelowej.

Jakkolwiek nie zdołano dotychczas wyjaśnić całkowicie mechanizmu działania żadnego z peptydów regulacyjnych, wiadomo, że każdy z nich wywiera swój efekt biologiczny poprzez interakcję ze swoistymi receptorami w błonie komórek docelowych. Związanie liganda z receptorem inicjuje serię zdarzeń prowadzących do określonej odpowiedzi komórkowej. Pierwszym i przez długi czas niewyjaśnionym pytaniem były dalsze losy kompleksu peptyd-receptor. Możliwość, że peptydy mogą wnikać do wnętrza komórki nie była poważnie brana pod uwagę do połowy lat 70-tych naszego stulecia. Panowała bowiem powszechnie opinia,

że hormony peptydowe w przeciwieństwie do hormonów sterydowych wiążą się odwracalnie z receptorami na powierzchni błony i nie mogą aktywnie lub biernie przenikać do wnętrza komórki. Dowód, że znakowany izotopem jodu (^{125}I) naskórkowy czynnik wzrostowy (EGF) jest aktywnie wchłaniany (internalizowany) do wnętrza komórki został przedstawiony przez Carpentera i Cohena w roku 1976 [7] i potwierdzony przy użyciu metod morfologicznych w latach 1978—1979 [8, 9]. Wiadomo obecnie, że peptydy regulacyjne po związaniu z receptorem ulegają internalizacji na drodze endocytozy. Internalizacja rozpoczyna się poprzez tworzenie opłaszczonych klatryną pęcherzyków endocytarnych. Kompleksy są następnie przenoszone do wnętrza komórki w postaci nieopłaszczonych pęcherzyków, określanych zazwyczaj mianem receptosomów i degradowane w wyniku fuzji z lizosomami [10]. Dyskusyjny dotychczas jest udział innych organeli wewnątrzkomórkowych w tzw. segregacji receptosomów oraz degradacji enzymatycznej liganda i receptora [10].

Wiadomości na temat mechanizmu działania peptydów regulacyjnych ograniczają się głównie do wczesnych etapów odpowiedzi komórkowej. Można wyróżnić przynajmniej trzy odmienne sposoby odpowiedzi komórkowej (Ryc. 2), różniące się przede wszystkim rodzajem tzw. drugiego przekaźnika informacji biologicznej. Najdawniej i najdokładniej opisano mechanizm działania peptydów regulacyjnych z udziałem cAMP jako drugiego przekaźnika, charakterystyczny dla większości hormonów peptydowych (Ryc. 2a). Połączenie liganda z receptorem aktywuje układ białek wiążących nukleotydy guanylowe (tzw. białek G) złożony z trzech podjednostek α , β , γ [11, 12]. Kompleksy białek G posiadają zdolność zarówno stymulacji (kompleksy G_s), jak i hamowania (kompleksy G_i) układu cykazy adenylanowej [13, 14]. Stymulacja cykazy adenylanowej prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP, który aktywuje zależne od cAMP kinazy białkowe, a te z kolei powodują fosforylację swoistych białek, modyfikację ich funkcji i określony efekt biologiczny. Stosunkowo niedawno zaproponowano dwa inne mechanizmy działania peptydów regulacyjnych: jeden, w którym rolę drugiego przekaźnika spełniają jony wapnia (Ryc. 2b) oraz drugi, w którym podobną rolę odgrywają 1,4,5-trifosfoinozytol i 1,2-diacylglicerol (Ryc. 2c). Przyпуска się, że niektóre neuropeptydy powodują swoistą mikroagregację receptorów komórkowych, która z kolei prowadzi do otwarcia kanałów wapniowych w błonie cytoplazmatycznej [15]. Podniesienie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} aktywuje zależne od Ca^{2+} kinazy białkowe i dalsze etapy odpowiedzi komórkowej [16]. Wczesne etapy stymulacji mitogennej indukowanej przez czynniki wzrostowe opisuje hipoteza, według której podstawową rolę w generowaniu sygnału odgrywać ma stymulacja obrotu fosfatydyloinozytoli, a funkcję drugiego przekaźnika 1,4,5-trifosfoinozytol i 1,2-diacylglicerol [17, 18, 19, 20]. Aktu-



Ryc. 2. Hipotezy udziału cAMP, jonów Ca^{2+} oraz IP_3 i DA jako tzw. drugich przekaźników informacji przenoszonej przez peptydy regulacyjne. PR — peptyd regulacyjny, H — hormon, NH — neurohormon, NT — neurotransmitter, GF — czynnik wzrostu, CA — cyklaza adenylylanowa, G — białka G, KT — tyrozyno-swoista kinaza białkowa, IP_3 — 1,4,5-trifosfoinozytol, DA — 1,2-diacylglicerol, k.b. — kinazy białkowe.

alne poglądy dotyczące mechanizmu działania czynników wzrostu zostały omówione w rozdziale V.

Schematy działania peptydów regulacyjnych przedstawione na rycinie 2 ilustrują jedynie różnice dotyczące drugiego informatora. Nie wyjaśniają one ani swoistej aktywności biologicznej poszczególnych peptydów, ani nie obejmują wszystkich możliwości inicjacji odpowiedzi komórkowej. Trwające od wielu lat badania różnorodnych efektów regulacyjnych insuliny i tworzone na tej podstawie hipotezy molekularnych podstaw jej działania są doskonałą ilustracją złożoności tego problemu [21]. Mimo niepełnej informacji o mechanizmie działania peptydów regulacyjnych wiadomo, że określony peptyd może w tej samej komórce docelowej indukować różne efekty biologiczne poprzez niezależne od siebie drogi odpowiedzi wewnątrzkomórkowej. Przykładowo, działanie gonadoliberyny na komórki przysadki mózgowej stymuluje zarówno syntezę jak i sekrecję hormonów gonadotropowych. Mechanizm przekazu informacji angażujący jony Ca^{2+} (Ryc. 2b) związany jest wyłącznie z wydzielaniem LH i FSH, natomiast stymulacja biosyntezy tych hormonów re-

gulowana jest na innej, nieznannej dotychczas drodze [16]. Ponadto, peptydy o podobnej funkcji fizjologicznej (np. neurohormony podwzgórza GnRH i TRH) mogą inicjować odpowiedź komórkową poprzez różne, wewnątrzkomórkowe drogi przekazu informacji biologicznej [16, 22]. Mechanizm odpowiedzi komórkowej zależy zarówno od „posłańca” jak i od „odbiorcy” informacji. Działanie insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostowych na komórki: mięśni gładkich, adipocytów i komórki tkanki łącznej jest przekonującym dowodem takiej interpretacji mechanizmów przekazu i realizacji informacji międzykomórkowej [23, 24].

III. Kontrola wzrostu i różnicowania komórek

Wzrost jest procesem charakterystycznym dla wszystkich organizmów żywych. Jakkolwiek cechuje przede wszystkim wczesne etapy rozwoju, pozostaje niekiedy także właściwością niektórych tkanek organizmów dorosłych (zdolność do regeneracji tkanek, stałe zastępowanie komórek obumarłych).

Kontrola procesów wzrostu i różnicowania jest sumą wielu różnych oddziaływań, z których najistotniejsze są: bezpośrednia interakcja międzykomórkowa oraz regulacja poprzez związki pośredniczące w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych (peptydy, sterydy, prostaglandyny itp.). Pośród różnych związków zaangażowanych w regulacji wzrostu, peptydy były szczególnie intensywnie badane w okresie ostatnich kilkunastu lat. Przez analogię do innych peptydów regulacyjnych przyjmuje się, że ostateczny efekt może być wynikiem działania związków, które w stężeniu fizjologicznym stymulują wzrost (tzw. czynniki wzrostowe) oraz związków, które w stężeniu fizjologicznym hamują wzrost komórkowy. Najczęściej przyjmowanym kryterium aktywności biologicznej są: stymulacja lub hamowanie syntezy DNA i proliferacji komórek w hodowlach *in vitro*.

Postęp w biologii czynników wzrostowych jest szybki i wyraźnie zarysowuje się już rodzina peptydów o określonych własnościach chemicznych i biologicznych. Natomiast, wyniki badań inhibitorów wzrostu komórkowego nie pozwalają na stworzenie jasnego obrazu tej grupy związków. Dyskusyjna, mimo intensywnych badań rola chalonów [25—28], problematyczna hipoteza działania deprimeronów [29—32], zbyt skąpe jeszcze wiadomości na temat inhibitora(ów) somatomedyn [33—35] czy czynników hamujących wzrost nowotorowy (TIFs- ang. tumor inhibition factors) [36—39] oraz sporadyczne doniesienia o innych peptydowych inhibitorach wzrostu [40—48] powodują, że próby uogólnienia dotychczasowych wyników wydają się przedwczesne.

Rola interferonów w regulacji wzrostu komórkowego została obszernie omówiona w artykule A. In g l o t.

IV. Peptydowe czynniki wzrostowe

Trudno podać dziś precyzyjną definicję peptydowych czynników wzrostu komórkowego. Wśród różnych propozycji na uwagę zasługuje definicja zaproponowana w roku 1984 przez R. Jamesa i R. A. Bradshawa [49]. Według tej definicji czynnikami wzrostowymi nazywamy peptydy inicjujące odpowiedź anaboliczną komórek docelowych, działające poprzez określony mechanizm błonowy: a. zapoczątkowanie odpowiedzi komórkowej następuje po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej; b. odpowiedź komórkową inicjuje utworzenie kompleksu czynnika wzrostowego z receptorem komórkowym; c. swoista odpowiedź (hipertroficzna lub hiperplastyczna) jest wynikiem tworzenia kompleksu czynnik wzrostowy — receptor; d. czynnik wzrostowy i receptor są usuwane z powierzchni komórki na drodze endocytozy poprzez internalizację kompleksu i degradowane wewnątrzkomórkowo. Jak łatwo zauważyć, definicja ta nie zawęża pojęcia czynnika wzrostowego wyłącznie do peptydów o aktywności mitogennej oraz podkreśla receptorowy mechanizm działania czynników wzrostowych i nie pozostawia wątpliwości do jakiej rodziny związków należy je zaliczyć.

„Ojcem chrzestnym” peptydowych czynników wzrostowych jest Stanley Cohen z uniwersytetu Vanderbilt w Nashville, który nie tylko wyizolował, oczyścił i nazwał dwa pierwsze czynniki wzrostowe: NGF (czynnik wzrostu komórek nerwowych) i EGF [50, 51], ale ponadto scharakteryzował chemicznie receptor komórkowy EGF i wykazał, że jego część wewnątrzkomórkowa posiada aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej [52, 53].

Od momentu odkrycia pierwszego peptydowego czynnika wzrostowego do końca 1985 roku wyizolowano i przynajmniej częściowo scharakteryzowano kilkadziesiąt innych. Alfabetyczną listę peptydowych czynników wzrostowych komórek zwierzęcych i ludzkich przedstawiono w tabeli 1. Ze względu na bardzo zróżnicowaną ilość informacji dotyczących poszczególnych związków, rzeczywista liczba czynników wzrostowych jest obecnie trudna do ustalenia.

Jest bardzo prawdopodobne, że czynniki wzrostowe są związkami o konserwatywnej ewolucyjnie strukturze i funkcji. Przykładowo, krew minoga i człowieka zawierają podobne stężenie (15—20 ng/ml) nierozróżnialnego immunologicznie PDGF, a pojawienie się tego peptydu w rozwoju ewolucyjnym kręgowców poprzedza o setki milionów lat wykształcenie płytek krwi [140].

Na podstawie dotychczas uzyskanych danych można zaproponować różne klasyfikacje czynników wzrostowych. W tabeli 2 zebrano przykłady ich klasyfikacji oparte na: podobieństwie struktury chemicznej, rodzaju komórek docelowych, prawdopodobnej roli fizjologicznej i kolejności działania w cyklu komórkowym. Żadna z przedstawionych kla-

Tabela 1

Peptydowe czynniki wzrostowe różnicowania komórek*)

Czynnik wzrostowy	skrót nazwy w j. angielskim	Akronimy*	Pismiennictwo
Czynnik aktywacji limfocytów	LAF	IL-1, EP, LEM, HSF	54, 55, 56, 57
Czynnik dojrzewania gleju	GMF	—	58
Czynnik różnicowania limfocytów B (I)	BCDF-I	—	59, 60
Czynnik różnicowania limfocytów B (II)	BCDF-II	TRF	61, 62
Czynnik różnicowania megakariocytów	MkDF	—	63
Czynnik wzrostu asterocytów	AGF	—	64, 65
Czynnik wzrostu chondrocytów	CGF	—	66, 67
Czynnik wzrostu fibroblastów	FGF	—	68, 69, 70, 71
Czynnik wzrostu keratynocytów	KGF	—	72
Czynnik wzrostu komórek glejowych	GGF	—	73
Czynnik wzrostu komórek hemopoetycznych	HCGF	IL-3, PSF, multi-HGF	74, 75, 76
Czynnik wzrostu komórek naskórka	EGF	urogastron**	77, 78, 79
Czynnik wzrostu komórek nerwowych	NGF	—	80, 81, 82
Czynnik wzrostu komórek śródbłonna	ECGF	—	83, 84, 85
Czynnik wzrostu limfocytów T	TCGF	IL-2	86, 87, 88, 89
Czynnik wzrostu limfocytów B	BCGF	—	90
Czynnik wzrostu makrofagów	MGF	M-CSF, CSF-1	91, 92, 93
Czynnik wzrostu melanocytów	—	—	94
Czynnik wzrostu neutrofilii	NeuGF	G-CSF, DF	95, 92, 93
Czynnik wzrostu neutrofilii (makrofagów)	NMGF	GM-CSF, CSF-2	96, 97, 93
Czynnik wzrostu szkieletu	SGF	—	98, 99
Czynnik wzrostu wiążący się z heparyną	α -HGF	—	100

Czynnik wzrostu wyizolowany z chrząstki	CDGF	101, 102
Czynnik wzrostu wyizolowany z fibroblastów	FDGF	103, 104
Czynnik wzrostu wyizolowany z glejaka	GDGF	105, 106
Czynnik wzrostu wyizolowany z komórek śródbłonnika	ECDFG	107, 108
Czynnik wzrostu wyizolowany z kości (I)	BDGF-1	109, 110, 111
Czynnik wzrostu wyizolowany z kości (2)	BDGF-2	109, 110, 111
Czynnik wzrostu wyizolowany z macicy	UDGF	112, 119
Czynnik wzrostu wyizolowany z mięsaka kości	ODGF	114
Czynnik wzrostu wyizolowany z nerki	KDGF	113
Czynnik wzrostu wyizolowany z oka	EDGF	115, 116
Czynnik wzrostu wyizolowany z płytek krwi	PDGF	117, 118, 119
Czynnik wzrostu wyizolowany z podwzgórza	HDGF	120
Czynnik wzrostu wyizolowany z przysadki	PitDGF	113, 121
Czynnik wzrostu wyizolowany z siatkówki	RDGF	122
Czynnik wzrostu wyizolowany z wątrobiaka	—	123
Erytropoetyna	EPO	124, 125, 93
Hepatotropina	—	126
Insulino-podobny czynnik wzrostu (I)	IGF-I	23, 24, 127, 128, 129
Insulino-podobny czynnik wzrostu (II)	IGF-II	23, 24, 130
Swisty czynnik wzrostu tymocytów	TSGF	131
Substancja stymulująca hepatocyty	HSS	132
Transformujący czynnik wzrostu (typu α)	TGF- α	133, 134, 135, 136
Transformujący czynnik wzrostu (typu β)	TGF- β	134, 135, 136, 137
Transformujący czynnik wzrostu (typu γ)	TGF- γ	138, 139
	SmC, SmA	
	MSA***	
	—	
	—	
	TGF-1	
	TGF-2	
	—	

* — pełne nazwy podano na początku artykułu; ** — ludzki odpowiednik mysiego EGF; *** — szczurzy odpowiednik ludzkiego IGF II

Redakcja przypomina, że w terminologii polskiej obowiązują terminy: czynnik wzrostowy. Tylko nerve growth factor tłumaczymy jako czynnik wzrostu nerwu.

Tabela 2

Przykłady podziału rodziny peptydowych czynników wzrostowych w oparciu o: podobieństwo strukturalne (a), rodzaj komórek docelowych (b), prawdopodobną funkcję fizjologiczną (c) i kolejność działania w fazie opóźniania (d)

a. Strukturalnie podobne	b. Swoiste komórkowo	c. Zdeterminowane fizjologicznie	d. Działające w określonej kolejności
<p>1. Podobne do PDGF PDGF, GDGF, FDGF, ODGF,</p> <p>2. Podobne do EGF, EGF, TGF-α</p> <p>3. Podobne do insuliny IGF I, IGF II</p>	<p>1. Troficzne dla komórek śródbłonka ECGF, FGF, EDGF, αHGF HDGF, RDGF, CDGF</p> <p>2. Limfocytotroficzne IL-1, IL-2, BCGF, BCDF I, BCDF II</p> <p>3. Neutrotroficzne NGF, AGF, GGF, GMF</p> <p>4. Hemopoetyczne HCGF, MGF, NMGF, EP, MKDF, NeuGF</p>	<p>1. Związane z normalnym rozwojem, organizmu EGF, IGF I, IGF II, NGF, FGF</p> <p>2. Związane z programową odnową tkanek hemopoetyczne</p> <p>3. Uczestniczące w procesie gojenia ran PDGF, ECGF, EGF, TGF-β</p> <p>4. Regulujące wzrost komórek neoplastycznych GDGF, FDGF, UDGF, ODGF, KDGF, PitDGF, TGF(α, β, γ)</p>	<p>1. Kompetencyjne PDGF, FGF, MDGF</p> <p>2. Progresywne EGF, IGF I, IL-1, TSGF, hepa-totropina</p>

syfikacji nie obejmuje całej rodziny czynników wzrostowych przede wszystkim ze względu na nadal zbyt skromną i nierównocenną dokumentację doświadczalną. Tym niemniej, każda z zamieszczonych w tabeli 2 klasyfikacji niesie inną, istotną informację biologiczną. Podobieństwo strukturalne uzasadnia z jednej strony możliwość zastępowania czynników wzrostowych komórek prawidłowych (PDGF, EGF) przez analogiczne peptydy syntetyzowane przez komórki transformowane (ODGF, GDGF, TGF- α) [141, 142], z drugiej strony wyjaśnia zdolność do naśladowania niektórych efektów fizjologicznych charakterystycznych dla insuliny przez insulino-podobne czynniki wzrostowe [23, 24]. Mnogość różnych czynników działających na określony typ komórki (Tab. 2b) uzmysławia, jak skomplikowany i wieloetapowy jest proces regulacji wzrostu i różnicowania w obrębie poszczególnych tkanek. Przykład współdziałania hemopoetycznych czynników wzrostowych w procesie różnicowania komórek szpiku kostnego [92, 93] jest doskonałą ilustracją tego zagadnienia. Dyskusyjne jest przyjęcie przypuszczalnej roli fizjologicznej jako kryterium klasyfikacji peptydowych czynników wzrostowych. Dotychczas nie udowodniono w doświadczeniach *in vivo* znaczenia fizjologicznego żadnego ze znanych czynników wzrostowych. Tym niemniej udział insulino-podobnych czynników wzrostowych w regulacji wzrostu tkanki łącznej [24], prawdopodobna rola EGF w postnatalnym wzroście śluzówki jelitowo-żołądkowej [143] czy współuczestnictwo czynników wzrostowych magazynowanych w płytkach krwi (PDGF, EGF, β -TGF) w procesach gojenia ran [144] są wysoce prawdopodobne. Szczególne znaczenie w zrozumieniu sposobu działania czynników wzrostowych ma podział tych związków na czynniki kompetencyjne i progresywne. W latach 1977—1978 P l e d g e r i w s p. [145, 146] przedstawili „kompetencyjno-progresywną” hipotezę regulacji cyklu komórkowego, uwzględniającą sekwencję czasową działania czynników wzrostowych. Wpływ czynników wzrostowych na cykl komórkowy bada się najczęściej w doświadczeniach, w których egzogenne czynniki są dodawane do komórek spoczynkowych, których wzrost zatrzymany został w wyniku dużej gęstości komórek, lub poprzez obniżenie stężenia surowicy w płynie hodowlanym. Zdarzenia regulacyjne powodujące wyjście komórek z fazy G_0 następują w określonej kolejności i kończą się po kilkunastu godzinach (w warunkach optymalnych) pobudzeniem syntezy DNA. Okres przedreplikacyjny, nazywany fazą latencji lub fazą opóźniania (ang. lag fase), obejmuje przedział czasowy od momentu przyłączenia czynnika wzrostowego do receptorów spoczynkowych komórek docelowych do początku fazy S. Długość fazy opóźniania zależy od rodzaju komórek oraz warunków hodowli i można ją modyfikować stosując takie czynniki regulacyjne jak: hormony peptydowe, prostaglandyny, inhibitory wzrostu itp. W optymalnych warunkach hodowli długość fazy opóźniania fibroblastów mysich Balb/c 3T3 wynosi około 12 godzin.

Działanie czynników wzrostowych takich jak: PDGF, FGF czy MDGF powoduje, że po określonym czasie od momentu ich przyłączenia do receptorów błonowych, komórki stają się zdolne (kompetentne) do odpowiedzi na czynniki progresywne, umożliwiające przejście komórek z fazy G_1 do fazy S. Wykazano, że stan kompetencji można przenosić na drodze fuzji komórkowej z komórek poddanych działaniu PDGF na komórki spoczynkowe [147] oraz, że kompetencja utrzymuje się po neutralizacji zewnątrzkomórkowego PDGF przez przeciwciała wytworzone przeciw temu czynnikowi wzrostowemu [148]. Stwierdzono także, że stan kompetencji jest okresem względnie trwałym i w przypadku działania PDGF na komórki 3T3 utrzymuje się przez 10–12 godzin [149]. W chemicznie zdefiniowanym płynie hodowlanym komórki 3T3 wymagają trzech peptydowych czynników wzrostowych do przejścia przez pełny cykl komórkowy: PDGF (czynnika kompetencyjnego) oraz EGF i IGF I (czynników progresywnych) [150]. Spoczynkowe komórki 3T3 pod wpływem PDGF stają się kompetentne po okresie około 2 godzin i wymagają współdziałania EGF i IGF I do rozpoczęcia po dalszych 10-ciu godzinach syntezy DNA. EGF działa w początkowym okresie fazy G_1 , podczas gdy IGF I jest konieczny do wejścia komórek w fazę S. Jeżeli, po czasie około 12-tu godzin od dodania do hodowli komórkowej PDGF (i EGF), dodany zostanie IGF I komórki prawie natychmiast rozpoczynają syntezę DNA, jeśli IGF I nie zostanie dodany, komórki przechodzą w fazę spoczynkową (G_0). Przedstawiona hipoteza regulacji cyklu komórkowego jest zgodna ze stwierdzonym doświadczalnie sukcesywnym ujawnianiem receptorów czynników wzrostowych kolejno działających w fazie przedreplikacyjnej [151].

Kompetencyjno-progresywna hipoteza stymulacji wzrostu komórkowego obrazuje wielostopową regulację cyklu komórkowego i nie uwzględnia różnic wynikających z rodzaju tkanki docelowej. A różnice takie stwierdzono, nawet w przypadku komórek o podobnym pochodzeniu. Wykazano, że fibroblasty skóry ludzkiej w hodowli *in vitro* wymagają wyłącznie jednego czynnika wzrostowego (PDGF lub EGF) do progresji przez pełny cykl komórkowy [152]. Wyniki te nie są jednak sprzeczne z założeniami hipotezy kompetencyjno-progresywnej, ponieważ fibroblasty ludzkie mogą syntetyzować i wydzielać do płynu hodowlanego zarówno czynniki kompetencyjne [153] jak i progresywne [154].

V. Molekularne podstawy działania czynników wzrostowych

Większość dotychczasowych wiadomości o mechanizmie działania peptydowych czynników wzrostowych pochodzi z prac dotyczących PDGF, EGF, NGF, TGF i IGF I. Tworzony na ich podstawie obraz odpowiedzi komórkowej wskazuje na wiele cech wspólnych dla różnych czynników

wzrostowych. Dotyczy to zwłaszcza wczesnych etapów odpowiedzi komórkowej, związanych z wewnątrzkomórkowym przekazaniem sygnału mitogennego. Trudno przypuszczać, aby mechanizm działania różnych czynników wzrostowych był identyczny. Przeczą temu obserwowane różnice w ogólnych efektach anabolicznych, związanych pośrednio z regulacją wzrostu, jak również swoista odpowiedź komórkowa wynikająca z określonej funkcji biologicznej komórek docelowych.

V-1. Plejotropowy efekt działania czynników wzrostowych

Związanie czynnika wzrostowego z receptorem komórkowym wywołuje kaskadę reakcji chemicznych, których ostatecznym wynikiem jest wzrost komórkowy. Odpowiedź anaboliczna komórki obejmuje szereg różnych zdarzeń wewnątrzkomórkowych, przebiegających na różnych poziomach subkomórkowych i w różnym czasie od związania czynnika wzrostu z receptorem komórkowym. Wyróżnia się zazwyczaj: reakcje związane bezpośrednio z przeniesieniem sygnału mitogennego, ogólne efekty anaboliczne towarzyszące procesowi wzrostu oraz reakcje związane ze swoistą, fizjologicznie istotną odpowiedzią komórki.

Komórki rosnące wymagają syntezy wielu różnych związków niezbędnych do budowy elementów strukturalnych i prawidłowego funkcjonowania komórek. Stymulacji wzrostu towarzyszy wzmożenie szeregu procesów metabolicznych, takich jak: transport jonów [155, 156], glukozy [157, 158, 159], aminokwasów [160, 161, 162], czy biosynteza białek [163, 164, 165], glikozoaminoglikanów [166, 167, 168], lipidów [169, 170], prostaglandyn [171, 172, 173] i cholesterolu [174, 175]. Działaniu czynników wzrostowych towarzyszą również zmiany w strukturze błony komórkowej. Aktualne poglądy na mechanizm i przypuszczalne znaczenie tych zmian przedstawiono w artykule Z. Pietrzkowskiego.

V-2. Rola receptorów w regulacji działania czynników wzrostowych

Szereg publikowanych dotychczas danych wskazuje, że zmiany powinowactwa i liczby receptorów czynników wzrostowych istotnie modulują odpowiedź komórkową [49, 176, 177]. Zmiany w liczbie receptorów na powierzchni komórki docelowej występują pierwotnie jako wynik indukowanej ligandem endocytozy kompleksów czynnik wzrostowy-receptor. Jeśli stopień internalizacji i degradacji receptorów przewyższa poziom syntezy lub recykliczacji receptorów, następuje gwałtowne obniżenie liczby receptorów w błonie komórkowej. Zjawisko to określane w piśmiennictwie anglojęzycznym jako "down-regulation", wykazane w wielu doświadczeniach *in vitro* [178, 179, 180], jest szczególnie istotne w warunkach chronicznego nadmiaru czynnika wzrostowego *in vivo* [181, 182]. Zmiany w powinowactwie receptorów do czynników wzro-

Wielokierunkowe działanie peptydowych czynników wzrostowych

Efekty związane bezpośrednio z regulacją wzrostu	Efekty towarzyszące procesowi wzrostu	Efekty związane ze specyfiką funkcjonalną komórek docelowych (różne dla poszczególnych czynników wzrostowych)
<p>Regulacja ilości i powinowactwa receptorów:</p> <ol style="list-style-type: none"> internalizacja i recykliczacja receptorów komórkowych, transmodulacja receptorów innych czynników wzrostowych. <p>Przeniesienie sygnału mitogennego wewnątrz komórki:</p> <ol style="list-style-type: none"> stymulacja aktywności tyrozyno-swoistej kinazy białkowej, stymulacja metabolizmu fosfatydyloinozytoli, mobilizacja jonów Ca^{2+}, stymulacja wymiany jonów Na^+/H^+ aktywacja seryno- i treonino-swoistych kinaz białkowych, ekspresja genów związanych z regulacją cyklu komórkowego. 	<p>Stymulacja transportu substratów metabolicznych przez błonę komórkową.</p> <p>Stymulacja syntezy makrocząsteczek.</p> <p>Stymulacja syntezy tłuszczów i prostaglandyn.</p> <p>Zmiany morfologiczne komórki i reorganizacja cytoszkieletu.</p>	<p>Wpływ chemotaktyczny PDGF na komórki mięśni gładkich, fibroblasty i monocyty związany z prawdopodobnym udziałem tego peptydu w procesie gojenia ran. Modulacja aktywności disacharydaz śluzówki jelita małego i amylazy trzustkowej przez EGF związana z prawdopodobną rolą tego czynnika w ontogenezie tkanek układu pokarmowego i trzustki.</p>

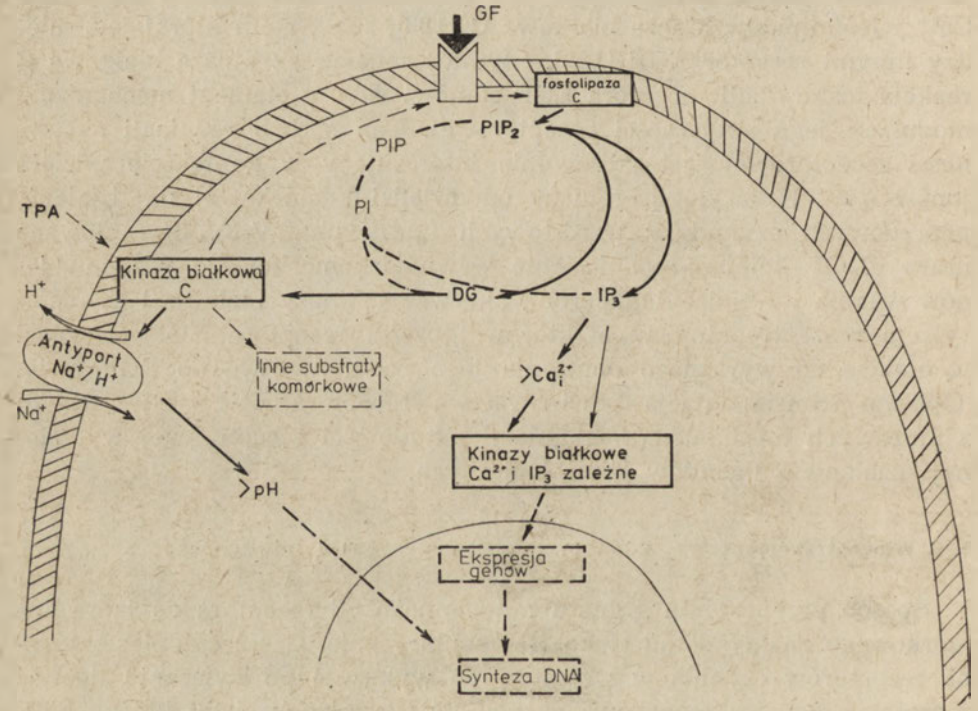
stowych mogą wynikać ze zmian struktury receptorów lub z indukowanych działaniem liganda różnic w oddziaływaniu receptorów z innymi składnikami błony komórkowej. Prawdopodobnie największe znaczenie fizjologiczne mają zmiany powinowactwa receptorów czynników wzrostowych wywołane przez działanie ligandów heterologicznych. Działanie insuliny powoduje 10-ciokrotny wzrost powinowactwa IGF II do jego receptora w adipocytach szczura [183] i komórkach szczurzej *hepatoma* [184]. Natomiast, działanie PDGF powoduje kilkukrotne obniżenie wiązania EGF do swoistego receptora w błonie komórek 3T3 [185]. Dodatkowych informacji o mechanizmie oddziaływania ligandów heterologicznych dostarczyły badania wpływu estrów forbolowych na wzrost komórkowy. Wykazano, że w zależności od rodzaju komórek docelowych związki te wpływają na liczbę i/lub powinowactwo receptorów czynników wzrostowych do ich naturalnych ligandów [186, 187]. Receptorem komórkowym estrów forbolowych jest prawdopodobnie zależna od jonów Ca^{2+} i fosfolipidów kinaza białkowa C [188], substratem której jest między innymi receptor EGF [189]. Stymulowana przez kinazę białkową C reakcja fosforylacji receptora EGF stanowi istotny element mechanizmu modulacji jego aktywności receptorowej. Ten sposób regulacji aktywności receptorowej jest szczególnie interesujący w kontekście udziału jonów Ca^{2+} i diacyloglicerolu w odpowiedzi komórkowej na działanie peptydowych czynników wzrostowych (patrz pkt. V-3). Stymulowane przez PDGF kolejno: podniesienie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia i 1,2-diacyloglicerolu, aktywacja kinazy białkowej C, fosforylacja reszt treoniny w efektorowej części receptora EGF prowadzi w efekcie do wyraźnego obniżenia jego powinowactwa do EGF [190]. Opisana transmodulacja powinowactwa receptora EGF jest jednym z możliwych mechanizmów regulacji aktywności receptorowej wywołanej działaniem ligandów heterologicznych.

V-3. Wewnątrzkomórkowy układ przekazywania sygnału mitogennego

Sposób przenoszenia sygnału mitogennego od receptora do jądra komórkowego znamy dotąd tylko fragmentarycznie. Część cytoplazmatyczna receptorów czynników wzrostowych wykazuje po związaniu liganda z częścią zewnątrzkomórkową aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej [191, 192, 193, 194]. W wyniku stymulacji aktywności tyrozyno-swoistej kinazy białkowej zachodzi fosforylacja różnych substratów komórkowych, między innymi autofosforylacja receptora [177, 195]]. Pytanie, które z białek komórkowych są fizjologicznymi substratami tyrozyno-swoistych kinaz zlokalizowanych w efektorowej części receptorów czynników wzrostowych pozostaje nadal bez odpowiedzi.

W latach 1983—1984 wykazano doświadczalnie udział fosfolipidów w wewnątrzkomórkowej transmisji sygnału mitogennego [17, 18, 19].

Stymulacja komórek spoczynkowych przy pomocy surowicy lub czynników wzrostowych prowadzi do przejściowego podniesienia wewnątrzkomórkowego poziomu 1,2-diacylglicerolu (DG) i 1,4,5-trifosfoinozytoli (IP_3) wynikającego z ogólnego wzrostu obrotu fosfatydyloinozytoli [17, 18]. Stymulowana przez fosfolipazę C hydroliza fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforanu (PIP_2) powoduje gwałtowny wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu DG i IP_3 . Wykazano, że dwie minuty po przyłączeniu PDGF do receptora komórkowego fibroblastów ludzkich następuje ośmiokrotny wzrost ilości produktów hydrolizy PIP_2 [196]. Po 10-ciu minutach cytoplazmatyczny poziom PIP_2 powraca do normy, natomiast ilość fosfatydyloinozytoli (PI) rośnie i po dalszych 20-tu minutach przekracza trzykrotnie wartość charakterystyczną dla komórek spoczynkowych, wskazując, że stymulacja metabolizmu fosfatydyloinozytoli jest sposobem generowania sygnału mitogennego [196].



Ryc. 3. Wewnątrzkomórkowy układ przenoszenia sygnału mitogennego indukowany działaniem czynników wzrostu. GF — czynnik wzrostu, PI, PIP, PIP_2 — odpowiednio fosfatydyloinozytol, fosfatydyloinozytolo-4-fosforan, fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan, IP_3 — 1,4,5-trifosfoinozytol, DA — 1,2-diacylglicerol, TPA — ester forbolu.

Powstały w wyniku hydrolizy PIP_2 diacyloglicerol jest aktywatorem kinazy białkowej C [197], która z kolei stymuluje występujący w błonie komórkowej układ wymiany jonów Na^+/H^+ [197]. Układ ten, obecny

w błonach wielu komórek zwierzęcych wykorzystuje skierowany do wnętrza komórki gradient jonów Na^+ do aktywnego wypychania protonów na zewnątrz komórki i odgrywa podstawową rolę w homeostazie wewnątrzkomórkowego pH [198, 199]. Wynikiem działania czynników wzrostowych jest między innymi przejściowy wzrost cytoplazmatycznego pH o 0,2—0,3 jednostki [200, 201]. Doświadczenia prowadzone na mutantach z upośledzonym antyportem Na^+/H^+ oraz doświadczenia z zastosowaniem swoistego inhibitora wymiany jonów Na^+/H^+ -amiloridu nie pozostawiają wątpliwości co do bezpośredniego wpływu podniesienia pH na wzrost i proliferację komórkową [202]. Nie wiadomo natomiast, w jaki sposób wzrost cytoplazmatycznego pH reguluje dalsze etapy odpowiedzi komórkowej. Kinaza białkowa C katalizuje między innymi fosforylację rybosomalnego białka S6 [203], a tym samym może wpływać na regulację procesu translacji. Ponieważ amilorid hamuje zarówno antyport Na^+/H^+ jak i fosforylację białka S6 [204], niewykluczone, że istnieje jakaś współzależność tych dwóch procesów.

Działanie czynników wzrostowych powoduje również szybki wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórek docelowych [205, 206]. Efekt ten jest niezależny od zewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} , co wskazuje, że jony wapnia są uwalniane z zapasów wewnątrzkomórkowych. Ponieważ 1,4,5-trifosfoinozytol stymuluje wzrost cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca^{2+} [207, 208, 209], aktywacja metabolizmu fosfatydyloinozytoli może pośredniczyć w generowaniu sygnału wapniowego [210, 211]. Prawdopodobnie jednak, zarówno rozpad fosfolipidów wewnątrzkomórkowej części błony komórkowej lub błon innych organelli komórkowych, jak i wynik działania IP_3 są przyczyną wzrostu poziomu jonów wapnia w cytoplazmie [17,212, 213]. Hipotezę taką potwierdza kształt krzywej ilustrującej zależność stężenia jonów Ca^{2+} od czasu działania PDGF, EGF i surowicy z wyraźnym maksimum po 20—40 sekundach i względnie stałym, podniesionym w porównaniu z komórkami spoczynkowymi poziomem jonów Ca^{2+} w okresie następnym kilku minut [212]. Jony Ca^{2+} i IP_3 są aktywatorami swoistych kinaz białkowych, które z kolei poprzez fosforylację określonych białek pośredniczą w przekazywaniu sygnału mitogennego [214, 215, 216, 217]. Dalsza sekwencja zdarzeń jest jednak w większej części oparta na przypuszczeniach niż na danych doświadczalnych.

W łańcuchu zdarzeń początkujących odpowiedź komórki na działanie czynników wzrostowych brakuje dotąd ważnego ogniwa — powiązania aktywności kinazowej receptorów ze stymulacją metabolizmu fosfatydyloinozytoli (Ryc. 3). Ostatnio wykazano, że substratem tyrozynoswoistej kinazy receptora EGF jest między innymi podjednostka β białek wiążących nukleotydy guanylowe (białek G) [218]. Ponieważ oprócz modulacji aktywności cykazy adenylanowej białka G regulują aktywność fosfodiesterazy [219]] i fosfolipazy C [220], fosforylacja podjednostki β

białek G może być elementem łączącym aktywność enzymatyczną receptorów GF z dalszymi etapami przekazywania sygnału mitogennego.

Przejściu komórek przez fazę opóźniania towarzyszy synteza wielu białek, między innymi także białek bezpośrednio zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. Działanie czynników wzrostowych powoduje drastyczne podniesienie poziomu informacyjnych kwasów rybonukleinowych w komórce, nawet 100-krotnie przewyższające poziom mRNA w komórkach spoczynkowych [221, 119]. Wśród genów, których ekspresja następuje w okresie przedreplikacyjnym, wyróżnia się rodziny genów kompetencyjnych i progresywnych. Każda z tych rodzin obejmuje kilkadziesiąt różnych genów komórkowych aktywowanych kolejno w fazach G_0 i G_1 cyklu komórkowego. Ważną rolę w indukowanej przez czynniki wzrostowe odpowiedzi komórkowej przypisuje się protoonkogenom komórkowym. Ograniczając się do jednego układu doświadczalnego — komórek 3T3 i jednego czynnika wzrostowego — PDGF można przedstawić określoną sekwencję ekspresji na razie kilku protoonkogenów w trakcie fazy opóźniania. Wykazano, że działanie PDGF na komórki 3T3 prowadzi do bardzo szybkiego podniesienia (maksimum po 35—45 minutach) jądrowego poziomu produktów transkrypcji protoonkogenu *c-fos* [222, 223]. Ekspresja innego onkogenu komórkowego *c-myc* wzrasta 20—40 krotnie po około dwóch godzinach od momentu przyłączenia PDGF do receptorów komórek 3T3 [224]. Po 6—7 godzinach działania PDGF obserwowano 10—20-krotny wzrost ekspresji genu kodującego białko p53 [225]], a w końcowej części fazy latencji wzrost poziomu produktów protoonkogenów *c-ras* [226]. Przypuszcza się, że produkty genów kompetencyjnych, takich jak białka p55 (*c-fos*) i p57 (*c-myc*), kontrolują przebieg dalszych etapów fazy opóźniania i pełnią kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego [227, 228].

Wiele istotnych informacji związanych z regulacją wzrostu komórek prawidłowych i transformowanych wniosły badania aktywności biologicznej produktów onkogenów wirusowych i protoonkogenów. Zagadnienia te zostały omówione w artykule M. K o s z - V n e n c h a k, M. K a - w e c k i e j i D. M a g i e l s k i e j - Ż e r o.

VI. Uwagi końcowe

Od wielu lat trwają próby wyjaśnienia mechanizmu działania peptydów regulacyjnych na poziomie molekularnym. Badania czynników wzrostu wniosły istotny wkład w poznanie wielu procesów związanych z przekazywaniem i realizacją informacji biologicznej w organizmach zwierząt i ludzi. Regulacja autokrylna, modulacja ilości receptorów poprzez internalizację kompleksów ligand-receptor, dwufunkcyjna rola receptorów z indukcją aktywności kinazowej w części efektorowej oraz udział fosfa-

tydyloinozytoli w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału to tylko ważniejsze wyniki uzyskane w trakcie badań peptydowych czynników wzrostowych. Większość z wymienionych osiągnięć ma charakter uniwersalny, istotny dla zrozumienia mechanizmów regulacji hormonalnej i nerwowej.

Wyniki działania czynników wzrostowych *in vitro*, stanowiące ogromną większość dotychczas uzyskanych rezultatów nie zawsze odzwierciedlają aktywność biologiczną tych peptydów *in vivo*. Mimo to, wiele danych otrzymanych w doświadczeniach w hodowlach tkankowych poza znaczeniem poznawczym, stwarza nadzieję na zrozumienie patogenezy różnych schorzeń związanych z niekontrolowanym wzrostem komórkowym. Poznanie przyczyn deregulacji wzrostu komórek nowotworowych, wyjaśnienie zaburzeń wzrostu i różnicowania komórek układu odpornościowego czy komórek śródbłonna i nabłonka to przykłady zagadnień, których rozwiązanie zależy w dużym stopniu od wyników i tempa badań peptydowych czynników wzrostu.

Opracowanie wykonane w ramach tematu finansowanego z centralnego programu badań podstawowych (CPBP) 06.01.

Zaakceptowano do druku 14 stycznia 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Bayliss W. M., Starling E. P., (1902), *J. Physiol.*, **28**, 325—353.
2. Sundler F., Ekblad E., Böttcher G., Alumets J., Hakanson R., (1985), w *Biogenetics of Neurohormonal Peptides*, red. Hakanson R., Thorell J., str. 213—243, Academic Press, London.
3. Todaro G. J., Delarco J. E., (1976), *Cancer Res.*, **38**, 4147—4154.
4. Gilchrist B. A., Karassik R. L., Wilkins L. M., Vrabel M. A., Maciąg T., (1983), *J. Cell Physiol.*, **117**, 235—240.
5. LoBue J., LoBue P. A., (1984), *Transplantation Proc.*, **16**, 341—348.
6. Rechler M. M., Eisen H. I., Higa O. Z., Nissley S. P., Moses A. C., Schiling E. E., Fenncy I., Bruni C. B., Phillips L. S., Baird K. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **245**, 7942—7950.
7. Carpenter G., Cohen S., (1976), *J. Cell Biol.*, **71**, 159—171.
8. Schlessinger J., Shechter Y., Willingham M. C., Pastan I., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2659—2663.
9. Haigler H. T., McKanna J. A., Cohen S., (1979), *J. Cell Biol.*, **81**, 382—395.
10. Willingham M. C., Pastan I., (1981), w *Cellular Controls in Differentiation*, red. Lloyd C. W., Rees D. A., str. 59—78, Academic Press, London.
11. Gilman A. G., (1984), *Cell*, **36**, 577—579.
12. Katoda T., Bokoch G. M., Northup J. K., Ui M., Gilman A. G., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3568—3577.
13. Northup J. K., Sternweis P. C., Gilman A. G., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11361—11368.

14. Bokoch G. M., Katada T., Northup J. K., Ui M., Gilman A. G., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3560—3567.
15. Conn P. M., Rogers D. C., Seay S. G., (1984), *Molec. Pharmacol.*, **25**, 51—55.
16. Conn P. M., (1984), w *Biochemical Actions of Hormones*, red. Litwack G., t. 11, str. 68—92, Academic Press, London.
17. Berridge M. J., Irvine R. F., (1984), *Nature*, **312**, 315—321.
18. Majerus P. W., Neufeld E. J., Wilson D. B., (1984), *Cell*, **37**, 701—703.
19. Taylor M. V., Metcalfe J. C., Hesketh T. R., Smith G. A., Moore J. D., (1984), *Nature*, **312**, 462—465.
20. Berridge M. J., (1984), *Biochem. J.*, **220**, 345—360.
21. Guzdek A., (1986), *Zeszyty Naukowe UJ, Prace z Biol. Molek.*, (w druku).
22. Schlegel W., Roduit C., Zahnd G. R., (1984), *FEBS Lett.*, **168**, 54—59.
23. Froesch E. R., Zapf J., (1985), *Diabetologia*, **28**, 485—493.
24. Froesch E. R., Schmid C., Schwander J., Zapf J., (1985), *Annu. Rev. Physiol.*, **47**, 443—467.
25. Houck J. C., (1976), w *Chalones*, str. 1—510, North Holland American Elsevier, Amsterdam.
26. Paukovits W. R., Hinterberger W., (1978), *Blut*, **37**, 7—18.
27. Houck J. C., (1978), *J. Reticuloendothel. Soc.*, **24**, 571—581.
28. Barford N. M., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 2420—2425.
29. Hillar M., Przyjemski J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **564**, 246—263.
30. Amici D., Gianfranceschi G. L., (1980), *Molec. Biol. Rep.*, **6**, 225—228.
31. Gianfranceschi G. L., Barra D., Bossa F., Coderoni S., Paparelli M., Venazi F., Cicconi F., Amici D., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **699**, 138—148.
32. Gianfranceschi G. L., Barra D., Coderoni S., Paparelli M., Venanzi F., Amici D., (1983), *Molec. Biol. Rep.*, **9**, 169—174.
33. Phillips L. S., Pennisi A. J., Belovsky D. C. J., (1978), *J. Clin. Endocrinol.*, **46**, 165—168.
34. Phillips L. S., Vassilopoulou-Sellin R., Reichard L. A., (1979), *Diabetes*, **28**, 919—924.
35. Phillips L. S., Fusco A. C., Unterman T. G., DelGreco F., (1984), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **59**, 764—772.
36. Gaffney E. V., Tsai S. C., Dell'Aquila M. L., Lingenfelter S. E., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 3668—3673.
37. Levine A. E., Hamilton D. A., Yeoman L. O., Busch H., Brattain M. G., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 76—82.
38. Levine A. E., McRae L. J., Hamilton D. A., Brattain D. E., Yeoman L. C., Brattain M. G., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 2248—2254.
39. Iwata K. K., Fryling C. M., Knott W. B., Todaro G. J., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 2689—2694.
40. Sekas G., Owen W. G., Cook R. T., (1979), *Exp. Cell Res.*, **122**, 47—54.
41. Auger G., Blanot D., Heijenoort J. V., Nadal C., Gournay M. F., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **133**, 363—369.
42. Eggen B. M., Bakke O., Hammerstrøm J., (1983), *Scand. J. Immunol.*, **18**, 13—20.
43. Havel L., Blat C., Chatelain G., (1983), *Biol. Cell.*, **48**, 11—16.
44. Holley R. W., Rosemary A., Baldwin J. H., Greenfield S., (1983), *Cell Biol. Intern. Rep.*, **7**, 525—526.
45. Le Rumer E., Winchenne J. J., Boffa G. A., Nadal C., (1983), *Tissue Kinetics*, **16**, 333—342.

46. Lehmann W., Graetz H., Widmayer R., Langen P., (1984), *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 971—974.
47. Fiedel B. A., Potempa L. A., Frenzke M. E., Simpson R. M., Gewurz H., (1982), *Immunology*, **45**, 15—21.
48. Klein A., (1983), *Folia Histochem. Cytochem.*, **21**, 3—14.
49. James R., Bradshaw R. A., (1984), *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 259—292.
50. Cohen S., Levi-Montalcini R., (1960), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 571—574.
51. Cohen S., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1555—1562.
52. Cohen S., (1972), *J. Invest. Dermatol.*, **59**, 13—19.
53. Cohen S., Carpenter G., King L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4834—4842.
54. Benjamin W. R., Lomedico P. T., Kilian P. L., (1985), w *Annual Reports in Medical Chemistry*, red. Pawson B. A., str. 173—183, Academic Press, London.
55. Ihrie E. J., Wood D. D., (1985), *Lymphokine Res.*, **4**, 169—181.
56. Kampschmidt R. F., (1984), *J. Leukocyte Biol.*, **36**, 341—355.
57. Gordon A. H., Koj A., (1985), w *The Acute-Phase Response to Injury and Infection*, str. 1—339, Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam.
58. Lim R., Miller J. F., (1984), *J. Cell Physiol.*, **119**, 225—259.
59. Hirano T., Teranishi T., Onoue K., (1984), *J. Immunol.*, **132**, 229—234.
60. Kikutani H., Toga T., Akira S., Kishi H., Miki Y., Saki O., Yamamura Y., Kishimoto T., (1985), *J. Immunol.*, **134**, 990—995.
61. Teranishi T., Hirano T., Arima N., Onoue K., (1982), *J. Immunol.*, **128**, 1903—1909.
62. Howard M., Paul W. E., (1983), *Annu. Rev. Immunol.*, **1**, 307—333.
63. Williams N., Eger R. F., Jackson H. M., Nelson D. J., (1982), *J. Cell. Physiol.*, **110**, 101—104.
64. Sensenbrenner M., Pettmann B., Labourdette G., Weibel M., (1985), w *Hormones and Cell Regulation*, red. Dumont J. E., Hamprecht B., Nunez J., t. 9, str. 345—360, Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam.
65. Pettmann B., Weibel M., Daure G., Sensenbrenner M., (1982), *J. Neurosci. Res.*, **8**, 463—476.
66. Kasper S., Worsley I. G., Rove J. M., Shiu R. P. C., Friesen H. G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5226—5231.
67. Kasper S., Friesen H. G., (1986), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **62**, 70—76.
68. Thomas K. A., Rios-Candelore M., Gimenez-Gallego G., DiSalvo J., Bennett C., Rodkey J., Fitzpatrick S., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6409—6413.
69. Gimenez-Gallego G., Rodkey J., Bennett C., Rios-Candelore M., DiSalvo J., Thomas K., (1985), *Science*, **230**, 1385—1388.
70. Bohlen P., Baird A., Esch F., Ling N., Gospodarowicz D., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5364—5368.
71. Bohlen P., Esch F., Baird A., Jones K. L., Gospodarowicz D., (1985), *FEBS Lett.*, **185**, 177—181.
72. Gilchrest B. A., Marshall W. L., Karassik R. L., Weinstein R., Maciag T., (1984), *J. Cell. Physiol.*, **120**, 377—383.
73. Lemke G. E., Brockes J. P., (1984), *J. Neurosci.*, **4**, 75—83.
74. Dexter T. M., Heyworth C. M., Whetton A. D., (1985), *BioEssays*, **2**, 154—158.
75. Ihle J. N., Keller J., Oroszlan S., Henderson L. E., Copeland T. D., Fith F., Prystowsky M. B., Goldwasser E., Schrader J. W., Palaszynski E., Dy M., Lebel B., (1983), *J. Immunol.*, **131**, 282—287.

76. Clark-Lewis I., Kent S. B. H., Schrader J. W., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 7488—7494.
77. Carpenter G., Cohen S., (1979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 193—216.
78. Cohen S., (1983), *Cancer*, **51**, 1787—1791.
79. Das M., (1982), *Int. Rev. Cytol.*, **78**, 233—256.
80. Thoenen H., Edgar D., (1985), *Science*, **229**, 238—242.
81. Greene L. A., Shooter E. M., (1980), *Annu. Rev. Neurosci.*, **3**, 353—402.
82. Greene L. A., Burstein D. E., Connolly J. L., Green S. H., Seeley P. J., Shelanski M. L., (1984), w Cellular and Molecular Promotion of Neurite Outgrowth by Nerve Growth Factor, red. Black I. B., str. 133—141, Plenum Press, New York.
83. Maciąg T., (1984), *Prog. Thromb. Hemostasis*, **7**, 162—182.
84. Maciąg T., Mehlman T., Friesel R., Schreiber A. B., (1984), *Science*, **225**, 932—934.
85. Burgess W. H., Mehlman T., Friesel R., Johnson W. V., Maciąg T., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11389—11392.
86. Paetkau V., (1985), *Can. J. Biochem.*, **63**, 691—699.
87. Smith K. A., (1984), *Annu. Rev. Immunol.*, **2**, 319—333.
88. Mochizuki D., Watson J. D., (1984), w Methods for Serum-Free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells, str. 97—126, A. L. Liss Inc., New York.
89. Watkins D., Cohen N., (1985), *Development Comp. Immunol.*, **9**, 819—824.
90. Pathak S. K., Tsang K. Y., Cathcart M. K., Arnaud P., Boutin B., Fudenberg H. H., (1985), *Immunol. Kett.*, **10**, 339—346.
91. Stanley E. R., Guilbert J., (1981), *J. Immunol. Methods*, **45**, 253—289.
92. Burgess A. W., (1985), w Mediators in Cell Growth and Differentiation, red. Ford R. J., Maizel A. L., str. 159—169, Raven Press, New York.
93. Iscove N. N., (1985), w Leukemia, Life Sciences Research Report, red. Weissman I. L., t. 30, str. 5—20, Springer-Verlag, Berlin.
94. Wilkins L., Gilchrest B. A., Szabo G., Weinstein R., Maciąg T., (1985), *J. Cell Physiol.*, **122**, 350—361.
95. Nicola N. A., Metcalf D., Matsumoto M., Johson G. R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 5290—5299.
96. Burgess A. W., Metcalf D., (1980), *Blood*, **56**, 1947—1958.
97. Gough N. M., Gough J., Metcalf D., Kelso A., Grail D., Nicola N. A., Burgess A. W., Dunn A. R., (1984), *Nature*, **309**, 763—767.
98. Linkhart T. A., Mohan S., Jennings J. C., Farley J. R., Baylink D. J., (1984), w Hormonal Proteins and Peptides, red. Li C. H., t. 12, str. 279—297, Academic Press, Orlando.
99. Jennings J. C., Baylink D. J., (1985), w The Chemistry and Biology of Meneralized Tissues, red. Butler W. T., str. 48—53, EBSCO Media, Birmingham.
100. Lobb R. R., Fett J. W., (1984), *Biochemistry*, **23**, 6295—6299.
101. Bekoff M. C., Klagsbrun M., (1982), *J. Cell Biochem.*, **20**, 237—245.
102. Davidson J. M., Klagsbrun M., Hill K. E., Buckley A., Sullivan R., Brewer P. S., Woodward S. C., (1985), *J. Cell Biol.*, **100**, 1219—1227.
103. Stroobant P., Gullick W., Waterfield M. D., Rozengurt E., (1985), *EMBO J.*, **4**, 1945—1949.
104. Dicker P., Pohjanpelto P., Pettican P., Rozengurt E., (1981), *Exp. Cell Res.*, **135**, 221—227.
105. Nister M., Heldin C. H., Wasteson A., Westermark B., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 926—930.

106. Nister M., Heldin C. H., Westermark B., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 322—340.
107. Gajdusek C. M., (1984), *J. Cell Physiol.*, **121**, 13—21.
108. DiCorleto P. E., Gajdusek C. M., Schwartz S. M., Ross R., (1983), *J. Cell Physiol.*, **114**, 339—345.
109. Canalis E., (1983), *Endocrine Rev.*, **4**, 62—67.
110. Canalis E., (1985), *Clin Orthopaedics and Related Res.*, **193**, 246—263.
111. Simpson E., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 527—530.
112. Ikeda T., Sibrasku D. A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4049—4064.
113. Sibrasku D. A., Ikeda T., Danielpour D., (1985), w *Mediators in Cell Growth and Differentiation*, red. Ford R. J., Maizel A. L., str. 219—232, Raven Press, New York.
114. Heldin C. H., Westermark B., Wasteson A., (1980), *J. Cell Physiol.*, **105**, 235—246.
115. Barritault D., Plouet J., Courty J., Courtois Y., (1982), *J. Neurosci. Res.*, **8**, 477—490.
116. Courty J., Loret C., Moenner M., Chevelier B., Lagente O., Courtois Y., Barritault D., (1985), *Biochimie*, **67**, 265—269.
117. Bowen-Pope D. F., Ross R., (1984), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **13**, 191—206.
118. Heldin C. H., Wasteson A., Westermark B., (1985), *Molec. Cell. Endocrinol.*, **39**, 169—187.
119. Stiles C. D., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 5215—5218.
120. Klagsbrun M., Shing Y., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 805—809.
121. Ikeda T., Danielpour D., Sibrasku D. A., (1984), *J. Cell. Biochem.*, **25**, 213—229.
122. DiAmore P. A., Klagsbrun M., (1984), *J. Cell. Biol.*, **99**, 1545—1549.
123. Luetteke N. C., Michalopoulos G. K., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 6331—6337.
124. Finch C. A., (1982), *Blood*, **60**, 1241—1246.
125. Miyake T., Kung C. K. H., Goldwasser E., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5558—5564.
126. Nakamura T., Nawa K., Ichihara A., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1450—1459.
127. Rinderknecht E., Humbel R. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2769—2776.
128. Klapper D. G., Svoboda M. E., Van Wyk J. J., (1983), *Endocrinology*, **112**, 2215—2217.
129. Engberg G., Carlquist M., Jörnball H., Hall K., (1984), *Europ. J. Biochem.*, **143**, 117—124.
130. Rinderknecht E., Humbel R. E., (1978), *FEBS Lett.*, **89**, 283—286.
131. Söder O., Ernström U., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 420—426.
132. Labrecque D. R., Wilson M., Fogerty S., (1984), *Exp. Cell. Res.*, **150**, 419—429.
133. Marquardt H., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Todaro G. J., (1984), *Science*, **223**, 1079—1082.
134. Lawrence D. A., (1985), *Biol. Cell*, **53**, 93—98.
135. Brown K. D., Blakeley D. M., (1984), *Biochem. Soc. Transact.*, **12**, 168—173.
136. Roberts A. B., Frolik C. A., Anzano M. A., Sporn M. B., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 2621—2626.

137. Roberts A. B., Anzano M. A., Wakefield L. M., Roche N. S., Stern D. F., Sporn M. B., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 119—123.
138. Hirai R., Yamacka K., Mitsui H., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 5742—5746.
139. Yamacka K., Hirai R., Tsugita A., Mitsui H., (1984), *J. Cell. Physiol.*, **119**, 307—314.
140. Singh J. P., Chaikin M. A., Stiles C. D., (1982), *J. Cell Biol.*, **95**, 667—671.
141. Sporn M. B., Roberts A. B., (1985), *Nature*, **313**, 747—751.
142. Heldin C. H., Westermark B., (1984), *Cell*, **37**, 9—20.
143. O'Loughlin E. V., Chung M., Hollenberg M., Hayden J., Zahavi I., Gall D. G., (1985), *Am. J. Physiol.*, **249**, G674—G678.
144. Bowen-Pope D. F., Ross R., Seifert R. A., (1985), *Circulation*, **4**, 735—740.
145. Pledger W. J., Stiles C. D., Antoniades H. N., Scher C. D., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4481—4485.
146. Pledger W. J., Stiles C. D., Antoniades H. N., Scher C. D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2839—2843.
147. Smith J. C., Stiles C. D., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4363—4367.
148. Singh J. P., Chaikin M. A., Pledger W. J., Scher C. D., Stiles C. D., (1983), *J. Cell Biol.*, **96**, 1497—1502.
149. O'Keefe E., Pledger W. J., (1983), *Molek. Cell. Endocrinol.*, **31**, 167—186.
150. Camprisi J., Pardee A.B., (1984), *Molek. Cell. Biol.*, **4**, 1807—1814.
151. Paul D., (1985), *Drug Res.*, **35**, 772—779.
152. Bestholtz C., Westermark B., (1984), *J. Cell. Physiol.*, **118**, 203—210.
153. Clemmons D. R., (1983), *J. Cell. Physiol.*, **114**, 61—67.
154. Clemmons D. R., Underwood L. E., Van Wyk J. J., (1981), *J. Clin. Invest.*, **67**, 10—19.
155. Smith J. C., (1977), *J. Cell. Biol.*, **73**, 761—767.
156. Rozengurt E., Heppel L. A., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4492—4495.
157. Zapf J., Schoenle E., Froesch E. R., (1978), *Europ. J. Biochem.*, **87**, 285—296.
158. Inman W. H., Colowick S. P., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1346—1349.
159. Barhes D., Colowick S. P., (1986), *J. Cell. Physiol.*, **89**, 633—640.
160. Kaplowitz P.B., D'Ercole A.J., Underwood L.E., Van Wyk J.J., (1984), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58**, 176—181.
161. Kedes P. H., Gunning P. W., Shooter E. M., (1982), *J. Neurosci. Res.*, **8**, 367—374.
162. Hollenberg M. D., Cantrecasas P., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3845—3853.
163. Owen A. J., Geyer R. P., Antoniades H. N., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3203—3207.
164. Conover C. A., Hintz R. L., Rosenfeld R. G., (1985), *J. Cell. Physiol.*, **122**, 133—141.
165. Ronning W. O., Pettersen E. O., (1985), *Exp. Cell Res.*, **157**, 29—40.
166. Turley E. A., Hollenberg M. D., Pratt R. M., (1985), *Differentiation*, **28**, 279—285.
167. Asakawa K., Takano K., Hizuka N., Kogawa M., Shizume K., (1984), *Endocrinol. Japon.*, **31**, 245—252.
168. Engström-Laurent A., Feltelius N., Hällgren R., Wasteson A., (1985), *Ann. Rheum. Dis.*, **44**, 614—620.

169. Holland R., Hardie D. G., (1985), *FEBS Lett.*, **181**, 308—312.
170. Haystead T. J., Hardie D. G., (1986), *Biochem. J.*, **234**, 279—284.
171. Habenicht A. J. R., Glomset J. A., Goerig M., Gronwald R., Grulich J., Loth U., Schettler G., (1985), *J. Chem.*, **260**, 1370—1373.
172. Tashijan A. H., Hohman E. L., Antoniades H. N., Levine L., (1982), *Endocrinology*, **111**, 118—124.
173. Habenicht A. J. R., Goerig M., Grulich J., Rothe D., Gronwald R., Loth U., Schettler G., Kommerell B., Ross R., (1985), *J. Clin. Invest.*, **75**, 13181—13187.
174. Leslie C. C., Antoniades H. N., Geyer R. P., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **711**, 290—304.
175. Witte L. D., Cornicelli J. A., Miller R. W., Goodman D. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5392—5401.
176. Hollenberg M. D., Atkison P. R., Bala R. M., (1985), w: *Somatomedins and Other Peptide Growth Factors: Relevance to Pediatrics*, red. Mintz R., Underwood L. E., str. 2—11. Ross Laboratories Publ., Columbus.
177. Hollenberg M. D., Armstrong G. D., (1985), w *Polypeptide Hormone Receptors*, red. Posner B. I., str. 201—226, Marcel Dekker Inc., New York-Basel.
178. Kaplan J., (1981), *Science*, **212**, 342—346.
179. Stoscheck C. M., Carpenter G., (1984), *J. Cell Biol.*, **98**, 1048—1053.
180. Beguinot L., Lyall R. M., Willingham M. C., Pastan I., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2384—2388.
181. Ross R., (1985), *J. Cardiovasc. Pharmac.*, **7**, S186—S190.
182. Hamet P., Sugimoto H., Umeda F., Lecavalier L., Franks D. J., Orth D. N., Chiasson J. L., (1985), *Metabolism*, **34**, 25—31.
183. Oppenheimer C. L., Pessin J. E., Massague J., Gitomer W., Czech M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4824—4830.
184. Massague J., Bliderman L. A., Czech M. P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13958—13963.
185. Collins M. K. L., Sinnett-Smith J. W., Rozengurt E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11689—11693.
186. Brown K. D., Dicker P., Rozengurt E., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 1937—1943.
187. Magun B. E., Matisian L. M., Bowden G. T., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6373—6381.
188. Niedel J. E., Kuhn L. J., Vandenbark G. R., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 36—40.
189. Cochet C., Gill G. N., Meisenhelder J. Cooper J. A., Hunter T., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 2553—2558.
190. Fearn J. C., King A. C., (1985), *Cell*, **40**, 991—1000.
191. Pike L. J., Bowen-Pope D. F., Ross R., Krebs E. G., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9383—9390.
192. Kasuga M., Zick Y., Blithe D. L., Karlsson F. A., Waring H. U., Kahn C. R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9891—9894.
193. Jacobs S., Kull F. C., Earp H. S., Svoboda M. E., Van Wyk J. J., Cnatreas P., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9581—9584.
194. Ushiro H., Cohen S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8363—8365.
195. Bowen-Pope D. F., Seifert R. A., Ross R., (1985), w *Control of Animal Cell Proliferation*, red. Boynton A. L., Leffert H. L., t. 1, str. 281—311, Academic Press, New York.
196. Chu S. H. W., Hoban C. J., Owen A. J., Geyer R. P., (1985), *J. Cell. Physiol.*, **124**, 391—396.

197. Nishizuka Y., (1984), *Nature*, **308**, 693—698.
198. Boron W., (1983), *J. Membr. Biol.*, **72**, 1—6.
199. Frelin C., Vigne P., Lazdunski M., (1985), w Hormone and Cell Regulation, red. Dumont J., Hamprecht B., Nunez J., t. 9, str. 259—268, INSERM.
200. Burns C. P., Rozengurt, (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 931—938.
201. L'Allemain G., Franchi A., Cragoe E., Pouyssegur J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4313—4319.
202. Pouyssegur J., (1985), *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 453—455.
203. Nishimura J., Deuel T. F., (1983), *FEBS Lett.*, **156**, 130—134.
204. Pouyssegur J., Chambard J. C., Franchi A., Paris J., Van Obberhen-Schilling E., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3935—3939.
205. Lopez-Rivas A., Rozengurt E., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 240—247.
206. Owen N. E., Villereal M., (1983), *J. Cell. Physiol.*, **117**, 23—29.
207. Streb H., Irvine R. F., Berridge M. J., Schulz I., (1983), *Nature*, **306**, 67—69.
208. Dawson A. P., Irvine R. F., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 858—864.
209. Irvine R. F., Brown K. D., Berridge M. J., (1984), *Biochem. J.*, **222**, 269—272.
210. Burgess G. M., Godfrey P. P., McKinnney J. C., Berridge M. J., Irvine R. F., Putney J. W., (1984), *Nature*, **309**, 63—66.
211. Joseph S. K., Thomas A. P., Williams R. J., Irvine R. F., Williamson J. R., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3077—3081.
212. Moolenaar W. H., Tertoolen G. J., de Laa S. W., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8066—8069.
213. Berridge M. J., Heslop J. P., Irvine R. F., Brown K. D., (1984), *Biochem. J.*, **222**, 195—201.
214. Whitman M. R., Epstein J., Cantley L., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13652—13655.
215. Lapetina E. G., Watson S. P., Cuatrecasas P., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7431—7435.
216. Geisow M. J., (1978), *Nature*, **276**, 211—212.
217. Berridge M. J., (1983), *Biochem. J.*, **212**, 849—858.
218. Valentine-Braun K. A., Northup J. K., Hollenberg M. D., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 236—240.
219. Stryer L., Hurley J. B., Fung B. K., (1981), *Curr. Top. Membr. Transp.*, **15**, 93—108.
220. Cockcroft S., Gomperts B. D., (1985), *Nature*, **314**, 534—536.
221. Cochran B. H., Reffel A. C., Stiles C. D., (1983), *Cell*, **33**, 939—947.
222. Greenberg M. E., Ziff E. B., (1984), *Nature*, **311**, 433—438.
223. Kruijer W., Cooper J. A., Hunter T., Verma I. M., (1984), *Nature*, **312**, 711—716.
224. Kelly K., Cochran B. H., Stiles C. D., Lester D., (1983), *Cell*, **35**, 603—610.
225. Reich N. C., Levine A. J., (1984), *Nature*, **308**, 199—201.
226. Campisi J., Gray H. E., Pardee A. B., Dean M., Sonenshein G. E., (1984), *Cell*, **36**, 241—247.
227. Curran T., Miller A. D., Zokas L., Verma I. M., (1984), *Cell*, **36**, 259.
228. Kingston R. E., Baldwin A. S., Sharp P. A., (1985), *Cell*, **41**, 3—5.

ANNA D. INGLOT *

Interferony jako nieklasyczne hormony współdziałające z czynnikami wzrostowymi

Interferons as nonclassic hormones interacting with growth factors

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Interferony jako hormony tkankowe**
- III. Wpływ czynników wzrostowych na wytwarzanie interferonów**
- IV. Antagonizm i synergizm w działaniu między interferonami a czynnikami wzrostowymi**
- V. Interferony i różnicowanie komórek**
- VI. Ewolucja hormonów tkankowych**

Contents

- I. Introduction**
- II. Interferons as tissue hormones**
- III. Effects of growth factors on the production of interferons**
- IV. Antagonism and synergy in action between interferons and growth factors**
- V. Interferons and cell differentiation**
- VI. Evolution of tissue hormones**

Wykaz stosowanych skrótów: 2-5 A — 2'5'-oligoadenylan, BCGF — czynnik wzrostu komórek B, BCDF — czynnik różnicowania komórek B, CSF-1 — czynnik stymulujący wzrost kolonii (komórek szpiku kostnego) typu 1, dsRNA — dwupasmowy RNA, EGF — czynnik wzrostu naskórka, EMC — wirus encephalomyocarditis, FGF — czynnik wzrostu fibroblastów, GF — czynnik wzrostowy, Hu — ludzki, IFN — interferon, IL 1,2,3 — interleukina typu 1, 2 lub 3, IU — jednostka międzynarodowa, NDV — wirus choroby Newcastle, PDGF — czynnik wzrostowy z płytek krwi, poli I:C — kwas poliinozynowy:policytydylowy, r — rekombinacyjny; TGF — transformujący czynnik wzrostowy; VSV — wirus pęcherzykowanego zapalenia jamy gębowej bydła.

I. Wstęp

Hormony tkankowe zwane też czynnikami regulacyjnymi lub sygnałowymi są główną częścią składową systemu informacyjnego ustrojów

* Doc. dr hab., Laboratorium Wirusologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław.

żywych, który możnaby nazwać biologicznym komputerem o nieskończonej wielkiej pojemności. Pracuje on bezszelestnie i w zdrowym organizmie — niezawodnie, zupełnie bez udziału naszej woli lub świadomości. Zadaniem jego jest między innymi sterowanie tak podstawowymi funkcjami jak wzrost komórek i tkanek oraz ich różnicowanie.

Hormonami tkankowymi są najczęściej białka lub polipeptydy, złożone i proste, o różnej masie cząsteczkowej i wielorakich właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Tak jak inne klasyczne hormony są one wytwarzane wewnątrz organizmu (są więc endogenne) i działają w niezwykle małych stężeniach rzędu nano- lub pikogramów.

Pierwszym etapem działania tych czynników jest swoista reakcja z receptorami komórkowymi występującymi zwykle na powierzchni błon cytoplazmatycznych. Choć ostatnio receptory regulatorów wzrostu zlokalizowano też w błonie jądrowej i w samym jądrze. W wyniku charakterystycznej dla każdego układu reakcji: ligand — receptor zostaje wzbudzona kaskadowa reakcja biochemiczna, która jest sygnałem do rozpoczęcia lub zaniechania podziału komórki, efektu troficznego, określonego etapu różnicowania itp. Dalsze etapy to „instruowanie” genów, zmiany w ich ekspresji tj. produkcji mRNA i białek i w efekcie końcowym — bezbłędne prowadzenie cykli podziałowych komórki i jej stopniowe funkcjonalne i morfologiczne przekształcenia zwane różnicowaniem.

Hormony tkankowe działają w systemie endokrynnym (gdy są przenoszone przez krew na duże odległości od źródła wytwarzania), parakrynnym (gdy działają głównie miejscowo blisko miejsca produkcji) oraz autokrynnym (gdy te same komórki wytwarzają hormony i na nie reagują).

Tym zagadnieniom, głównie czynnikom wzrostowym, jest poświęcony cykl artykułów w bieżącym numerze Postępów Biochemii. W niniejszej pracy pragnę przedstawić w formie syntetycznej dotychczasowy, bardzo jeszcze niedoskonały stan wiedzy o tzw. negatywnych czynnikach wzrostu. Moim zdaniem są nimi przede wszystkim interferony. Dlatego też zacznę od omówienia interferonów z punktu widzenia koncepcji hormonalnej.

II. Interferony jako hormony tkankowe

Interferony są białkami sygnałowymi i regulacyjnymi, wytwarzanymi przez wiele różnych komórek organizmu. Produkcja ich nie jest bezpośrednio uzależniona od żadnego gruczołu dokrewnego, jednakże ob-

serwuje się pewne pośrednie zależności między IFN a klasycznymi hormonami dokrewnymi i centralnym układem nerwowym [1].

Bodźcem do wytwarzania IFN są przede wszystkim zakażenia wirusami. W tym najsilniejszymi induktorami IFN są wirusy paragrypy (Sendai, NDV) oraz inne liczne wirusy, które albo wytwarzają w czasie replikacji duże ilości dsRNA albo też posiadają genom zbudowany z dsRNA. Dlatego też wysunięto przypuszczenie, że bodźcem do produkcji IFN po zakażeniu jest zwiążanie się wirusowego dsRNA ze swoistym, białkowym receptorem, co jest sygnałem do aktywacji „stłumionych” genów IFN [2].

Ponadto induktorami IFN są różne mikroorganizmy (riketsje, bakterie, grzyby i pierwotniaki) oraz niektóre ich produkty (w tym białka, endotoksyny oraz kwasy nukleinowe). IFN jest wytwarzany także pod wpływem syntetycznych lub naturalnych polimerów, obcogatunkowych antygenów, mitogennych i niemitogennych lektyn oraz wielu substancji organicznych, niskocząsteczkowych (np. CMA — kwas 9-okso-10-akrydynooctowy i jego analogi, tiloron, pochodne pirymidyny, antrachinonu i inne [3]. Wydaje się, że również związki niskocząsteczkowe indukują IFN w sposób swoisty tj. dopiero po zwiążaniu się z hipotetycznym jak dotąd receptorem komórkowym [4].

Małe ilości IFN mogą być też wytwarzane spontanicznie, bez uchwytanego udziału jakiegokolwiek induktora. Dzieje się to głównie w układzie limfoidalnym [5].

U człowieka i dotychczas badanych zwierząt interferony występują w postaci trzech odmian molekularnych: IFN α , IFN β i IFN γ . Główne ich cechy biochemiczne i biologiczne przedstawia (Tab. 1).

Podstawą do ich klasyfikacji były różnice dotyczące cech fizyko-chemicznych, biologicznych i antygenowych. Duża aktywność przeciwwirusowa jest charakterystyczną właściwością IFN, która wyróżnia go spośród innych białek hormonalnych [6]. Do chwili obecnej aktywność biologiczną IFN określa się przy pomocy jednostek przeciwwirusowych. Jednostką międzynarodową jest najmniejsza ilość badanego (standardowego) preparatu, która chroni około 50% określonych komórek przed efektem cytopatogennym testowego wirusa. Aktywność przeciwwirusową oznacza się przy pomocy mikrometod biologicznych wykonywanych przy użyciu komórek z hodowli tkankowych. Ludzki IFN najczęściej testuje się w hodowlach jednowarstwowych, embrionalnych lub napletkowych fibroblastów ludzkich, komórek amnionu — WISH, komórek nowotworowych: Hep2, HeLa, raka płuc — A549 lub też komórek linii nerki bydłowej — MDBK. Komórki MDBK są wrażliwe na IFN α , natomiast nie reagują na IFN β i IFN γ . Wirusami testowymi są najczęściej: VSV, EMC, Sindbis i in. [6].

Charakterystyka interferonów

Typy	Geny	Białka	Właściwości
IFN- α	Rodzina wielogenowa, u człowieka poznano ponad 10 genów oraz pseudogeny, wyróżniono dwie podrodziny I i II; znane są rodziny genów α u bydła i myszy	Zwykle nieglikozylowane, monomeryczne; HuIFN α ma 166 aminokwasów, 2 wiązania S—S, Mr ~20 000; jest kwasostabilny w pH 2,0 i stabilny w czasie przechowywania w +4° i +20°C	Naturalne postacie są otrzymywane przez indukcję leukocytów krwi obwodowej przez wirusy (Sendai, NDV); potoczna nazwa IFN leukocytarny; wykazują dużą aktywność przeciwwirusową w komórkach homologicznych i niektórych heterologicznych; mają dużą aktywność przeciwnowotworową in vitro i in vivo oraz działają immunomodulatoryjnie; główne preparaty farmaceutyczne pochodzące z rekombinacji E. coli: rHuIFN α 2 u rHuIFN α 4
IFN- β	Jedna główna postać genu β 1, możliwe istnienie pseudogenów, duża homologia z IFN α	Naturalne postacie są glikoproteinami, rekombinacyjne białkami prostymi; HuIFN β 1 ma 166 aminokwasów, 1 wiązanie S—S, Mr ~20 000 (rekombinacyjny), Mr 42 000 (naturalny, homodimer); jest kwasostabilny w pH 2,0; mniej stabilny w roztworze niż IFN α	Naturalne postacie otrzymywane są przez indukcję fibroblastów przez poli I:C, w obecności inhibitorów białka i mRNA (cykloheksymid, aktynomycyna D); potoczna nazwa IFN fibroblastyczny; IFN β i IFN α mają wspólne receptory; wykazują większą swoistość gatunkową niż IFN α ; aktywność biologiczna i lecznicza podobnie jak IFN α
IFN- γ	Jedna główna postać genu γ ; nie ma homologii z IFN α lub IFN β	Naturalne postacie są glikoproteinami, rekombinacyjne białkami prostymi; HuIFN γ ma 143 aminokwasy, rekombinacyjny Mr ~17 000, naturalny Mr ~73 000 (tetramer); jest kwasolabilny w pH 2,0; w roztworze nietrwały	Naturalna postać jest otrzymywana przez indukcję leukocytów przez mitogenne lektyny (PHA, Con A) w obecności estrów forbolu (TPA), potoczna nazwa — IFN immunologiczny; jest limfokiną produkowaną przez limfocyty T, wśród jego aktywności dominuje działanie immunomodulacyjne, ale ma aktywność przeciwwirusową i przeciwwzrostową tak jak IFN α i β ; ma inne receptory niż IFN α , β ; wykazuje synergizm w działaniu z IFN α i IFN β

Szczegółowe informacje o strukturze interferonów i ich genach znajdują się w pracy przeglądowej E. Piaseckiego Post. Hig. Med. Dośw., 41, 113-135, 1987.

Ostatnio wprowadzono do oznaczania IFN także testy radioreceptorowe i radioimmunologiczne [7].

Przez ponad ćwierć wieku IFN był przedmiotem zainteresowania głównie wirusologów, którzy badali jego znaczenie w nieswoistej odporności przeciwwakacyjnej. Wykazano, że IFN jest ważnym elementem pierwszej linii obrony w czasie inwazji wirusów i w mniejszym stopniu innych drobnoustrojów. Jednakże stopniowo wykrywano nowe funkcje IFN, nie związane z aktywnością przeciwwirusową, lecz dotyczące bezpośrednio wpływu na funkcję i strukturę komórki. Opisano zarówno hamowanie proliferacji komórek i tkanek przez IFN jak i działanie przeciwnowotworowe u człowieka i zwierząt. Ponadto drobiazgowo badano, jak IFN hamuje lub pobudza (moduluje) reakcje immunologiczne [7].

Obecnie większość badaczy przyjmuje, że IFN posiada wszelkie cechy hormonu tkankowego, które wymieniłam na wstępie. Jednakże nadal bardzo rzadko klasyfikuje się go i bada razem z innymi, bardziej klasycznymi hormonami (chyba głównie ze względu na konserwatyzm uczonych). IFN najczęściej działają w układzie parakrynnym, przekazując sygnał od jednej komórki do drugiej na krótką odległość. Dość częste jest też ich działanie autokrynne, szczególnie w systemie immunologicznym i w komórkach nowotworowych [1].

W naszym laboratorium we Wrocławiu opisaliśmy autokrynne działanie IFN i transformujących czynników wzrostu (TGF α i β) w mysich komórkach nowotworowych C-243 rosnących w hodowli tkankowej oraz w postaci guzów (włókniako-mięsaków) u myszy Balb/c [8].

W szczególnych okolicznościach IFN może działać tak jak typowy hormon endokrynnny np. w czasie ostrego zakażenia wirusowego wtedy, gdy IFN jest wydzielany w dużej ilości z zaatakowanych przez wirus tkanek do krwi lub w trakcie parenteralnego leczenia dużymi dawkami IFN [6].

U pacjentów preparaty IFN α , IFN β lub IFN γ podane pozajelitowo w dawkach powyżej 10^6 jednostek wywołują zdumiewająco stały i charakterystyczny zespół objawów ubocznych przypominający grypę. Obserwuje się wysoką gorączkę, dreszcze, bóle mięśni i głowy, uczucie rozbicia i osłabienia, poty, drętwienia, bezsenność i rozstroje żołądkowo-jelitowe. Wprawdzie bariera mózgowo-rdzeniowa skutecznie chroni centralny układ nerwowy przed dostępem IFN, jednakże w dużych stężeniach może on przenikać do mózgu i wywoływać objawy neurotoksyczności, w tym nawet śpiączkę. Na szczęście objawy te szybko ustępują po przerwaniu terapii z zastosowaniem IFN [6].

Dotąd nie wiadomo, w jakim stopniu objawy te zależą bezpośrednio od IFN, a o ile są one zależne od jego wpływu na centra nerwowe i hormonalne regulujące metabolizm i ruch komórek.

III. Wpływ czynników wzrostowych na wytwarzanie interferonów

Ponieważ interferony są produktami żywych komórek, których wzrost i aktywność metaboliczna jest stale kontrolowana przez czynniki wzrostu, wydaje się oczywiste, że muszą być między nimi liczne i silne powiązania. Bezpośrednich badań w tej dziedzinie jest wciąż bardzo mało.

Już w pierwszych latach badań nad IFN zwrócono uwagę na to, że dla optymalnej produkcji IFN indukowanego w hodowli tkanek konieczna jest obecność surowicy, najlepiej surowicy płodowej cieląt [7]. Obecnie wiemy, że surowica jest głównym źródłem wielu czynników wzrostu (EGF, PDGF, insulino-podobne GF i in.) oraz substancji wspomagających proliferację (fibronektyna, transferyna, kalmodulina i in.). Surowica jest potrzebna głównie do przygotowania komórek do wytwarzania IFN. Natomiast aktywne wydzielanie IFN występuje w stacjonarnych, nie dzielących się komórkach utrzymywanych w pożywkach bez surowicy [7].

Jak wspomniałam najsilniejszym bodźcem do syntezy IFN zarówno *in vitro* jak i *in vivo* jest zakażenie wirusowe. Niektóre komórki (fibroblasty, limfocyty T, makrofagi, niektóre komórki nowotworowe) są szczególnie dobrymi producentami IFN po zadziałaniu odpowiedniego wirusa (lub innego induktora). Wewnątrzkomórkowa replikacja wirusa jest zawsze rodzajem wzrostu sterowanego przez wirusowe geny. Niektóre z tych genów wywierają w komórce bezpośrednie działanie mitogenne, chociaż inne geny wirusa mogą hamować syntezę makrocząsteczek i wzrost. Wirus krowianki, który jest znany z tego, że wywołuje proliferację naskórka, koduje wczesne białko homologiczne do czynnika wzrostowego — EGF [9].

Ostatnio wykryto też, że niektóre retrowirusy są nosicielami genów (onkogenów) sterujących wzrostem i różnicowaniem komórek normalnych i nowotworowych [10]. Ponadto nawet nieonkogenny wirus — VSV może indukować syntezę zarówno interferonu jak i białek mitogennych, w tym PDGF [11].

Wytwarzanie IFN jest najprawdopodobniej normalną reakcją regulacyjną komórki typu sprzężenia zwrotnego dla przeciwdziałania nadmiernej proliferacji, w danym przypadku sterowanej przez wirusa [1. 6, 11]. Prawdopodobnie takie reakcje zachodzą też w trakcie anarchicznego wzrostu nowotworowego, chociaż są na to tylko pośrednie dowody doświadczalne. Podanie myszom surowicy neutralizującej IFN- α , β ułatwia i przyspiesza wzrost guzów nowotworowych indukowanych albo przez wirusa mięsaka (MSV) albo powstałych w wyniku przeszczepienia tkanki [8, 12].

Obserwowano, że w czasie wzrostu embrionalnego, który jest przypuszczalnie sterowany przez płodowe GF działające w układzie autokrynym, w późnej fazie rozwoju dochodzi do spontanicznego wytwarza-

nia IFN. Hamuje on nadmierny wzrost i ułatwia różnicowanie. Niektóre komórki płodowe mają naturalny defekt w wytwarzaniu IFN, co jest związane z ich pro wzrostową determinacją. W miarę dojrzewania wiele płodowych komórek nabywa zdolność do wytwarzania IFN (u noworodków człowieka dotyczy to głównie zdolności do produkcji IFN γ) [14].

W układzie immunologicznym typowe limfokiny i cytokiny pro wzrostowe (IL-1, IL-2, CSF-1) potrafią bezpośrednio indukować syntezę IFN γ w limfocytach T. Znow przypuszczalnie jest to normalna reakcja regulacyjna, której celem jest przeciwdziałanie nadmiernemu rozplemowi tkanek limfatycznych stymulowanych przez GF [1, 7, 13].

Podobnie w komórkach nieimmunologicznych geny IFN mogą być aktywowane przez klasyczne GF takie jak PDGF czy białka z rodziny IL-1 (tzw. białko 22 K [11, 15]). Niektóre induktory IFN (poli 1:C, VSV) potrafią również wzbudzać syntezę PDGF, a później również IFN- β . Jednakże IFN jest zwykle syntetyzowany i wydzielany o wiele godzin później niż GF, co może mieć swoje uzasadnienie biologiczne w systemach autoregulacji wzrostu [1, 11, 14, 15]. Innymi słowy wytwarzanie „negatywnego” czynnika wzrostu przypuszczalnie zapobiega skutkom nadmiernej produkcji czynników „pozytywnych”.

IV. Antagonizm i synergizm w działaniu między interferonami a czynnikami wzrostowymi

Działanie zarówno GF, jak i IFN na morfologię i funkcje komórki jest zdumiewająco różnorodne. Przy czym efekty obu czynników są na ogół, przeciwstawne i często znoszą się wzajemnie (Tab. 2). Dlatego też rozpatrywanie IFN jako naturalnych antagonistów GF wydaje się być w pełni uzasadnione. Chociaż antagonizm ten nie musi zawsze występować na wszystkich etapach reakcji hormonalnej i nie zawsze musi mieć jednakowe nasilenie.

Dawniej podkreślano niezwykłą, wręcz niepojętą plejotropowość interferonów i wprowadzono nawet termin IFN-substancja wieloczynna (poly-practic substance, [16]). Obecnie w świetle hormonalnej koncepcji IFN termin ten nie wydaje mi się być odpowiednim, gdyż wieloczynność IFN nie jest bynajmniej większa niż wielofunkcyjność szeregu klasycznych hormonów takich jak np. insulina i jej analogi, kortykosterydy, EGF, PDGF i inne.

Na pierwszym miejscu w tabeli 2 umieściłam wpływ IFN na podziały komórek, ponieważ funkcja ta wydaje się być najbardziej istotna. Interferon hamuje mitozy komórkowe zainicjowane przez GF (zwykle występujące jako zespół synergistycznie działających hormonów). I na odwrót, GF przez stymulację komórki poddanej działaniu IFN potrafi

nawet całkowicie zahamować efekty przeciwwirusowe i przeciwwzrostowe IFN [1, 6, 8, 11, 15].

Mechanizm anty-proliferacyjnego działania IFN nie jest dotąd całkowicie rozszyfrowany. Wydaje się, że antagonizm między GF a IFN manifestuje się głównie w stosunkowo późnej fazie działania GF [11].

Tabela 2

Antagonistyczne działanie interferonów i czynników wzrostowych na różne funkcje komórki

Funkcja	IFN	GF
podziały (mitozy)	↓	↑
transformacja nowotworowa	↓	↑
ekspresja onkogenów	↓	↑
różnicowanie	↓↑	↑↓
interakcje z klasycznymi hormonami	↓↑	↑↓
zmiana morfologii	↓	↑
rozbudowa cytoszkieletu	↑	↓
ekspresja antygenów zgodności tkankowej i in.	↑↓	↓↑
modulacja receptorów	↑↓	↓↑
mobilizacja $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, Ca^{++}	—	↑
inkorporacja (^3H) tymidyny	↓	↑
synteza: białek		
RNA I DNA		
lipidów		
enzymów		
interferonu		
cAMP, cGMP	↓↑	↑↓
prostaglandyn		
prostacykliny		
ketosteroidów		
histaminy		
fagocytoza (makrofagów)	↑	↓↑
cytoksyczość (makrofagów, limfocytów)	↑	↓↑
chemotaksja	—	↑
migracja	↓	↑
pobudliwość (neuronów)	↑	↓↑
skurcze (mięśnia sercowego)	↑↓	↑↓
wytwarzanie przeciwciał (limfocyty B)	↑↓	↑↓

↑ — pobudzenie, ↓ — hamowanie, ↑↓ — reakcje w obu kierunkach, przeciwstawne

Wykryto, że IFN nie ma żadnego wpływu na przepływ jonów ($\text{Na}^+ - \text{H}^+$) wywołany parę minut po dodaniu GF do hodowli komórek [17]. IFN wywiera również stosunkowo niewielki wpływ na syntezę cyklicznych nukleotydów — cAMP i cGMP [17]. Natomiast zarówno GF jak i IFN wywołują głębokie zmiany w strukturze cytoszkieletu. Po zadziałaniu GF następują zmiany morfologii komórek, błony ich stają się bar-

dziej plastyczne i mobilne, następuje depolimeryzacja tubuliny i filamentów, zwiększa się migracja i ruchliwość [1, 17, 18]. Szczególnie silne działanie chemotaktyczne wykazuje PDGF [18]. Natomiast pod wpływem IFN komórka powiększa się i rozpląszcza, rozbudowuje się cytoskielet na skutek wzmożonej polimeryzacji mikrotubul i filamentów i zmniejsza się migracja [19]. Jednak zdolność do fagocytozy po dodaniu IFN wybitnie wzrasta. Rezultatem tego zjawiska jest zwiększona aktywność cytolityczna i bakteriobójcza niektórych komórek układu odpornościowego takich jak makrofagi, cytotoksyczne komórki T i NK [19].

W naszym laboratorium badaliśmy zjawisko antagonizmu między PDGF a IFN [1, 20—23]. PDGF jest jednym z najsilniej działających i najważniejszych regulatorów proliferacji komórek tkanki łącznej. Ponadto jest to jeden z nielicznych produktów onkogenów, który został zidentyfikowany jako autentyczny GF [24]. Doświadczenia nasze zaczęliśmy w 1979 r. wtedy, gdy jeszcze PDGF nie był całkowicie oczyszczony i dopiero zwracano uwagę na jego związek z nowotworzeniem. Stacjonarne, zahamowane kontaktowo hodowle fibroblastów człowieka lub myszy poddawano działaniu PDGF w celu stymulacji mitoz i badano wrażliwość takich komórek na IFN. Stwierdzono, że PDGF hamuje aktywność przeciwwzrostową i przeciwwirusową IFN ludzkiego i mysiego w homologicznych komórkach. Podobnie stransformowane, ludzkie komórki glejowe, stymulowane do wzrostu przez PDGF, EGF lub FGF stawały się mało wrażliwe na IFN [1, 21].

Kilka lat później różni badacze IFN i GF potwierdzili i rozszerzyli wyniki tych badań stosując inne stymulatory mitoz i rozmaite komórki [15, 17]. Jest rzeczą interesującą, że dzięki zastosowaniu PDGF lub TGF- α , β można było udowodnić, że jest możliwe wzajemne neutralizowanie efektów pobudzenia i hamowania również *in vivo*, w organizmie myszy z rosnącym nowotworem wywołanym przez wirus onkogenny (MSV) lub przez przeszczep komórek [1, 8, 22].

W myśl zasady, że wyjątek potwierdza regułę, w rzadkich przypadkach IFN pobudza wzrost niektórych komórek. W naszych doświadczeniach szereg lat temu zwróciliśmy uwagę na to, że w bardzo małych dawkach rzędu 0,01—0,1 jednostki, IFN pobudza proliferację fibroblastów. Zjawisko to można było wytłumaczyć przy założeniu, że IFN może ułatwiać działanie podprogowych dawek GF [23].

Ostatnio wykryto, że TGF β , który ułatwia wzrost wielu komórek nowotworowych wtedy, gdy współdziała z EGF lub TGF α , wywiera też działanie hamujące wzrost głównie komórek nabłonkowych [24]. W naszym laboratorium zaobserwowaliśmy, że mieszanina TGF- α , β pobudza proliferację autologicznych komórek mysich (C243), podczas gdy IFN α , β hamuje wzrost. Przy czym efekty działania obu czynników razem neutralizują się wzajemnie. Natomiast oczyszczony TGF β silnie hamował wzrost komórek raka płuc człowieka — A549. W tym układzie IFN α , β lub γ

(zarówno preparaty naturalne jak i pochodzące z rekombinacji) również hamowały wzrost komórek A549. Tak jak się spodziewano, działanie hamujące TGF β i IFN było synergistyczne, ponieważ należało założyć, że mają one różny mechanizm działania [8].

Innymi słowy, kooperacja między GF i IFN może być zarówno negatywna jak i pozytywna. Z tym, że ta ostatnia jest znacznie rzadsza.

W tym miejscu warto wspomnieć, że wielokrotnie opisywano synergizm w działaniu między IFN- α , β a IFN γ , np. 1 jednostka IFN γ działając łącznie z IFN α lub IFN β może dać efekt biologiczny (hamowania wzrostu wirusa lub komórek) ponad 20 razy większy niż spodziewany, wtedy gdy każdy z tych czynników działa osobno [6—8, 13]. Tego rodzaju synergizm w działaniu nie jest bynajmniej charakterystyczny tylko dla IFN, ponieważ większość substancji regulujących wzrost działa zespołowo uzupełniając się i wzmacniając wzajemnie [24].

Dopiero ostatnio wykonane prace doświadczalne są podstawą do zrozumienia mechanizmu przeciwstawnego działania IFN i GF na poziomie molekularnym. Punktem ich wyjścia były odkrycia dotyczące onkogenów. Proto-onkogeny czyli normalne, komórkowe odpowiedniki onkogenów powszechnie już uważa się za ważne geny obecne w każdej komórce, sterujące jej wzrostem i różnicowaniem [10]. Odpowiedniki komórkowych proto-onkogenów są integralną częścią transformujących wirusów. Wirusy nabywają onkogeny w czasie replikacji w komórce w procesie transdukcji. Produktami onkogenów są czynniki wzrostowe (sis — PDGF i analogi); mniej lub bardziej zmodyfikowane receptory GF (erbB — EGF, fms — CSF-1, ros — insulina); wewnątrzjądrowe białka indukowane pod wpływem substancji mitogennych (myc, fos) oraz inne białka efektorowe wiążące GTP (ras).

W mysich fibroblastach Balb/c 3T3 PDGF stymuluje ekspresję tzw. genów „kompetencji” (myc, fos, JE, KC). Umożliwiają one dokończenie mitozy tylko przy współdziałaniu tzw. genów „progresji” (indukowanych przez czynniki insulino-podobne lub EGF). Wtórna indukcja IFN β 2 po zadziałaniu PDGF umożliwia hamowanie wzrostu, który w przeciwnym razie byłby nadmierny i nieograniczony [11].

Komórki indukowane przez IFN zaczynają wytwarzać od kilku do kilkunastu nowych białek. IFN- α i IFN- β indukują zupełnie inny zestaw białek niż IFN γ , co jest jeszcze jednym dowodem na to, że mają one inny mechanizm działania na poziomie molekularnym [7, 13, 19]. Niektóre z tych białek zidentyfikowano jako enzymy: syntetazę 2—5 A, fosfokinazę białkową, cyklazę guanylanową, cyklooksygenazę i inne [17, 19].

Jednakże wytwarzanie wielu innych enzymów jest hamowane w obecności IFN, w tym: amino-transferazy tyrozyny w komórkach szczura indukowanych deksametazonem; syntetazy glutaminowej w siatkówce zarodka kurzego i dehydrogenazy 3-fosforanu glicerolu w komórkach glejowych szczura, obu indukowanych przez hydrokortyzon; dekarbo-

ksylazy L-ornityny indukowanej przez czynniki mitogenne oraz wątrobowego cytochromu P-450 związanego z monooksygenazą [17, 19].

Stwierdzono, że w czasie terapii IFN u kobiet spada poziom zarówno estradiolu jak i progesteronu [25]. Leczenie IFN powoduje też obniżenie poziomu hormonów tarczycy: T₃ i T₄ [26].

Komórki poddane działaniu IFN wytwarzają lub wydzielają zwiększoną ilość: prostaglandyn E, prostacykliny [27] (komórki maziowe i fibroblasty), histaminy (bazofile). Natomiast syntetyzują one mniej niektórych lipidów [19] i kolagenu [28].

W układzie immunologicznym wzajemne oddziaływanie między IFN a GF jest w zasadzie podobne jak w układzie nieimmunologicznym. Z tą różnicą, że wchodzi w grę inne komórki docelowe i inne hormony.

Interferony w odpowiednio wysokich dawkach hamują proliferację różnych komórek układu krwiotwórczego i immunologicznego, zarówno komórek pnia jak i ich pochodnych w różnym stadium różnicowania [1, 7, 13, 14, 19, 20, 29]. Wskaźnikiem tych reakcji jest m.in. pomiar hamowania inkorporacji (³H) tymidyny przez komórki stymulowane przez czynniki mitogenne (Con A, PHA, IL-1, IL-2) i poddawane działaniu IFN [13, 20, 29].

Dla prawidłowego działania układu odpornościowego ważne znaczenie ma ilość i prawidłowe rozmieszczenie na powierzchni błon komórkowych antygenów zgodności tkankowej i innych alloantygenów. Wprawdzie wiadomo, że wszystkie rodzaje IFN wybitnie zwiększają ekspresję tych antygenów, ale nie wiadomo o ile jest to związane z równoczesnym działaniem GF [16, 19].

Wydaje się, że bardziej zrozumiałą jest wpływ interferonów na wytwarzanie przeciwciał. Do tej roli przygotowują limfocyty B limfokiny (BCGF i BCDF). Duże dawki IFN hamują zarówno wzrost limfocytów B jak i produkcję przeciwciał. Podczas gdy małe dawki różnych IFN ułatwiają prezentację antygenów, dojrzewanie komórek B i w rezultacie końcowym wytwarzanie przeciwciał [13, 30].

V. Interferony i różnicowanie komórek

Z punktu widzenia biologa różnicowanie można zdefiniować jako skoordynowane w czasie i przestrzeni zmiany w syntezie makrocząsteček oraz w ich składzie, które prowadzą do nabycia przez komórkę specjalistycznych funkcji oraz zapewniają jej odpowiedni kształt i organizację. Innymi słowy różnicowanie zależy od rygorystycznie sterowanej i uporządkowanej (przy udziale hormonów) ekspresji genów, dzięki czemu komórka staje się specjalistką w określonym „zawodzie”. Proces różnicowania można śledzić dzięki stosowaniu substancji przyspieszają-

cych dojrzewanie i wykrywaniu markerów zmienionych komórek. W tym miejscu przedstawię tylko garść spostrzeżeń dotyczących interferonów.

Linia mysich fibroblastów (klon 3T3 L-1) jest znana z tego, że w czasie hodowli samoistnie zaczyna różnicować się do komórek tłuszczowych (adipocytów). Markerami różnicowania są: zmiana morfologii komórki, wzrost poziomu lipidów oraz blokowanie syntezy monofosforanu heksozy. Dodanie insuliny przyspiesza różnicowanie, podczas gdy IFN- α , β znacznie hamują ten proces. Hamujący wpływ IFN na różnicowanie opisano też w kilku innych systemach komórek [19, 31, 32].

Jest rzeczą zrozumiałą, że sterowanie przy pomocy hormonów tak złożonym procesem jak różnicowanie musi być zależne od wielu składowych takich jak: rodzaj komórek, jakość i dawki oraz czas działania IFN. Dlatego też znaleziono, zgodnie z oczekiwaniami układu, w których IFN sprzyja różnicowaniu.

Jeśli komórki białaczki Friend pobudzi się do różnicowania przez dwumetylosulfotlenek i następnie doda się małe dawki IFN- α , β (10—100 jedn./ml) to okazuje się, że została wzmożona synteza mRNA globin. Białka te są markerami dojrzewania i normalizacji erytroblastów. Podobne obserwacje poczyniono przy badaniu różnicowania komórek białaczki mysiej lub ludzkiej w obecności IFN [19, 31—34].

Dla celów zarówno poznawczych jak i praktycznych niezwykle ważne są spostrzeżenia dokonane w czasie stosowania preparatów interferonów w leczeniu białaczek u ludzi. Jak dotąd niewiele postaci białaczek jest podatnych na terapię interferonem. Tym bardziej godne podkreślenia są następujące odkrycia.

Klinicyści z różnych ośrodków naukowych potwierdzili niedawne odkrycie, że IFN α jest lekiem z wyboru w terapii białaczki włochato-komórkowej (hairy-cell leukemia). U większości pacjentów (choć nie wszystkich) po kilkumiesięcznym podawaniu IFN obserwowano poprawę zdrowia i często trwałą normalizację obrazu krwi i szpiku kostnego związaną ze znikaniem patologicznych komórek (hairy cells). Choć IFN ma wiele aktywności nie jest wykluczone, że końcowy efekt leczniczy zależy od naprawy spaczonych różnicowania limfocytów [35, 36]. Podobnym komentarzem można opatrzyć fascynujące doniesienia o skuteczności terapii interferonowej w niektórych postaciach przewlekłej białaczki szpikowej, szpiczakach mnogich i chłoniakach. W tej dziedzinie badania na poziomie molekularnym dopiero rozpoczęto [33—37].

VI. Ewolucja hormonów tkankowych

Zarówno GF jak i IFN są najprawdopodobniej bardzo starymi ewolucyjnie i konserwatywnymi białkami, które odgrywały swe sygnałowe role już u najprymitywniejszych organizmów. Duży materiał doświad-

czalny przemawia za tym, że bakterie, grzyby i pierwotniaki potrafią wytwarzać hormony i systemy odbioru sygnałów hormonalnych bardzo podobne do tych, które izoluje się z tkanek zwierząt wyższych. W miarę postępów ewolucji wykształciły się komórki i gruczoły wewnętrznego wydzielania, ale większość substancji sygnałowych jest nadal wytwarzana „na obwodzie”. Ponadto granice między wydzielaniem egzokrynnym i endokrynnym i między klasycznymi hormonami a czynnikami tkankowymi są płynne i wzajemnie przenikają się. Prace te stały się podstawą do sformułowania przez Rotha i w sp. nowej, ewolucyjnej teorii hormonów [1, 38, 39].

W wyniku olbrzymich postępów w klonowaniu genów interferonów i badaniu struktury białek przez nie kodowanych, zasób wiedzy w tej dziedzinie jest większy niż w przypadku innych substancji informacyjnych. Ale dotyczy on dotąd tylko IFN zwierząt wyższych i człowieka [40]. Odpowiedniki „negatywnych” czynników wzrostu zwierząt niższych czekają na swych odkrywców, bo trudno sobie wyobrazić, aby nie wykształciły się one równocześnie z czynnikami „pozytywnymi”.

Zaakceptowano do druku 14 stycznia 1987 r.

Piśmiennictwo

1. Inglot A. D., (1984), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **38**, 633—653.
2. Marcus P. I., (1983), w *Interferon 5*, red. I Gresser, 116—180, Acad. Press, New York.
3. Torrence P. F., De Clercq E. (1981), w *Meth. Enzymology*, t. 78, red. S. Pestka, 291—299, Acad. Press, New York.
4. Inglot A. D., Młochowski J., Szulc Z., Inglot O., Albin M., (1985), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **33**, 275—285.
5. Błach-Olszewska Z., (1984), *Post. Hig. Med. Dośw.* **38**, 655—666.
6. Inglot A. D., (1984), *Pat. Pol.* **35**, 245—261.
7. Pestka S., (1986), w *Meth. Enzymol. Interferons* t. 119, str. 1—600, Acad. Press, New York.
8. Popik W., (1986), praca doktorska, IITD PAN Wrocław.
9. Blomquist M. C., Hunt L. T., Barker W. C., (1984), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 7363—7367.
10. Jakóbisiak M., (1985), *Post. Biol. Kom.* **12**, 289—334.
11. Zullo J. N., Cahran B. H., Huang A. S., Stiles C. D., (1985), *Cell*, **43**, 793—800.
12. Inglot A. D., Inglot O., Żółtowska A., Oleszak E., (1979), *Int. J. Cancer*, **24**, 261—265.
13. Kirchner H., (1984), w *Progr. Clin. Biochem.* t. 1, str. 171—203, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
14. Kisielow P., Krammer P. H., Hültner L., Von Boehmer H., (1985), *Thymus*, **7**, 189—198.
15. Einat M., Resnitzky D., Kimchi A., (1985), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **82**, 7608—7612.

16. Gresser I., (1985) w: Interferon 6, red. I. Gresser, str. 93—126, Acad. Press, New York.
17. Taylor-Papadimitrou J., Ebsworth N., Rozengurt E. (1985), w Mediators in Cell Growth and Differentiation, red. R. J. Ford i A. L. Maizel. 283—298, Raven Press, New York.
18. Denel T. F., Senior R. M., Huang J. S., Griffin G. L., (1982), *J. Clin. Invest.*, **69**, 1046—1049.
19. Taylor J. L., Sabran J. L., Grossberg S. E., (1984), w Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 71, red. P. E. Came i W. A. Carter, 169—203, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg.
20. Inglot A. D., Pajtasz E., (1986), *Meth. Enzymology*, **119**, 657—666.
21. Oleszak E., Inglot A. D. (1980), *J. Interferon Res.* **1**, 37—48.
22. Inglot A. D., Inglot O., (1983), *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **31**, 243—248.
23. Inglot A. D., Albin M. (1983), *J. Interferon Res.*, **3**, 75—81.
24. Goustin A. S., Leof E. B., Shipley G. D., Moses H. L., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 1015—1029.
25. Kauppila A., Cantell K., Jänne O., Kokko E., Vihko R., (1982), *Int. J. Cancer*, **29**, 291—294.
26. Orawa M., Cantell K., Kauppila A., Vihko R., (1983), *Int. J. Cancer*, **31**, 671—672.
27. Eldor A., Fridman R., Vlodyarsky I., Hy-Am E., Fuks Z., Panet A., (1984), *J. Clin. Invest.*, **73**, 251—257.
28. Jimenez S. A., Freundlich B., Rosenbloom J., (1984), *J. Clin. Invest.*, **74**, 1112—1116.
29. Toretsky J. A., Shahidi N. T., Finlay J. L., (1986), *Exp. Hematol.* **14**, 182—186.
30. Nakagawa T., Nakagawa N., Volkman D. J., Fauci A. S., (1986), *J. Immunol.* **136**, 164—168.
31. Grossberg S. E., Taylor J. L., (1984), w Interferon, t. 3, red. R. M. Friedman, str. 299—317, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.
32. Rossi, G. B., (1985), w Interferon 6, red. I. Gresser, str. 31—68, Acad. Press, New York.
33. Weinberg J. B., Misukonis M. A., Hobbs M. M., Borowitz M. J., (1986), *Exp. Hematol.* **14**, 138—142.
34. Hamburger A. W., White C. P., Siebenlist R. E., Sedmak J. J., Grossberg S. E., (1985), *Cancer Res.* **45**, 5369—5373.
35. Quesada J. R., Guterman J. U., Hersh E. M., (1986), *Cancer (Suppl.)* **57**, 1678—1680.
36. Castaigne S., Sigaux F., Cantell K., Falcoff E., Boiron M., Flandrin G., Degos L., (1986), *Cancer (Suppl.)* **57**, 1681—1684.
37. Talpaz M., Kantarjian H. M., Mc Credie K., Trujillo J. M., Keating M. J., Gutterman J. U., (1986), *N. Engl. J. Med.*, **314**, 1065—1069.
38. Le Roith D., Roth J., (1984), w Frontiers in Neuroendocrinology, t. 8, red. L. Martini i W. F. Ganong, str. 1—25, Raven Press, New York.
39. Le Roith D., Roth J., (1984), w Evolution of Tumour Pathology of the Neuroendocrine System, red. S. Falkmer, R. Håkanson, F. Sundler, str. 147—164, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.
40. Miyata T., Hayashida H., Kikuno R., Toh H., Kawada Y., (1985), w Interferon 6, red. I. Gresser, 1—30, Acad. Press, New York.

WALDEMAR POPIK *

Transformujące czynniki wzrostowe

Transforming growth factors

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Hipoteza autokrynej stymulacji proliferacji
- III. Klasyfikacja i pochodzenie TGF
- IV. Oczyszczanie i cechy biochemiczne TGF
- V. Struktura TGF- α i TGF- β
- VI. Sposób działania TGF

Contents

- I. Introduction
- II. Hypothesis of the autocrine stimulation of proliferation
- III. Classification and origin of TGFs
- IV. Purification and biochemical properties of TGFs
- V. Structure of TGF- α and TGF- β
- VI. The mode of action of TGFs

Wykaz stosowanych skrótów: TGF (transforming growth factor) — transformujący czynnik wzrostowy, EGF (epidermal growth factor) — naskórkowy czynnik wzrostowy, PDGF (platelet-derived growth factor) — czynnik wzrostowy pochodzący z płytek krwi, MSA (multiplication stimulating activity) — aktywność stymulująca mitozy komórek, IGF (insulin-like growth factor) — insulino-podobny czynnik wzrostowy, IFN — interferon, MoMSV (Moloney murine sarcoma virus) — wirus mysiego mięsaka Moloneya, KiMSV (Kirsten murine sarcoma virus) wirus mysiego mięsaka Kirstena, FSV (feline sarcoma virus) wirus kociego mięsaka, RSV (Rous sarcoma virus) — wirus mięsaka Rousa, AbMLV (Abelson murine leukemia virus) — wirus mysiej białaczki Abelsona.

I. Wstęp

Proliferacja normalnych, diploidalnych komórek ssaków w hodowli *in vitro* znajduje się pod kontrolą egzogennych polipeptydowych czynników wzrostowych dostarczanych zwykle do płynu hodowlanego z suro-

* Dr, Laboratorium Wirusologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław.

wicy. Odpowiedź komórek na sygnał mitogeny uwarunkowana jest obecnością swoistych receptorów błonowych, a także obecnością sprawnego systemu efektorowego.

Cechą charakterystyczną endokrynej lub parakrynej kontroli wzrostu jest zależność komórek od sygnałów mitogeny pochodzących ze środowiska. W przypadku komórek nowotworowych dochodzi do zaburzenia lub uniezależnienia się (przynajmniej częściowego) od endokrynej kontroli wzrostu, co prowadzi w konsekwencji do niekontrolowanej proliferacji i zaburzenia homeostazy organizmu.

W niniejszym artykule zająłem się opisem specjalnej klasy endogeny, polipeptydowy czynniki wzrostowy, które oprócz działania mitogeny posiadają także aktywność fenotypowej transformacji komórek normalnych i nazwanych stąd transformującymi czynnikami wzrostowymi — TGF (transforming growth factors). Na temat polipeptydowy czynniki wzrostowy (w tym również TGF) ukazały się w Postępach Biochemii krótkie doniesienia Inglot [1], Farbiszewskiego [2] oraz praca przeglądowa Farbiszewskiego i Gabryel [3].

II. Hipoteza autokrynej stymulacji wzrostu

W 1976 r. G. Todaro i J. DeLarco wykazali, że mysie fibroblasty 3T3 transformowane przez onkogenne wirusy RNA traciły wybiórczo zdolność wiązania przez receptory błonowe czynnika wzrostu naskórka EGF [4], podczas gdy wiązanie innych czynniki wzrostu, takich jak MSA [5] oraz insuliny [6], było niezmienione. Zjawisko utraty receptorów błonowych wiążących EGF nie jest jednak cechą charakterystyczną transformacji nowotworowej komórek. Wykazano bowiem, że komórki transformowane przez onkogenne wirusy DNA, wiele komórek transformowanych chemicznie [4] oraz niektóre komórki nowotworowe [7–9] zachowały zdolność wiązania EGF. Wysznięto przypuszczenie, że utrata receptorów EGF towarzysząca transformacji nowotworowej komórek przez onkogenne wirusy RNA, wynika z syntezy czynniki wzrostowy przez komórki transformowane. Czynniki te, w wyniku połączenia się z receptorami EGF, indukują proces usuwania kompleksów czynniki wzrostowy — receptor EGF z powierzchni komórek zmniejszając liczbę dostępnych receptorów EGF. Z płynu po hodowli mysich fibroblastów 3T3 transformowanych przez wirus mięsaka Moloneya (MoMSV), wyizolowano niskocząsteczkowe peptydy, tzw. czynniki wzrostu mięsaka SGF [10], zaliczone następnie do grupy czynniki transformujących.

Nową i niezwykłą cechą tej grupy czynniki wzrostowy była ich zdolność do odwracalnej transformacji fenotypowej komórek. Obecność TGF w pożywce, w której rosły komórki niestransformowane, wywoływała utratę zahamowania proliferacji pojedynczej warstwy komórek na-

dając im zdolność do wzrostu wielowarstwowego i niezależnego od przylegania do podłoża (anchorage-independence) oraz wywoływała zmianę morfologii komórek na przypominającą komórki stransformowane genetycznie [11]. Powyższe obserwacje stały się podstawą sformułowanej przez Sporna i Todaro [12] hipotezy autokrynej stymulacji wzrostu komórek. Głosi ona, że komórki stransformowane są zdolne do produkcji własnych, polipeptydowych czynników wzrostowych, które — wydzielane z komórek — mogą poprzez zewnątrz błonowy system receptorowy indukować w nich serię zmian biochemicznych charakterystycznych dla stanu transformacji nowotworowej.

Otrzymano wiele danych potwierdzających hipotezę autokrynej stymulacji wzrostu. Autokryny mechanizm działania TGF wykazano np. w doświadczeniach z mutantami wirusa Moloneya [13] transformującymi komórki w temperaturze permissyjnej, w której zachodzi synteza aktywnego biologicznie produktu onkogenu wirusowego p37^{mos} oraz TGF. Zdolność szczurzych i mysich komórek stransformowanych przez wirusy mięsaka Kirstena (KiMSV) do ciągłego wzrostu w pożywce bez surowicy jest spowodowana wytwarzaniem TGF przez te komórki. Komórki stransformowane przez wrażliwe na temperaturę mutanty wirusa KiMSV rosną w pożywce bez surowicy tylko w temperaturze, w której zachodzi synteza aktywnego produktu onkogenu wirusowego p21^{K-ras} i TGF. W temperaturze niepermissyjnej komórki te nie rosną, lecz dodanie do pożywki TGF produkowanego przez komórki stransformowane przez niedefektywne wirusy KiMSV znosi całkowicie to ograniczenie [14]. Ścisłą zależność między syntezą aktywnego biologicznie produktu onkogenu wirusowego i TGF potwierdziły także wyniki doświadczeń z dzikimi szczepami wirusa białaczki Abelsona (AbMLV) oraz mutantami niezdolnymi do transformacji nowotworowej komórek [15].

Hipotezę autokrynej stymulacji wzrostu potwierdziły ostatnio badania Rosenthala i w s.p. [16]. Badacze ci wprowadzili do szczurzych fibroblastów plazmid z dołączonym genem kodującym TGF- α i stwierdzili, że klony komórkowe o wysokim poziomie ekspresji tego genu wykazują cechy fenotypowe charakterystyczne dla komórek stransformowanych. Komórki rosły w agarze a wszczepione myszom bezgranicznie („nude”) tworzyły nowotwory. W obecności przeciwciał monoklonalnych anti-TGF- α komórki w hodowli *in vitro* traciły fenotyp stransformowany i stawały się podobne do komórek niestransformowanych.

Wydzielanie przez komórki czynników transformujących może okazać się w pewnych przypadkach niewystarczające do utrzymania fenotypu stransformowanego. Uzyskano np. klony komórek stransformowanych przez wirusy KiMSV [17] zbliżonych fenotypowo do komórek wyjściowych. Rewertanty jednak nadal wykazywały wysoki poziom ekspresji onkogenu wirusowego Ki-ras i produkowały TGF.

Tabela 1

Materiał biologiczny, z którego izolowano TGF

		Pochodzenie TGF		
	Zewnętrzne komórki	Wewnętrzne komórki	Piśmiennictwo	Piśmiennictwo
Komórki sformowane przez wirusy	mysie fibroblasty 3T3/MoMSV	mysie fibroblasty 3T3/MoMSV	10,27	63,65
	szczurze fibroblasty embrionalne: Fre/AbMLV Fre/FSV	szczurze fibroblasty embrionalne: Fre/AbMLV Fre/FSV	15 28—30	
Komórki sformowane chemicznie	szczurze fibroblasty nerki: NRK/KIMSV NRK/RSV	szczurze fibroblasty nerki: NRK/KIMSV NRK/RSV	31 32 33 33	62 63 64
	chomicze fibroblasty BHK/RSV	chomicze fibroblasty BHK/RSV		
	pierwotne fibroblasty kurczenia CEF/RSV	pierwotne fibroblasty kurczenia CEF/RSV		
	mysie C3H /MCA, AKR/ MCA	mysie C3H /MCA, AKR/ MCA	34—35	
Linie nowotworowe	ludzkie: mięśniakomięsak A673, rak oskrzelopochodny 9812, czerniak A2058 rak kory nadnerczy SW-13 czerniak Hs0294 rak gruczołów ślinowych HSG rak okrężnicy SW480, SW620, WIDR rak sutka MCF-7 białaczka MOLT-4f mysie: nerwiak Neuro-2A	ludzkie: rak płuc A549, rak nosogardzieli D562, mięśniakomięsak A204, czerniak A375, gruczolakorak mózgu, nerek, jajników, okrężnicy, sutka mysie: rak pęcherza i tchawicy włókniakomięsak C-243	9,36 37 28, 39 40 41 42	44

Pochodzenie TGF

	Zewnątrzkomórkowe	Piśmien- nictwo	Wewnątrzkomórkowe	Piśmien- nictwo
Komórki nienowo- tworowe	ludzkie fibroblasty embrionalne HEF ptasie CEF szczurze fibroblasty nerki NRK-49F płodowa tkanka kostna mysie fibroblasty AKR-2B	45, 46 47 48 35	ludzkie tkanki nerek i płuc tkanki ludzkiego łożyska ludzkie i bydłecze płytki krwi bydłecze tkanki nerek i gruczołów podszczękowych mysie tkanki: gruczoły podszczę- kowe, nerki, wątroba, mięśnie, serce, mózg	58 59, 60 49 61 11
Tkanki embrionalne			mysie 12—13-dniowe embriony szczurze 19-dniowe embriony	53 57
Płyny ustrojowe	surowica bydłeca siara ludzka siara kozia mocz ludzi zdrowych i z nowotworem mocz kobiet ciężarnych mocz myszy normalnych i z nowotworami	49 50, 51 52 48, 53—55 53 56		

III. Klasyfikacja i pochodzenie TGF

Podstawą klasyfikacji TGF [18] są następujące cechy biologiczne: konkurencja z EGF o receptory błonowe oraz niezbędna obecność EGF w układzie doświadczalnym do ujawnienia się aktywności koloniotwórczej TGF. Wybór do testów koloniotwórczych niestransformowanych szczyrzych komórek NRK-49F [19], szczególnie łatwo poddających się transformacji fenotypowej, pozwolił na wyróżnienie dwóch typów czynników transformujących, TGF- α i TGF- β [18, 20]. TGF- α są mitogennymi polipeptydami, które cechuje zdolność wiązania się z receptorami błonowymi EGF oraz stymulowanie komórek testowych do proliferacji i tworzenia małych kolonii w agarze. Pole powierzchni takich kolonii komórkowych nie przekracza zwykle 1000—2000 μm^2 co odpowiada 5—10 komórkom w kolonii. TGF- β są warunkowo mitogennymi polipeptydami [21, 22], które nie wiążą się z receptorami EGF i wymagają obecności EGF lub TGF- α aby mogły pobudzić komórki testowe do wzrostu w agarze i tworzenia dużych kolonii o powierzchni 7000—15000 μm^2 , co odpowiada 30—60 komórkom w kolonii [23]. Inne komórki jak np. fibroblasty szczyrce Rat-1 [24], embrionalne fibroblasty kurczęcia [33], mysie fibroblasty AKR-2B [34] lub Balb/c 3T3 [50, 25, 26] są zdolne do wzrostu w agarze w obecności TGF- β (bez egzogenego EGF). Wynika to prawdopodobnie ze zwiększonej wrażliwości tych komórek na EGF obecny w surowicy dodawanej do pożywki z agarem lub spowodowane jest wytwarzaniem przez komórki czynnika wzrostowego podobnego do EGF.

Stwierdzono, że wielu TGF nie można wykryć w teście koloniotwórczym z komórkami NRK. Na przykład TGF pochodzące z tkanek nabłonkowych stymulowały proliferację w agarze komórek raka kory nadnerczy SW-13 [58]. Czynniki transformujące izoluje się z płynów po hodowli komórek (conditioned medium), płynów ustrojowych oraz na drodze bezpośredniej ekstrakcji komórek i tkanek. Źródła, z których izolowano TGF przedstawiono w tabeli 1.

IV. Oczyszczanie i cechy biochemiczne TGF

TGF- α wykrywa się zwykle tylko w tkankach nowotworowych i płodowych i dlatego przypuszcza się, że jest on embrionalnym odpowiednikiem EGF, który ulega niewłaściwemu i niekontrolowanemu wytwarzaniu przez komórki nowotworowe. Obecność TGF- β stwierdzono we wszystkich badanych dotąd tkankach i komórkach.

Metody stosowane do oczyszczania TGF opierają się na ich dwóch cechach fizycznych: stabilności w środowisku kwaśnym oraz stosunkowo niskiej masy cząsteczkowej (6000—25000 daltonów). Jako pierwszy etap oczyszczania TGF stosuje się zmodyfikowaną przez Roberts i wsp.

[63] metodę ekstrakcji tkanek roztworem kwasu solnego w alkoholu etylowym. Metodę tę stosowano wcześniej w celu wyodrębnienia z narządów oraz krwi biologicznie aktywnych peptydów takich jak np. insulina [37], glukagon, somatomedyny lub sekretyna [63]. Metoda ta oprócz niewątpliwej zalety, możliwości przebadania dużej masy różnych komórek i tkanek, posiada także ograniczenia związane z niemożnością izolowania natywnych kwasolabilnych odmian TGF [32, 25].

Kolejnym, rutynowo stosowanym etapem w oczyszczaniu TGF jest filtracja ekstraktu na kolumnach zawierających Bio-Gel P-60 lub P-30 w 1 M kwasie octowym. Stosując tę technikę wykazano obecność TGF- β w ekstraktach z tkanek nerek, łożyska oraz płytek krwi [66], natomiast w płynie po hodowli stransformowanych szczurzych fibroblastów embrionalnych wykazano obecność TGF- α i TGF- β [30]. Jest cechą charakterystyczną, że TGF- β migruje w żelu niezgodnie z masą cząsteczkową, np. TGF- β z ludzkiego łożyska eluuje się w zakresie 3000—6000 daltonów, natomiast z nerek bydłęcych i ludzkich płytek krwi odpowiednio w zakresach 8000—12000 i 15000—18000 daltonów [66]. TGF z ekstraktów guzów nowotworowych powstałych po podskórnym wszczepieniu myszom stransformowanych komórek C-243 eluował się w postaci jednego szerokiego szczytu leżącego w zakresie mas cząsteczkowych 10000—18000 daltonów [64]. Dalsze oczyszczanie chromatograficzne na kolumnach z CM-Sepharose i Bio-Gel P-10 pozwoliło oddzielić wysokocząsteczkową odmianę TGF- α (25000—27000 daltonów) od TGF- β (18000—20000 daltonów). Całkowite oczyszczenie TGF- β uzyskano po elektroforezie preparatywnej w żelu poliakrylamidowym z SDS. Masa cząsteczkowa oczyszczonego TGF- β sięgała około 25000 daltonów podobnie jak donieśli inni autorzy [60, 67, 68]. Wydajność oczyszczania wynosiła około 5 ng TGF- β z 1 g guzów C-243, podobnie jak w przypadku nerek bydłęcych i ludzkiego łożyska [66]. Najbogatszym źródłem TGF- β okazały się płytki krwi, których 1 g zawiera około 400 ng TGF- β [66].

Znacznym uproszczeniem w oczyszczaniu TGF okazało się zastosowanie już po pierwszym etapie filtracji żelowej chromatografii na kolumnach HPLC [29, 30], lecz nawet stosując tę technikę nie udało się poprawić wydajności oczyszczania, prawdopodobnie ze względu na bardzo małe stężenia TGF w materiale biologicznym oraz oddziaływania synergistyczne czynników transformujących z czynnikami wzrostu obecnymi w oczyszczanym materiale [20, 21, 29, 69, 70].

TGF, niezależnie od pochodzenia są niskocząsteczkowymi, w większości ciepło- i kwasostabilnymi peptydami wrażliwymi na działanie związków redukujących wiązania dwusiarczkowe [9, 10, 34, 44, 50, 53] oraz opornymi na denaturujące działanie mocznika [66, 67]. W kilku przypadkach wykryto TGF o odmiennej charakterystyce. Na przykład TGF izolowany z płynu po hodowli szczurzych komórek 77N1 jest cie-

pło- i kwasolabilnym peptydem [32], natomiast TGF wykryty w ekstrakcie ludzkich komórek białaczkowych posiadał dodatkowo cechę znacznej niewrażliwości na dwutiotreitol [25].

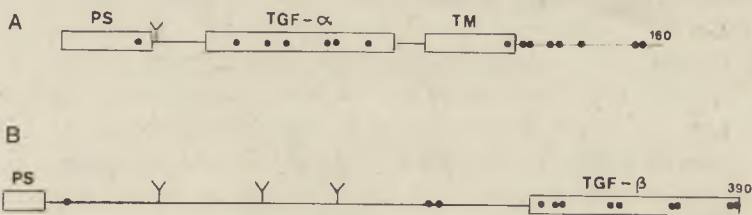
V. Struktura TGF- α i TGF- β

Całkowitą strukturę pierwszorzędową TGF poznano dotychczas w przypadku ludzkiego [71] i szczurzego TGF- α [72—74] oraz ludzkiego [75] i mysiego TGF- β [76]. Znając częściowo sekwencję aminokwasową tych peptydów, zsyntetyzowano odpowiednie łańcuchy dezoksyoligonukleotydomowe, które zostały następnie użyte jako sondy hybrydyzacyjne w celu identyfikacji eksonów TGF- α i TGF- β w bibliotece genów człowieka [71, 75, 76]. Analiza sekwencji nukleotydowych cDNA wykazała, że TGF- α i TGF- β są prawdopodobnie syntetyzowane w postaci znacznie większych peptydów prekursorowych. Forma prekursorowa ludzkiego TGF- α (preproTGF- α) zbudowana jest ze 160 reszt aminokwasowych i jest w 91% homologiczna z sekwencją aminokwasową szczurzego preproTGF- α , krótszą tylko o jedną resztę aminokwasu. W obu przypadkach natywne formy TGF- α (homologiczne w 92%) zbudowane są z 50 reszt aminokwasowych i zajmują środkowy obszar cząsteczek prekursorowych (reszty 40—89 w przypadku ludzkiego i 39—88 w przypadku szczurzego preproTGF- α). Ponadto, w łańcuchu peptydowym form prekursorowych ludzkiego (reszty 103—121) i szczurzego (reszty 102—120) TGF- α stwierdzono obecność identycznych, silnie hydrofobowych fragmentów, które mogą stanowić domeny transmembranowe zakotwiczone białka prekursorowe w błonie plazmatycznej komórki [71, 74]. Po obróbce enzymatycznej białka prekursorowego następuje uwalnianie TGF- α przez komórki do środowiska. Dotychczas nie wykryto formy prekursorowej TGF- α w błonie plazmatycznej komórek. Udało się to jednak wykazać dla innego czynnika wzrostowego — EGF. W pewnych obszarach mysiej nerki stwierdzono obecność białka prekursorowego EGF wbudowanego do błon komórkowych [77]. Nie wykryto jednak dojrzałej formy EGF, co sugeruje że jest ono integralnym białkiem błonowym.

Pomimo braku pokrewieństwa immunologicznego pomiędzy TGF- α i EGF (przeciwciała anty-EGF nie neutralizują TGF- α [10, 13]) okazało się, że oba peptydy są spokrewnione ze sobą strukturalnie. Mysi i ludzki EGF (homologiczne w 70% [72]) wykazują odpowiednio 33 oraz 44% homologii z sekwencją aminokwasową szczurzego TGF- α [72, 74]. Wykazano również podobieństwo sekwencji aminokwasowej TGF- α z peptydami kodowanymi przez genom wirusa krowianki [78—82] oraz z niektórymi czynnikami krzepnięcia krwi [78] i fibrylizy [71]. Szczególnie ważną rolę przypisuje się 6 resztom cysteiny zajmującym stałe pozycje

w strukturze pierwszorzędowej TGF- α oraz EGF i spinających cząsteczki trzema wiązaniami dwusiarczkowymi [71].

TGF- β tworzą odrębną grupę biologicznie aktywnych peptydów, które nie wykazują strukturalnego podobieństwa do żadnego z poznanych dotąd czynników wzrostu. Wykazano jednak istotną homologię sekwencji aminokwasowych TGF- β i podjednostki β inhibiny, hormonu peptydowego hamującego wydzielanie FSH — hormonu pobudzającego pęcherzyki [83]. TGF- β jest dimerem zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek połączonych przynajmniej jednym wiązaniem dwusiarczkowym [75, 76]. Sekwencję nukleotydową cDNA TGF- β (i wcześniej TGF- α) określiła grupa badaczy z Genentech, USA [75, 76]. cDNA formy prekursorowej ludzkiego TGF- β koduje peptyd zbudowany z 391 reszt lub w przypadku mysiego TGF- β z 390 reszt aminokwasowych. W sekwencjach aminokwasowych cząsteczek prekursorowych ludzkiego oraz mysiego TGF- β wyróżnić można trzy obszary wzajemnej homologii. Pierwszy, N-końcowy fragment obu cząsteczek obejmujący sekwencje peptydów sygnałowych i dalej aż do 114 reszty aminokwasowej, wykazuje wysoki stopień homologii sięgający 97%. Niezwykle konserwatywna sekwencja TGF- β (tylko jedna zmiana aminokwasu; na miejscu Ser-353 w mysim TGF- β występuje Ala w ludzkim TGF- β) tłumaczy obserwowany wcześniej brak swoistości gatunkowej obu peptydów [30, 64, 70, 84, 85]. Największą zmienność w sekwencji aminokwasowej obu peptydów stwierdzono w obszarze środkowym (reszty 115—274), lecz także tutaj homologia sięgała 77%. Monomer dojrzałego TGF- β (o masie cząsteczkowej około 12500 daltonów) zbudowany jest ze 112 reszt aminokwasowych i zajmuje C-końcowy fragment cząsteczki prekursorowej (reszty 280—391 w przypadku ludzkiego TGF- β). W sekwencjach mysiego i ludzkiego prekursora TGF- β znaleziono trzy potencjalne miejsca N-glikozylacji występujące jednak poza obszarem dojrzałego TGF- β . Spośród 12 reszt cysteiny obecnych w monomerze preproTGF- β aż 9 reszt znajduje się w podjednostce dojrzałego TGF- β . Dotąd nie zlokaliz-



Ryc. 1. Schemat struktury form prekursorowych TGF- α i TGF- β A. prepro TGF- α (71, 74), B. prepro TGF- β [75, 76], PS — peptyd sygnałowy, TM — potencjalny obszar transmembranowy, Y — potencjalne miejsce N-glikozylacji, • — reszta cysteiny.

zowano mostków dwusiarczkowych w natywnej, dimerycznej formie TGF- β .

Schemat budowy peptydów prekursorowych TGF- α oraz TGF- β przedstawiono na (Ryc. 1).

VI. Sposób działania TGF

Podobnie jak wiele innych hormonów peptydowych, czynniki wzrostowe inicjują swoje działanie na komórki poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami błonowymi [86]. Niezdolność TGF- α do stymulacji syntezy DNA w komórkach, które nie mają funkcjonalnych receptorów EGF [13] oraz możliwość zahamowania aktywności biologicznej TGF- α przez przeciwciała antyreceptorowe hamujące wiązanie EGF [87], wskazuje na udział tych receptorów w wiązaniu TGF- α . Potwierdziły to również badania z zastosowaniem syntetycznego fragmentu szczyrzo TGF- α (reszty 34—43), który hamował kompetycyjnie wiązanie EGF i TGF- α z receptorami oraz wykazywał wobec tych czynników wzrostowych działanie antagonistyczne [88].

Receptory komórkowe EGF/TGF- α są najlepiej dotąd poznanymi receptorami czynników wzrostowych. Część cząsteczki receptora EGF/TGF- α jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 170000—180000, zakotwiczoną w błonie cytoplazmatycznej komórki o strukturze charakterystycznej dla wielu innych receptorów hormonów peptydowych (PDGF [89], insulina [90, 91], IGF-I i IGF-II [92]). Silnie hydrofobowy obszar transbłonowy receptora graniczy z zewnątrzbłonową domeną wiążącą EGF lub TGF- α , a po stronie cytoplazmatycznej komórki, domeną wykazującą aktywność enzymatyczną fosfokinazy białkowej [93—96].

Nie wiadomo dotąd, czy zachodzi jakaś zależność pomiędzy aktywnością kinazy białkowej fosforylującej reszty tyrozynowe białka receptorowego w procesie autofosforylacji [15] i egzogenne substraty peptydowe [97], a mechanizmem stymulacji mitogennej. Warto wspomnieć, że sekwencje aminokwasowe fragmentu receptora EGF (bez domeny wiążącej ligandy) i produktu onkogenu wirusowego v-erb B są w znacznym stopniu homologiczne [98]. Receptory TGF- β wykryto na wielu komórkach normalnych i nowotworowych pochodzenia mezenchymalnego i nabłonkowego [85, 99]. Stosując technikę kowalencyjnego wiązania znakowanego ^{125}I -TGF- β z receptorami oraz elektroforezę w żelu poliakryloamidowym z SDS w warunkach redukujących, określono masę cząsteczkową receptorów na około 280000 (komórki szczyrzo, mysie i ptasie) lub w przypadku ludzkich fibroblastów na 330000 [99]. Z badań hydrodynamicznych wynika jednak, że natywny receptor TGF- β jest prawdopodobnie dimerem o masie cząsteczkowej około 565000 (komórki mysie) lub 615000 (komórki ludzkie), którego podjednostki połączone są wią-

zianami dwusiarczkowymi [100]. Odmiennie niż TGF- α oraz wielu innych mitogennych czynników wzrostu [89—92], TGF- β nie stymuluje aktywności kinazy fosforylującej reszty tyrozynowe białek [101].

Jedną z cech charakterystycznych TGF- β jest jego dwufunkcyjność: w pewnych przypadkach TGF- β stymuluje proliferację komórek, natomiast w innych działa jak typowy inhibitor wzrostu. Wydaje się, że TGF- β jest identyczny z inhibitorem wzrostu wyizolowanym z płynu po hodowli małych komórek nerki BSC-1 [102] i może być zatem uważany za jeden z pierwszych, oczyszczonych do homogenności chalonów [21]. Chociaż TGF- β stymuluje na ogół podziały komórek mezenchymalnych oraz hamuje mitozy komórek nabłonkowych, to jednak w przypadku szczurzych fibroblastów Myc-1, transfekowanych onkogenem *c-myc*, efekt końcowy działania TGF- β (stymulowanie wzrostu lub zahamowanie) zależał od zestawu czynników wzrostowych obecnych w pożywce [21, 103].

Interesujące wyniki dotyczące mechanizmu działania TGF- β przedstawił ostatnio A s s o i a n [104, 105], który na przykładzie szczurzych fibroblastów NRK wykazał zróżnicowaną w czasie i charakterze modulację receptorów EGF przez TGF- β . Wiązanie EGF przez receptory komórkowe o wysokim powinowactwie do liganda ($k_d = 0,3$ nM) było początkowo (przez 6—8 godz.) hamowane przez TGF- β , jako wynik przejściowego obniżenia powinowactwa receptorów. Po dłuższej inkubacji komórek z TGF- β (16—24 godz.) następuje dwukrotne zwiększenie wiązania EGF w wyniku przyrostu liczby receptorów o wysokim powinowactwie. Indukowane przez TGF- β zmiany wiązania EGF przez receptory komórkowe przebiegają równolegle ze zmianami aktywności mitogennej EGF, mierzonej stopniem wbudowania trytowanej tymidyny w DNA [105]. Wydaje się jednak, że zwiększenie wrażliwości komórek na EGF nie jest jedynym sposobem mitogennego działania TGF- β . Wykazano bowiem, że TGF- β w mysich komórkach AKR-2B aktywuje onkogen komórkowy *c-sis* i produkcję autokrynowych czynników wzrostu podobnych do PDGF, które bezpośrednio stymulują mitozy komórkowe [106]. Nadal nie jest znany mechanizm hamowania przez TGF- β proliferacji komórek pochodzenia nabłonkowego, które nie zawierają receptorów PDGF [107]. Wykazano, że TGF- β hamuje podziały wielu nowotworowych komórek nabłonkowych [21], normalnych komórek nabłonkowych nerki [102], hepatocytów [108], prokeratynocytów [109], a także tymocytów [110]. Powyższe obserwacje znalazły swoje odbicie w poszerzonej przez Sporna i Roberts [22] autokrynnej hipotezie transformacji nowotworowej. Według tych autorów stan transformacji nowotworowej jest wynikiem nie tylko nadmiernego wytwarzania pozytywnych autokrynnych czynników wzrostu (np. PDGF lub TGF- α), lecz może wynikać z zaburzenia wytwarzania negatywnych czynników wzrostu, do których zalicza się oprócz TGF- β także interferony [111, 112].

Efekty biologiczne wywoływane przez TGF- α i EGF są podobne do siebie, prawdopodobnie w wyniku oddziaływania z tym samym typem receptorów komórkowych [113, 114]. Oba czynniki wzrostowe stymulują mitozy [21, 30, 84] i aktywność niektórych enzymów komórkowych (np. dekarboksylazy ornitynowej [115]), wykazują synergizm w działaniu z TGF- β [20, 21, 29, 69], a także powodują u mysich noworodków przedwczesne otwieranie oczu [116]. TGF- α i EGF wykazują ponadto aktywność angiogenną [117] oraz stymulują resorpcję kości [118, 119], lecz w obu przypadkach działanie TGF- α jest bardziej efektywne niż EGF. Przyczyny tej różnicy nie są znane pomimo iż wysuwa się wiele prawdopodobnych hipotez [117, 119]. Aktywność stymulującą resorpcję kości wykazują także TGF- β [120], PDGF i EGF co sugeruje, że w normalnych warunkach fizjologicznych czynniki wzrostowe mogą być regulatorami metabolizmu kości. Czynniki te wytwarzane przez komórki nowotworowe mogą być przyczyną patologicznej resorpcji kości oraz hyperkalcemii towarzyszącej niektórym chorobom nowotworowym [121].

W doświadczeniach *in vitro* wykazano ponadto, że TGF- β wpływa na metabolizm komórkowy poprzez stymulację glikolizy oraz transportu aminokwasów do komórek [122], a także, przy współdziałaniu EGF lub PDGF, stymuluje pobieranie glukozy przez komórki [123]. Stwierdzono, że w leczeniu ran eksperymentalnych u szczurów [61] TGF- β stymulował syntezę białka całkowitego, kolagenu i DNA. Obecność TGF- β w płytkach krwi [67] przemawia za tym, że ten czynnik może grać istotną rolę w leczeniu ran i naprawie uszkodzeń tkankowych, podobnie jak to się sugeruje w przypadku PDGF [124]. Przypuszcza się, że wytwarzanie przez komórki TGF- α i TGF- β może odgrywać ważną rolę w reumatoidalnym zapaleniu stawów [125] oraz innych chorobach, w których dochodzi do nadmiernego rozplemu komórek.

Biorąc pod uwagę fakt ogromnej konserwatywności struktury TGF- β (ludzki i mysi TGF- β różnią się tylko 1 aminokwasem) oraz jego występowanie we wszystkich komórkach i tkankach dotąd badanych [11, 18, 65, 68, 70, 75] wydaje się, że rola fizjologiczna tego peptydu jest bardzo ważna (lecz dotąd nie w pełni znana). Jest prawdopodobne, że TGF- β przy współdziałaniu innych endogennych stymulatorów (czynniki wzrostowe) lub inhibitorów proliferacji (interferony) może *in vivo* doskonale regulować proliferację i różnicowanie komórek.

Zaakceptowano do druku 27 lutego 1987 r.

Piśmiennictwo

1. Inglot A. D., (1984), *Post. Biochem.*, **30**, 5—7.
2. Farbiszewski R., (1984), *Post. Biochem.*, **30**, 9—13.
3. Farbiszewski R., Gabryel H., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, 71—87.

4. Todaro G. J., DeLarco J. E., Cohen S., (1976), *Nature*, **264**, 26—31.
5. Dulak N. C., Temin H. M., (1973), *J. Cell. Physiol.*, **81**, 153—160.
6. Todaro G. J., DeLarco J. E., Fryling C., Johnson P. A., Sporn M. B., (1981), *J. Supramol. Struct.*, **15**, 287—301.
7. Todaro G. J., DeLarco J. E., Nissley S. P., Rechler M. M., (1977), *Nature*, **267**, 526—528.
8. Todaro G. J., DeLarco J. E., (1978), *Cancer Res.*, **38**, 4147—4154.
9. Todaro G. J., Fryling C., DeLarco J. E., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5258—5262.
10. DeLarco J. E., Todaro G. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4001—4005.
11. Roberts A. B., Anzano M. A., Lamb L. C., Smith J. M., Sporn M. B., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5339—5343.
12. Sporn M. B., Preston Y. A., Todaro G. J., (1980), *N. Engl. J. Med.*, **303**, 878—880.
13. DeLarco J. E., Todaro G. J., (1981), *J. Cell. Physiol.*, **109**, 267—277.
14. Kaplan P. L., Anderson M., Ozanne B., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 485—489.
15. Twardzik D. R., Todaro G. J., Marquardt H., Reynolds F. H., Stephenson J. R., (1982), *Science*, **216**, 894—897.
16. Rosenthal A., Lindquist P. B., Bringman T. S., Goeddel D. V., Derynck R., (1986), *Cell*, **46**, 301—309.
17. Noda M., Selinger Z., Scolnick E. M., Bassin R. H., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5602—5606.
18. Roberts A. B., Frolik C. A., Anzano M. A., Sporn M. B., (1983), *Federation Proc.*, **42**, 2621—2626.
19. DeLarco J. E., Todaro G. J., (1978), *J. Cell. Physiol.*, **94**, 335—342.
20. Anzano M. A., Roberts A. B., Meyers C. A., Komoriya A., Lamb L. C., Smith J. M., Sporn M. B., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 4776—4778.
21. Roberts A. B., Anzano M. A., Wakefield L. M., Roche N. S., Stern D. F., Sporn M. B., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 119—123.
22. Sporn M. B., Roberts A. B., (1985), *Nature*, **313**, 747—751.
23. Lawrence D. A., (1985), *Biol. Cell*, **53**, 93—98.
24. Ozanne B., Fulton R. J., Kaplan P. L., (1980), *J. Cell. Physiol.*, **105**, 163—180.
25. Nakamura H., Komatsu K., Akedo H., Hosokawa M., Shibata H., Masaoka T., (1983), *Cancer Lett.*, **21**, 133—139.
26. Morita H., Noda K., Umeda M., Ono T., (1984), *Gann*, **75**, 403—409.
27. DeLarco J. E., Reynolds R., Carlberg K., Engle C., Todaro G. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3685—3690.
28. Twardzik D. R., Todaro G. J., Reynolds F. H., Stephenson J. R., (1983), *Virology*, **124**, 201—207.
29. Massague J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 13606—13613.
30. Massague J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9756—9761.
31. Chua C. C., Geiman D., Ladda R. L., (1983), *J. Cell. Physiol.*, **117**, 116—122.
32. Hirai R., Yamaoka K., Mitsui H., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 5742—5746.
33. Kryceve-Martinerie C., Lawrence D. A., Crochet J., Jullien P., Vigier P., (1982), *J. Cell. Physiol.*, **113**, 365—372.
34. Moses H. L., Branum E. L., Proper J. A., Robinson R. A., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 2842—2848.

35. Tucker R. F., Volkenant M. E., Branum E. L., Moses H. L., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 1581—1586.
36. Marquardt H., Todaro G. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5220—5225.
37. Davoren P. R., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 150—153.
38. Richmond A., Lawson D. H., Nixon D. W., Stevens S., Chawla R. K., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 2106—2112.
39. Richmond A., Lawson D. H., Nixon D. W., Chawla R. K., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 6390—6394.
40. Sato M., Yoshida H., Hayashi Y., Miyakami K., Bando T., Yanagawa T., Yura Y., Azuma M., Veno A., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 6160—6167.
41. Coffey R., J., Shipley G. D., Moses H. L., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 1164—1169.
42. Salomon D. S., Zwiebel J. A., Bano M., Losonczy J., Fehnel P., Kidwell W. R., (1984), *Cancer Res.*, **44**, 4069—4077.
43. Uittenbogaart C. H., Fahey J. L., (1984), *Lymphokine Res.* **3**, 39—44.
44. van Zoelen E. J. J., Twardzik D. R., van Oostwaard T. M. J., van der Saag P. T., de Laat S. W., Todaro G. J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4085—4089.
45. Lawrence D. A., Pircher R., Kryceve-Martinerie C., Jullien P., (1984), *J. Cell. Physiol.*, **121**, 184—188.
46. Lawrence D. A., Pircher R., Jullien P., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**, 1026—1034.
47. Pircher R., Lawrence D. A., Jullien P., (1984), *Cancer Res.*, **44**, 5538—5543.
48. Kim M. K., Warren T. C., Kimball E. S., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9237—9243.
49. Childs C. B., Proper J. A., Tucker R. F., Moses H. L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5312—5316.
50. Noda K., Umeda M., Ono T., (1984), *Gann*, **75**, 109—112.
51. Zwiebel J. A., Bano M., Nexo E., Salomon D. S., Kidwell W. R., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 933—939.
52. Brown K. D., Blakeley D. M., (1983), *Biochem. J.*, **212**, 465—472.
53. Twardzik D. R., Ranchalis J. E., Todaro G. J., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 590—593.
54. Sherwin S. A., Twardzik D. R., Bohn W. H., Cockley K. D., Todaro G. J., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 403—407.
55. Kimball E. S., Bohn W. H., Cockley K. D., Warren T. C., Sherwin S. A., (1984), *Cancer Res.*, **44**, 3613—3619.
56. Twardzik D. R., Kimball E. S., Sherwin S. A., Ranchalis J. E., Todaro G. J., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 1934—1939.
57. Matrisian L. H., Pathak M., Magun B. E., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 761—769.
58. Halper J., Moses H. L., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 1972—1979.
59. Stromberg K., Pigott D. A., Ranchalis J. E., Twardzik D. R., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 354—361.
60. Frolik C. A., Dart L. L., Meyers C. A., Smith D. M., Sporn M. B., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3676—3680.
61. Sporn M. B., Roberts A. B., Shull J. H., Smith J. M., Ward J. M., Sodek J., (1983), *Science*, **219**, 1329—1331.
62. Nickell K. A., Halper J., Moses H. L., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 1966—1971.

63. Roberts A. B., Lamb L. C., Newton D. L., Sporn M. B., DeLarco J. E., Todaro G. J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3494—3498.
64. Popik W., (1986), Rozprawa doktorska, IITD PAN Wrocław.
65. Roberts A. B., Anzano M. A., Lamb L. C., Smith J. M., Frolik C. A., Marquardt H., Todaro G. J., Sporn M. B., (1982), *Nature*, **295**, 417—419.
66. Roberts A. B., Frolik C. A., Anzano M. A., Assoian R. K., Sporn M. B., (1984), w *Methods for preparation of media, supplements, and substrata for serum-free animal cell culture*, str. 181—194; Liss A. R. Inc., New York.
67. Assoian R. K., Komoriya A., Meyers C. A., Miller D. M., Sporn M. B., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7155—7160.
68. Roberts A. B., Anzano M. A., Meyers C. A., Wideman J., Blacker R., Pan E. Y.-C., Stein S., Lehrman S. R., Smith J. M., Lamb L. C., Sporn M. B., (1983), *Biochemistry*, **22**, 5692—5698.
69. Assoian R. K., Grotendorst G. R., Miller D. M., Sporn M. B., (1984), *Nature*, **309**, 804—806.
70. Massague J., Kelly B., Motolla C., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 4551—4554.
71. Derynck R., Roberts A. B., Winkler M. E., Chen E. Y., Goeddel D. V., (1984), *Cell*, **38**, 287—297.
72. Marquardt H., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Todaro G. J., (1984), *Science*, **223**, 1079—1082.
73. Tam J. P., Marquardt H., Rosberges D. F., Wong T. W., Todaro G. J., (1984), *Nature*, **309**, 376—378.
74. Lee D. C., Rose T. M., Webb N. R., Todaro G. J., (1985), *Nature*, **313**, 489—491.
75. Derynck R., Jarrett J. A., Chen E. Y., Eaton D. H., Bell J. R., Assoian R. K., Roberts A. B., Sporn N. B., (1985), *Nature*, **316**, 701—705.
76. Derynck R., Jarrett J. A., Chen E. Y., Goeddel D. V., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 4377—4379.
77. Rall L. B., Scott J., Bell I., Crawford R. J., Penschow J. D., Niall H. D., Coghlan J. P., (1985), *Nature*, **313**, 228—231.
78. Blomquist M. C., Hunt L. T., Barker W. C., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7363—7367.
79. Brown J. P., Twardzik D. R., Marquardt H., Todaro G. J., (1985), *Nature*, **313**, 491—492.
80. Reisner A. H., (1985), *Nature*, **313**, 801—803.
81. Stroobant P., Rice A. P., Gullick W. J., Cheng D. J., Kerr I. M., Waterfield M. D., (1985), *Cell*, **42**, 383—393.
82. Twardzik D. R., Brown J. P., Ranchalis J. E., Todaro G. J., Moss B., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5300—5304.
83. Mason A. J., Hayflick J. S., Ling N., Esch F., Ueno N., Ying S.-Y., Guillemin R., Niall H., Seeburg P. H., (1985), *Nature*, **318**, 659—663.
84. Shipley G. D., Tucker R. F., Moses H. L., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4147—4151.
85. Tucker R. F., Branum E. L., Shipley G. D., Ryan R. J., Moses H. L., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6757—6761.
86. James R., Bradshaw R. A., (1984), *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 259—292.
87. Carpenter G., Stoscheck C. M., Preston Y. A., DeLarco J. E., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5627—5630.

88. Nestor J. J., Newman S. R., DeLustro B., Todaro G. J., Schreiber A. B., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 226—232.
89. Ek B., Heldin C.-H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10486—10492.
90. van Obberghen E., Rossi B., Kowalski A., Gazzano H., Ponzio G., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 945—949.
91. Ullrich A., Bell J. R., Chen E. Y., Herrera R., Petruzzelli L. M., Dull T. J., Gray A., Coussens L., Liao Y.-C., Tsubokawa M., Mason A., Seeburg P., Grunfeld H., Rosen O. M., Ramachandran J., (1985), *Nature*, **313**, 756—761.
92. Massague J., Czech M. P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5028—5045.
93. Buhrow S. A., Cohen S., Staros J. V., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4019—4022.
94. Cohen S., Ushiro H., Stoscheck C., Chinkers M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1523—1531.
95. Cohen S., Fava R. A., Sawyer S. T., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6237—6241.
96. Soderquist A. M., Carpenter G., (1983), *Federation Proc.*, **42**, 2615—2620.
97. Pike L. J., Marquardt H., Todaro G. J., Gallis B., Casnellie J. E., Bornstein P., Krebs E. G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 14628—14631.
98. Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scrace G., Totty N., Stockwell P., Ullrich A., Schlessinger J., Waterfield M. D., (1984), *Nature*, **307**, 521—527.
99. Massague J., Like B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 2636—2645.
100. Massague J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7059—7066.
101. Frolik C. A., Wakefield L. M., Smith D. M., Sporn M. B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 10995—11000.
102. Tucker R. F., Shipley G. D., Moses H. L., Holley R. W., (1984), *Science*, **226**, 705—707.
103. Roberts A. B., Roche N. S., Sporn M. B., (1985), *Nature*, **315**, 237—239.
104. Assoian R. K., Frolik C., A., Roberts A. B., Miller D. M., Sporn M. B., (1984), *Cell*, **36**, 35—41.
105. Assoian R. K., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9613—9617.
106. Leof E. B., Proper J. A., Goustin A. S., Shipley G. D., DiCorleto P. E., Moses H. L., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2453—2457.
107. Heldin C.-H., Westermarck B., Wasteson A., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3664—3668.
108. Nakamura T., Tomita Y., Hirai R., Yamaoka K., Kaji K., Ichihara A., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**, 1042—1050.
109. Shipley G. D., Pittelkow M. R., Wille J. J., Scott R. E., Moses H. L., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 2068—2071.
110. Ristow H.-J., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5531—5533.
111. Inglot A. D., (1982), *Tex. Rep. Biol. Med.*, **41**, 402—410.
112. Inglot A. D., (1983), *Arch. Virol.*, **76**, 1—13.
113. Massague J., Czech M. P., Iwata K., DeLarco J. E., Todaro G. J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6822—6826.
114. Massague J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 13614—13620.
115. Nakhla A. M., Tam J. P., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 1180—1186.
116. Tam J. P., (1985), *Science*, **229**, 673—675.

117. Schreiber A. B., Winkler M. E., Derynck R., (1986), *Science*, **232**, 1250—1253.
118. Ibbotson K. J., Twardzik D. R., D'Souza S. M., Hargreaves W. R., Todaro G. J., Mundy G. R., (1985), *Science*, **228**, 1007—1009.
119. Ibbotson K. J., Harrod J., Gowen M., D'Souza S., Smith D. D., Winkler M. E., Derynck R., Mundy G. R., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2228—2232.
120. Tashjian A. H., Voelkel E. F., Lazzaro M., Singer F. R., Roberts A. B., Derynck R., Winkler M. E., Levine L., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4535—4538.
121. Mundy G. R., Ibbotson K. J., D'Souza S. M., Simpson E. L., Jacobs J. W., Martin T. J., (1984), *N. Engl. J. Med.*, **310**, 1718—1727.
122. Boerner P., Resnick R. J., Racker E., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1350—1353.
123. Inman W. H., Colowick S. P., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1346—1349.
124. Deuel T. F., Huang J. S., (1984), *J. Clin. Invest.*, **74**, 669—676.
125. Brinckerhoff C. E., (1983), *Arthritis Rheum.*, **26**, 1370—1379.

MAGDALENA KOSZ-VNENCHAK *, MARIA KAWECKA **,
DANUTA MAGIELSKA-ŻERO **

Produkty niektórych onkogenów a czynniki wzrostu komórkowego

Products of some oncogenes and cellular growth factors

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Produkty onkogenów
- III. Hipoteza autokrynej regulacji wzrostu komórkowego przez produkty onkogenów
- IV. Produkty onkogenów jako zmodyfikowane receptory czynników wzrostowych
- V. Rola produktów onkogenów w wewnątrzkomórkowym przeniesieniu sygnału mitogenicznego
- VI. Rola białka p53 w regulacji wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych

Contents:

- I. Introduction
- II. Oncogene products
- III. Hypothesis of the autocrine regulation of cellular growth by the oncogene products
- IV. Oncogene products as modified receptors for growth factors
- V. Role of the oncogene products in intracellular transduction of the mitogenic signal
- VI. Role of protein p53 in growth regulation of normal and malignant cells

Wykaz stosowanych skrótów: EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy, PDGF — płytkowy czynnik wzrostowy, SSV — wirus mięsaka małp, SV40 — wakuolizujący wirus małpi, Ab-MuLV — wirus białaczek myszy, szczep Abelsona.

* Dr, Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego, Uniwersytet Jagielloński, al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

** Mgr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego, Uniwersytet Jagielloński, al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

I. Wstęp

Próby wyjaśnienia molekularnych podstaw transformacji nowotworowej ułatwiło odkrycie onkogennych wirusów RNA [1—5]. Wykazano, że geny tych wirusów odpowiedzialne za transformację nowotworową (onkogeny) pochodzą z tych samych elementów genetycznych, które występują w genomie komórek kręgowców [6—9]. Dlatego, komórkowe geny homologiczne z onkogenami wirusowymi nazywa się najczęściej protoonkogenami. W latach 1983—1985 zostały opublikowane w piśmiennictwie polskim trzy artykuły omawiające obszernie między innymi: strukturę, klasyfikację i rolę biologiczną onkogenów wirusowych i protoonkogenów [10—12]. Badania wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych zbiegły się ostatnio w wielu wspólnych punktach dotyczących struktury i funkcji peptydowych czynników wzrostowych oraz białkowych produktów onkogenów. W niniejszym artykule omówiono współczesne hipotezy udziału produktów onkogenów w regulacji wzrostu komórkowego.

II. Produkty onkogenów

Dotychczas opisano ponad dwadzieścia różnych onkogenów wirusowych i protoonkogenów [11]. Większość z nich scharakteryzowano na podstawie badań specyficznych sekwencji nukleotydowych genów wirusowych oraz chemicznych i biologicznych właściwości białek kodowanych przez te onkogeny [13]. Wykryto ponadto w komórkach prawidłowych sekwencje DNA funkcjonujące jako onkogeny, ale nie odpowiadające strukturalnie żadnemu ze znanych onkogenów wirusowych (*met*, *neu*, gen białka p53) [14—17].

D. Baltimore' [18] wyróżnia cztery klasy onkogenów przyjmując jako kryterium strukturę i właściwości kodowanych przez nie polipeptów. Do klasy I zalicza te onkogeny, których produkty wykazują aktywność tyrozyno-swoistych kinaz białkowych (*src*, *yes*, *fps*, *fgr*, *ros*, *abl*, *erb-B*, *neu*, *fms*) oraz podobne do nich strukturalnie onkogeny *mos*, *raf*, *mil*, których produkty nie wykazują jednak aktywności kinazy tyrozynowej. Spośród wymienionych onkogenów, niektóre (*erb-B*, *fms*, *ros*, *neu*) zostały scharakteryzowane jako geny kodujące białka o własnościach receptorów peptydowych czynników wzrostowych [15, 19—22]. Do klasy II autor zalicza rodzinę onkogenów *ras*, których produkty wykazujące aktywność GTP-azową wykryto w wewnętrznej części błony komórkowej. Produkty tych onkogenów — białka p21 są strukturalnie podobne do podjednostki białek regulatorowych układu cykazy adenyla-

Udział produktów niektórych onkogenów w stymulacji mitogennej

Onkogen	Produkt onkogeny		Lokalizacja subkomórkowa	Rola w przekazaniu sygnału mitogennego	Piśmiennictwo
	wirusowego	komórkowego			
<i>sis</i>	p28	p28	wydzielany z cytoplazmy na zewnątrz komórki	Czynnik wzrostowy c-PDGF	30, 31
<i>erb-B</i>	p74	p170	błona komórkowa " " " " " " " "	Receptor czynnika wzrostowego	32, 33, 34 21 22, 35 14 15, 16
<i>fms</i>	p140	p170		receptor EGF	
<i>ros</i>	p68	?		receptor CSF-1	
<i>met</i>	?	?		receptor insuliny	
<i>neu</i>	?	p185		receptor insuliny? receptor peptydów EGF-podobnych	
<i>ras</i>	p21	p21	cytoplazmatyczna część błony komórkowej	Wewnątrzkomórkowe przeniesienie sygnału	36, 37 38 39 40, 41
<i>src</i>	p60	p60	" "	1. modulacja aktywności cyklicznej adenylicznej 2. aktywacja fosfolipazy C	
<i>abl</i>	p120	p150	" "	stymulacja obrotu fosfatydyloinozytoli ?	
<i>myc</i>	p110	p57	jądro komórkowe " " " "	Regulacja aktywności transkrypcyjnej	28, 42, 43, 44
<i>fos</i>	p55	p55		synteza białek pośredniczących w stymulacji syntezy DNA	
?	?	p53			

nowej tzw. białek G [23]. Klasa III obejmuje onkogeny jądrowe (*myc*, *fos*, *myb*, gen białka p53), których ekspresja prowadzi do syntezy białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego [24—28]. Klasa IV obejmuje onkogeny homologiczne z genami kodującymi czynniki wzrostowe. Produkty tych onkogenów mogą zastępować peptydy funkcjonujące w warunkach fizjologicznych jako naturalne regulatory wzrostu komórkowego. Jedynym dotychczas znanym przedstawicielem tej klasy jest onkogen *sis*, którego produkt — białko p28 jest strukturalnie i funkcjonalnie podobne do PDGF [29].

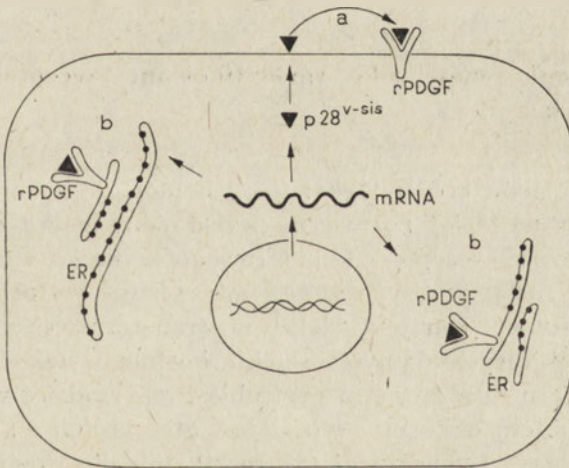
Klasyfikacja zaproponowana przez Baltimore'a, uzupełniona wynikami badań publikowanych w latach 1984—1986, pozwala ustalić udział produktów białkowych niektórych onkogenów w mitogenezie (Tab. 1). Przyjmuje się następujące możliwości wpływu produktów onkogenów na wzrost komórkowy:

- a) Produkt onkogeny może wykazywać aktywność czynnika wzrostowego (np. białko p28^{sis}) i regulować wzrost na drodze autokrynnej [45—47].
- b) Produkt onkogeny może być strukturalnie podobny do efektorowej części receptora czynnika wzrostowego. Tak zmodyfikowany receptor może wysyłać sygnały mitogenne nawet w nieobecności egzogenego czynnika wzrostowego. Białko gp 74^{erb-B}, a także białkowe produkty onkogenów *fms*, *ros*, *met* i *neu* są przykładem takiej możliwości deregulacji wzrostu [14—16, 19, 21, 33].
- c) Produkt onkogeny może modulować wewnątrzkomórkowy szlak przenoszenia sygnału mitogennego (bez udziału układu receptorowego komórki). Aktywność biologiczna białek kodowanych przez onkogeny *ras*, *src* i *abl* przemawia za taką możliwością [36—41].
- d) Niekontrolowana aktywacja onkogenów jądrowych normalnie pośredniczących w przekazywaniu sygnału mitogennego indukowanego przez czynniki wzrostowe może prowadzić do niepożądanego wzrostu poziomu ich produktów białkowych, a tym samym do nadmiernej stymulacji wzrostu komórkowego. Najlepiej dotychczas poznanym przykładem zależności wzrostu komórkowego od poziomu produktów onkogenów jądrowych jest białko p53 [17, 48].

Przedstawione możliwości wskazują, że produkty onkogenów mogą zaburzać wzrost komórkowy na różnych etapach przekazywania sygnału mitogennego, poczynając od zastępowania naturalnych czynników wzrostowych na modulacji aktywności transkrypcyjnej komórki kończąc. Onkogeny działając poprzez swoje produkty białkowe uniezależniają komórkę od naturalnych (egzogennych) czynników wzrostowych i pozbawiają ją możliwości zewnątrzkomórkowej kontroli procesu wzrostu.

III. Hipoteza autokrynej regulacji wzrostu komórkowego przez produkty onkogenów

Regulacja autokryjna jest jednym z możliwych sposobów uniezależnienia się komórek od obecności egzogenego czynnika wzrostowego. Terminem tym określamy zjawisko regulacji wzrostu przez czynnik produkowany przez tę samą komórkę, która może odpowiadać na jego obecność w środowisku dzięki jego oddziaływaniu z receptorem powierzchniowym [33]. Typowym przykładem autokrynych regulatorów wzrostu są polipeptydy określane mianem transformujących czynników wzrostowych (którym poświęcony jest odrębny artykuł). Częsteczki podobne do płytkowego czynnika wzrostowego zwane w skrócie PDGF-c (od angielskiego słowa "competitor" — współzawodnik, konkurent) produkowane w komórkach transformowanych przez wirus mięsaka małp są innym przykładem autokrynych regulatorów wzrostu [49, 50]. W celu poznania natury PDGF-c przeprowadzono szereg badań, które ujawniły podobieństwo strukturalne między czynnikami wzrostowymi a produktami onkogenów [20]. Okazało się, że struktura białka p-28^{v-sis} kodowanego przez wirus mięsaka małp jest podobna do struktury łańcucha B ludzkiego PDGF [51, 52]. Wirus mięsaka małp zawierający onkogen *v-sis* ma zdolność transformacji nowotworowej fibroblastów *in vitro*, a także indukuje włókniako-mięsaki i glejaki u małp [53, 54]. Gen *v-sis* koduje białko składające się z 226 reszt aminokwasowych, z których 109 jest homologicznych z łańcuchem B PDGF. Podobieństwo strukturalne mię-

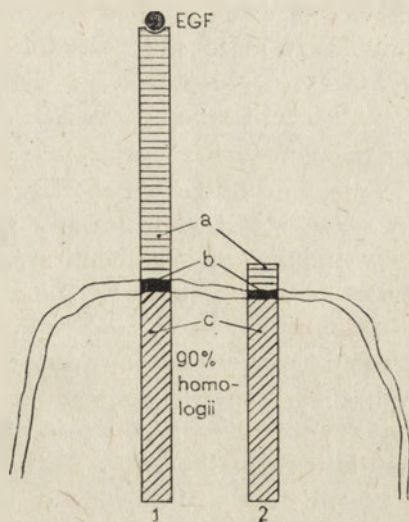


Ryc. 1. Hipotetyczne mechanizmy autokrynej stymulacji wzrostu po transformacji wirusem SSV. a) syntetyzowane w komórce białko p28^{v-sis} (trójkąt) jest wydzielane na zewnątrz i oddziałuje z receptorem PDGF (rPDGF) usytuowanym w błonie komórkowej. b) Białko p28^{v-sis} aktywuje nowosyntetyzowany w siateczce śródplazmatycznej (ER) receptor PDGF, zanim zostanie on wbudowany w błonę komórkową.

dzy tymi białkami rozpoczyna się przy 67 reszcie, którą stanowi seryna. Analiza sekwencji aminokwasowej produktu *v-sis* i produktu ludzkiego protoogenu *c-sis* wykazuje 93% homologii [20, 29]. Podobieństwo strukturalne sugeruje także zbliżoną aktywność biologiczną tych cząsteczek, przede wszystkim aktywność mitogenną [55]. Istotnie komórki linii fibroblastów mysich NIH 3T3 [45], komórki linii fibroblastów nerki szczurzej (NRK) [46] i fibroblasty ludzkie (HF) [47] transformowane SSV produkują białko PDGF-c, które działa na nie tak jak mitogen. W nowotworach ludzkich pochodzenia mezenchymalnego (glejako-mięsaki, mięsaki kostne i włókniako-mięsaki) wykazano obecność informacyjnych kwasów rybonukleinowych (mRNA_s) będących transkryptami genu *sis* [56]. Mitogenne polipeptydy PDGF-c stwierdzono zarówno w liżatach komórkowych [57] jak i płynach pochodzących [58] ludzkich komórek nowotworowych pochodzenia mezenchymalnego. Proponuje się dwie możliwości stymulacji wzrostu komórkowego przez białko p 28^{v-sis}: na drodze autokrynej oraz poprzez mechanizm wewnątrzkomórkowy (Ryc. 1). Znalaziono potwierdzenie eksperymentalne obu tych możliwości: Garrett i wsp. [46] wykazali stymulację autokrynną w komórkach NRK, a Huang i wsp. [59] w komórkach NIH 3T3 w obu przypadkach transformowanych SSV. Druga możliwość tłumaczy transformację w linii komórkowej NP1 poddanej działaniu SSV. Stymulacja wzrostu tych komórek jest wynikiem oddziaływania cząsteczek p 28^{v-sis} z nowo utworzonym receptorem PDGF, najprawdopodobniej w aparacie Golgiego lub w retikulum endoplazmatycznym [29, 55].

IV. Produkty onkogenów jako zmodyfikowane receptory czynników wzrostowych

Produkt onkogenu *erb B* wykazujący homologię z okrojonym receptorem EGF jest najlepiej poznanym przykładem białka odpowiadającego zmienionej formie receptora komórkowego czynnika wzrostowego [33]. Onkogen *erb B* został wykryty w genomie wirusa erytroblastozy ptasiej (AEV). *In vitro* wirus ten jest zdolny do transformacji zarówno niedojrzałych komórek erytroidalnych szpiku kostnego jak i fibroblastów. *In vivo* indukuje u kurcząt ostrą erytroblastozę, rzadziej włókniako-mięsaki [60]. Produktem onkogenu *erb B* jest glikoproteina gp 74^{erb B} złożona z krótkiej części zewnętrznej (65 reszt aminokwasowych), segmentu transbłonowego (21 reszt aminokwasowych) i części cytoplazmatycznej (513 reszt aminokwasowych) [19, 20]. Łańcuch polipeptydowy ludzkiego receptora EGF zbudowany z około 1200 aminokwasów składa się z części receptorowej (621 reszt aminokwasowych), transbłonowej (26 reszt aminokwasowych) i cytoplazmatycznej (542 reszty aminokwasowej) (Ryc. 2) [61].



Ryc. 2. Schemat budowy receptora EGF i białka gp 74^{erb B} 1 — receptor EGF a) część zewnątrzkomórkowa (621 reszt aminokwasowych), b) część transbłonowa (26 reszt aminokwasowych), c) część cytoplazmatyczna (542 reszty aminokwasowe), 2 — białko gp 74^{erb B} a) część zewnątrzkomórkowa (65 reszt aminokwasowych), b) część transbłonowa (21 reszt aminokwasowych), c) część cytoplazmatyczna (513 reszt aminokwasowych).

Białko transformujące gp 74^{erb B} nie ma obszaru wiążącego ligand, jest więc okrojone w stosunku do receptora EGF. Brak odcinka regulacyjnego (wiążącego EGF) sprawia, że produkt genu *erb B* może wykazywać stałą aktywność biologiczną związaną z obszarem cytoplazmatycznym [33], w którym występuje ściśle podobieństwo strukturalne pomiędzy gp 74^{erb B} a receptorem EGF. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że zgodność sekwencji obejmującej odcinek Leu 694—Phe 937 (obszar o aktywności tyrozyno-swoistej kinazy białkowej receptora EGF) dotyczy nie tylko białka będącego produktem *v-erb B*, ale także dziesięciu innych białek, produktów następujących onkogenów: *v-src*, *v-yes*, *v-fes*, *v-fps*, *v-fgr*, *v-abl*, *v-fms*, *v-mil*, *v-mos* i *v-raf* [32, 62—72]. Produkty pierwszych ośmiu onkogenów [73—79] przejawiają *in vitro* aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej, w przypadku ostatnich trzech takiej aktywności nie wykryto [69, 72, 73]. Ze względu na duże znaczenie tyrozyno-swoistej kinazy białkowej w regulacji wzrostu komórkowego wielu badaczy zajęło się problemem modulacji jej aktywności [80]. Nadal jednak nie ma odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób tyrozyno-swoista kinaza białkowa przekazuje sygnał do rozpoczęcia syntezy DNA w kierunku jądra komórkowego. W czasie badań dotyczących receptora EGF ujawniono, że Thr 654 leżąca w obrębie obszaru o aktywności tyrozyno-swoistej kinazy białkowej jest równocześnie substratem kinazy C [81, 82]. Thr 654 jest oddalona o 9 reszt aminokwasowych od obszaru

transbłonowego w części cytoplazmatycznej receptora EGF. Takie umiejscowienie treoniny sprawia, że może ona pośredniczyć w modulacji sygnału przenieszonego przez część receptorową i wskazuje na regulacyjne oddziaływanie między kinazą C i receptorem EGF.

Kolejny przykład podobieństwa strukturalnego produktu onkogeny i zmodyfikowanego receptora czynnika wzrostowego to p 185 — produkt onkogeny *neu*. Onkogen *neu* został wyizolowany ze szczurzych nerwiaków i glejako-mięsaków indukowanych chemicznie. Wykazana homologia onkogenów *erb B* i *neu* oraz receptora EGF i białka p 185 występuje w obszarze odpowiedzialnym za aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej [15, 16]. Produkt onkogeny *fms* jest natomiast nieznacznie zmienionym receptorem makrofagowego czynnika wzrostowego (CSF-1 = MGF). Makrofagowy czynnik wzrostowy jest glikoproteina o aktywności tyrozyno-swoistej kinazy białkowej. Analiza sekwencji nukleotydowej pozwoliła na ujawnienie strukturalnego podobieństwa obszaru cytoplazmatycznego glikoproteiny kodowanej przez onkogen *v-fms* i tyrozyno-swoistej kinazy białkowej. Przeprowadzone badania potwierdziły tę aktywność [21].

Produkt onkogen *v-ros*: polipeptyd p68 jest homologiczny z obszarem tyrozyno-swoistej kinazy białkowej receptora insuliny. Onkogen *v-ros* jest częścią genomu wirusa mięsaka ptasiego UR 2 [22]. Także onkogen *met* wykazujący podobieństwo do onkogenów kodujących tyrozyno-swoiste kinazy białkowe jest w swoim składzie nukleotydowym zbliżony do obszaru kodującego tyrozyno-swoistą kinazę białkową receptora insuliny. Onkogen ten został wyizolowany z transformowanych chemicznie linii komórek ludzkich MNNG-HOS, ale do chwili obecnej nie wykryto jego produktu białkowego [14]. Podane powyżej przykłady onkogenów *erb B*, *fms*, *neu*, *met* i *ros* potwierdzają możliwość kodowania przez niektóre z nich receptorów lub efektorowych części receptorów czynników wzrostowych o aktywności tyrozyno-swoistej kinazy białkowej.

V. Rola produktów onkogenów w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnału mitogennego

Sygnał mitogeny jest przenoszony od receptora czynnika wzrostowego do jądra komórkowego poprzez wiele wzajemnie się uzupełniających reakcji biochemicznych, między innymi przez reakcje fosforylacji białek i lipidów (omówione w artykule A. Kleina). Przyjmuje się obecnie, że produkty niektórych onkogenów o aktywności kinaz białkowych (*ras*, *src*, *abl*) mogą pośredniczyć w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnału.

Rodzina genów *ras* obejmuje onkogeny *H-ras*, *K-ras* i *N-ras*. Protoonkogeny *H-ras* i *K-ras* są komórkowymi homologami onkogenów występujących w genomach wirusów mięsaka myszy, szczepów Harvey'a i Kirstena [83—85]. Nie znaleziono dotychczas wirusowego odpowiednika protoonkogeny *N-ras*. Produkty rodziny genów *ras* są białkami zbudowanymi z 188 lub 189 reszt aminokwasowych określanymi symbolem p21 [86]. Białka te wykazują aktywność GTP-azy i ograniczoną homologię sekwencji aminokwasowej z podjednostką β białek regulatorowych cyklazy adenylanowej (białek G) [23, 87]. Konsekwencją działania PDGF jest między innymi wzmószona ekspresja protoonkogenów rodziny *ras* [88]. Działanie EGF i insuliny stymuluje wiązanie GTP przez białko p21 [89, 90]. Wykazano, że białko p21 moduluje aktywność cyklazy adenylanowej drożdży i ssaków [91, 92]. Na tej podstawie przyjmuje się, że przyłączenie czynnika wzrostowego do receptora błonowego powoduje przekształcenie nieaktywnej postaci białek G w formę aktywną (wiązącą GTP), które moduluje aktywność cyklazy adenylanowej, a ta z kolei aktywuje kinazy białkowe zależne od cAMP [93]. Podobieństwo strukturalne i funkcjonalne białek p21 do podjednostki β sugeruje także udział produktów onkogenów *ras* w regulacji aktywności fosfolipazy C, a tym samym w stymulacji metabolizmu fosfatydyloinozytoli [38].

Przypuszczalnie, także produkty dwóch innych onkogenów: *src* i *abl* moduluje wewnątrzkomórkowe przeniesienie sygnału mitogennego. W roku 1984 Sugimoto i wsp. [39] wykazali, że białko p60^{src} stymuluje fosforylację fosfatydyloinozytoli do fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu. Reakcja ta jest jedną z reakcji przemian fosfatydyloinozytoli prowadzących do generowania tzw. drugich przekaźników sygnału mitogennego — 1,2-diacylglicerolu i 1,4,5-trifosfoinozytoli.

Nie ma dowodów bezpośrednich na to, że produkt onkogeny *abl* pośredniczy w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnału. Wyniki doświadczeń Cooka i wsp. [40] oraz Pierce'a i wsp. [41] wskazują jednak, że transformacja komórek mieloidalnych i mastocytów wirusem Ab-MuLV nie powoduje ani syntezy autokrynych czynników wzrostowych ani peptydów o charakterze receptorów czynników wzrostowych. Nie udało się dotąd ustalić, na którym etapie wewnątrzkomórkowego przekazu sygnału może działać produkt onkogeny *abl*.

VI. Rola białka p53 w regulacji wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych

Białko p53 jest fosfoproteiną o masie cząsteczkowej 53 kDa, u myszy kodowaną przez obecny w chromosomie 11 fragment DNA o długości 16000 zasad. Prawdopodobnie dodatnio naładowany fragment C-końcowy jest odpowiedzialny za wiązanie cząsteczki białka p53 do DNA ko-

mórki. [17] Białko p53 funkcjonalnie jest podobne do produktu onkogenu *myc*. Oba te białka gromadzą się w jądrach komórek transformowanych, a ich poziom ulega zmianie w czasie trwania cyklu komórkowego [94]. W 1984 roku gen kodujący białko p53 został zaliczony do grupy onkogenów komórkowych [18].

Zwiększone stężenie białka p53, zwanego także komórkowym antygenem nowotworowym [95], stwierdzono w niektórych komórkach transformowanych wirusem SV 40, wirusem Abelsona, adenowirusem, transformowanych chemicznie lub pod wpływem promieniowania X. Białko to w ilości zaledwie kilkuset cząsteczek występuje w komórkach nie-transformowanych i embrjonalnych [96]. W komórkach prawidłowych białko p53 jest bezpośrednio zaangażowane w regulację wzrostu komórki. Badania ustalonej linii komórkowej fibroblastów mysich NIH 3T3 wykazały, że w 6—7 godzin od dodania 15% płodowej surowicy cielęcej do hodowli spoczynkowej, następuje znaczny, bo 10—20-krotny wzrost zawartości mRNA białka p53 [95]. Wzrost ilości mRNA-p53 jest prawdopodobnie odpowiedzialny za wzrost stężenia białka p53, gdyż czas półtrwania tego białka w komórce pozostaje niezmienny. Czas wzmożonej ekspresji genu p53 może więc być związany z czasem funkcjonalnej aktywności tego białka. Mikroinjekcja do jądra komórkowego monospecyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko białku p53, tuż przed rozpoczęciem stymulacji surowicą, znacznie obniżyła ilość komórek rozpoczynających syntezę DNA [96]. Zatem wzrost ekspresji genu p53 wywołany surowicą, wydaje się być konieczny dla replikacji DNA i przejścia komórki z fazy spoczynku do fazy wzrostu. Fakt ten, wskazuje na ważną naturalną rolę białka p53 w regulacji cyklu komórkowego.

Cykl komórkowy komórki prawidłowej może zostać zaburzony przez wprowadzenie do niej cząstki retrowirusa, co na ogół powoduje liczne przekształcenia, w wyniku których komórka staje się komórką nowotworową. „Hipoteza dawki” tłumaczyła to zjawisko następująco [6]. Wirus zmusza komórkę do nadprodukcji białek, które normalnie są produkowane w ilościach pozostających pod kontrolą genomu komórki prawidłowej. Nadprodukcję białek wywołaną działaniem wirusa uważano za odpowiedzialną za proces nowotworzenia. Ilustracją „hipotezy dawki” miało być funkcjonowanie białka p53. Białko to tworzy trwały kompleks — o niekowalencyjnym wiązaniu — z dużym antygenem T wirusa SV 40 w komórkach transformowanych tym wirusem [97]. Stwierdzono również, że tworzy ono kompleks z białkiem E1b 58k adenowirusa [98]. Oba te białka biorą udział w procesie transformacji nowotworowej. Białko p53 po związaniu z dużym antygenem T wirusa SV 40, staje się bardziej stabilne, czego dowodem jest wzrost czasu półtrwania tego białka z 25 minut do 24 godzin. W ten sposób zwiększa się efektywne stężenie białka p53 w komórce, co powoduje wzrost syntezy DNA i w konsekwencji prowadzi do nieograniczonych podziałów komórko-

wych. Zmiany w stężeniu białka p53, mogą być odpowiedzialne za zmieniiony wzrost komórek ludzkich, mysich i szczurzych. Jednoczesne wprowadzenie sklonowanego mysiego genu p53 i onkogenu *ras* spowodowało transformację nowotworową linii komórkowej fibroblastów szczurzych Rat-1, linii embrionalnych fibroblastów chomika chińskiego oraz pierwotnych embrionów szczurzych. Procesowi transformacji nowotworowej towarzyszyła nadprodukcja białka p53 [99, 100]. Badania chondrocytów wyrostka mieczykowatego dorosłych szczurów Wistar wskazują, że ekspresja genu kodującego białko p53 wpływa znacznie na przeżywalność komórek w hodowli *in vitro* [44]. Po 21 dniach hodowli komórki transfekowane plazmidem p4 JJKan zawierającym aktywny mysi gen p53, zwiększają ilość podwojeń i nabywają pewnych cech komórek nowotworowych. Innym przykładem, który wskazuje, że białko p53 wydaje się działać jako czynnik umożliwiający wzrost nowotworowy *in vivo*, są doświadczenia z linią komórkową L 12, transformowaną wirusem Abelsona, w której zablokowano ekspresję genu p53 przez wprowadzenie do jego pierwszego intronu prowirusa białaczki Moloneya [48]. Transformowane komórki linii L 12 rosną w hodowli stale, ale po wszczepieniu zwierzętom syngenicznym nie wywołują wzrostu letalnych nowotworów. Natomiast po wprowadzeniu funkcjonalnego genu p53, komórki linii L 12 są zdolne do ekspresji tego genu, a podane zwierzętom powodują progresywny wzrost nowotworów.

Przykład białka p53 wskazuje jak istotny dla prawidłowego wzrostu komórkowego jest właściwy poziom produktów onkogenów jądrowych. Wzrost ilości tych białek wynikający zarówno ze stymulacji ekspresji onkogenów jądrowych jak i z przedłużenia czasu półtrwania ich produktów może stanowić ważne ogniwo w procesach transformacji nowotworowej.

Opracowanie wykonane w ramach tematu finansowanego z Centralnego Programu Badań Podstawowych (CPBP) 06.01.

Zaakceptowano do druku 27 lutego 1987 r.

PIŚMIENNICTWO:

1. Rous P., (1910), *J. Exp. Med.*, **12**, 698—705.
2. Rous P., (1911), *J. Exp. Med.*, **13**, 397—411.
3. Hanafusa H., Takeya T., (1983), *Nucleic Acid Res.*, **11**, 359—375.
4. Temin H. M., (1982), *J. of Cellular Biochem.*, **19**, 105—118.
5. Emerman M., Panganiban A. T., Temin H. M., (1985), *Prog. Med. Virol.*, **32**, 174—188.
6. Bishop J. M., (1982), *Sci. Amer.*, **246**, 81—92.
7. Aaronson S. A., Tronick S. R., Robbins K. C., (1985) w *Control of Animal Cell Proliferation*, red. Boynton A. L., Leffert H. L., t. 1, str. 3—23. Academic Press Inc.
8. Cooper G. M., (1982), *Science*, **218**, 801—806.

9. Gordon H., (1985), *Mayo Clin. Proc.*, **60**, 697—713.
10. Chorąży M., Szala S., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 261—298.
11. Rupniewska Z. M., (1985), *Post. Biol. Kom.* **12**, 99—120.
12. Jakóbisiak M., (1985), *Post. Biol. Kom.* **12**, 289—334.
13. Joklik W. K. (red.), (1985), *Virology*, Appleton—Century—Crofts (Norwalk, Connecticut) 129—158.
14. Dean M., Park M., Le Beau M. M., Robins T. S., Diaz M. O., Rowley J. D., Blair D. G., van De Woude G. F., (1985), *Nature*, **318**, 385—388.
15. Bargmann C. I., Hung M-C., Weinberg R. R., (1986), *Nature*, **319**, 226—230.
16. Schechter A. L., Stern D. F., Vaidyanathan L., Decker S. J., Drebin J. A., Green M. I., Weinberg R. A., (1984), *Nature*, **312**, 513—516.
17. Oren M., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **823**, 67—78.
18. Givol D., (1985), *BioEssays*, **2**, 127—131.
19. Hayman M. J., Beug H., (1984), *Nature*, **309**, 460—462.
20. Waterfield M. D., (1985), w *Viruses, Oncogenes and Cancer*, Progress in Medical Virology, red. Melnick J. L., t. 32, str. 129—141, S. Karger A G. Basel.
21. Sherr C. J., Rettenmier C. W., Sacca R., Roussel M. F., Look A. T., Stanley E. R., (1985), *Cell*, **41**, 665—676.
22. Neckameyer W. S., Shibuya M., Hsu M-T., Wang L-H., (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1478—1486.
23. Hurley J. B., Simon M. I., Teplow D. B., Robishaw J. D., Gilman A. G., (1984), *Science*, **226**, 860—862.
24. Alitalo K., Ramsay G., Bishop J. M., Ohlsson P. S., Colby W. W., Levinson A. D., (1983), *Nature*, **306**, 274—277.
25. Colby W. W., Chen E. Y., Smith D. H., Levinson A. D., (1983), *Nature*, **301**, 722—725.
26. Curran T., (1984), *Nature*, **312**, 716—720.
27. Klempnaller K. H., Symonds G., Evan G. I., Bishop J. M., (1984), *Cell*, **537**—547.
28. Kingston R. E., Baldwin A. S., Sharp P. A., (1985), *Cell*, **41**, 3—5.
29. Deuel T. F., Huang J. S., (1984), *Blood*, **64**, 951—958.
30. Devare S. G., Reddy E. P., Law J. D., Aaronson S. A., (1983), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 731—735.
31. Robbins K. C., Antoniades H. N., Devare S. G., Hunkapiller M. W., Aaronson S. A., (1983), *Nature*, **305**, 605—608.
32. Yamamoto T., Nishida T., Miyajima N., Kawai S., Ooi T., Toyoshima K., (1983), *Cell*, **35**, 71—78.
33. Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scrace G., Totty N., Stockwell P., Ullrich A., Schlessinger J., Waterfield M. D., (1984), *Nature*, **307**, 5121—527.
34. Hayman M. J., Ramsay G. M., Savin K., Kitchener G., Graf T., Beug H., (1983), *Cell*, **32**, 579—588.
35. Feldman R. A., Wang L. H., Hanafusa H., Balduzzi P. C., (1982), *J. Virol.* **42**, 228—236.
36. McGrath J. P., Capon D. J., Goeddel D. V., Levinson A. D., (1984), *Nature*, **310**, 644—649.
37. Gibbs J. B., Sigal I. S., Poe M., Scolnick E. M., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5704—5708.
38. Bradshaw T. K., (1986), *Mutagenesis*, **1**, 91—97.

39. Sugimoto Y., Whitman M., Cantley L., Erikson R. L., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2117—2121.
40. Cook W. D., Metcalf D., Nicola N. A., Burgess A. W., Walker F., (1985), *Cell*, **41**, 677—683.
41. Pierce J. H., DiFiore P. P., Aaronson S. A., Potter M., Pumphrey J., Scott A., Ihle J. M., (1985), *Cell*, **41**, 685—693.
42. Curran T., Miller A. D., Zokas L., Verma I. M., (1984), *Cell*, **36**, 259—268.
43. Curran T., Bravo R., Müller R., (1985), *Cancer Surveys*, **4**, 654—681.
44. Jenkins J. R., Rudge K., Currie G. A., (1984), *Nature*, **312**, 651—653.
45. Deuel T. F., Huang J. S., Huang S. S., Stroobant P., Waterfield M. D., (1983), *Science*, **221**, 1348—1350.
46. Garrett J. S., Coughlin S. R., Niman H. L., Tremble P. M., Giels G. M., Williams L. T., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7466—7470.
47. Leal F., Williams L. T., Robbins K. C., Aaronson S. A., (1985), *Science*, **230**, 327—330.
48. Lane D. P., (1984), *Nature*, **312**, 596—597.
49. Bowen-Pope D. G., Vogel A., Ross R., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2396—2400.
50. Kazlauskas A., DiCorleto P. E., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **846**, 405—412.
51. Doolittle R. F., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Devare S. G., Robbins K. C., Aaronson S. A., Antoniades H. N., (1983), *Science* **221**, 275—277.
52. Waterfield M. D., Scrace G. T., Whittle N., Stroobant P., Johnsson H., Wasteson A., Westermark B., Heldin C-H., Huang J. S., Deuel T. F., (1983), *Nature*, **304**, 35—39.
53. Wolfe L. G., Deinhardt F., Theilen G. J., Rabin H., Kawakami T., Bustad L. K., (1971), *JNCI*, **47**, 1115—1120.
54. Wolfe L. G., Smith R. K., Deinhardt F., (1972), *JNCI*, **48**, 1905—1907.
55. Deuel T. F., Tong B. D., Huang J. S., (1985), w *Modulation by Molecular Interactions, Current Topics in Cellular Regulation*, red. Levine R. L., Ginsburg A., t. 26, str. 51—64, Academic Press, Orlando.
56. Eva A., Robbins K. C., Andersen P. R., Srinivasan A., Tronick S. R., Reddy E. P., Ellmore N. W., Gallen A. T., Lautenberger J. A., Papas T. S., Westin E. H., Wong-Staal F., Gallo R., Aaronson S. A., (1982), *Nature*, **295**, 116—119.
57. Pantazis P., Palicci P. G., Dalla-Favera R., Antoniades H. N., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2404—2408.
58. Nister M., Heldin C-H., Wasteson A., Westermark B., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 926—930.
59. Huang J. S., Huang S. S., Deuel T. F., (1984), *Cell*, **39**, 79—87.
60. Graf T., Beug H., (1983), *Cell*, **34** 7—9.
61. Hunter T., (1984), *Nature*, **311**, 414—416.
62. Schwartz D. E., Tizard R., Gilbert W., (1983), *Cell*, **32**, 853—869.
63. Kitamura N., Kitamura A., Toyoshima K., Hiragama Y., Yoshida M., (1982), *Nature*, **297**, 205—208.
64. Hampe A., Laprevotte I., Galibert F., Fedele L. A., Sherr C. J., (1982), *Cell*, **30**, 775—785.
65. Shibuya M., Hanafusa H., (1982), *Cell*, **30**, 787—795.

66. Naharro G., Dunn C. Y., Robbins K. C., Reddy E. P., (1984), *Science*, **223**, 63—66.
67. Reddy E. P., Smith M. J., Srinivasan A., (1983), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 3623—3627.
68. Hampe A., Gobert M., Sherr C. J., Galibert F., (1984), *Proc. Natl. Sci. USA*, **81**, 85—89.
69. Sutrave P., Bonner T. I., Rapp U. R., Jansen H. W., Patschinsky T., Bister K., (1984), *Nature* **309**, 85—88.
70. Van Beveren C., van Straaten F., Galleshaw J. A., Verma I. M., (1981), *Cell*, **27**, 97—108.
71. Van Beveren C., Galleshaw J. A., Jonas V., Berns A. J. M., Doolittle R. F., Donoghue D. J., Verma I. M., (1981), *Nature*, **289**, 258—262.
72. Mark G. E., Rapp U. R., (1984), *Science*, **224**, 285—289.
73. Bishop J. M., (1983), *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 301—354
74. Naharro G., Dunn C. Y., Robbins K. C., (1983), *Virology*, **125**, 502—507.
75. Roussel M. F., Rettenmier C. W., Look A. T., Sherr C. J., (1984), *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1999—2009.
76. Glimore T., De Clue J. E., Martin G. S., (1985), *Cell*, **40**, 609—618.
77. Decker S. J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 2003—2007.
78. Kris R. M., Lax I., Gullick W., Waterfield M. D., Ullrich A., Fridkin M., Schlessinger J., (1985), *Cell*, **40**, 619—625.
79. Heimann B., Beimling P., Pfaff E., Schaller H., Moelling K., (1985), *Exp. Cell. Res.*, **161**, 199—208.
80. Foukles J. G., Rosner M. R., (1985), w Molecular Mechanisms of Transmembrane Signalling, Molecular Aspects of Cellular Regulation, red. Cohen P., Houslay M. D., t. 4, str. 217—252, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
81. Hunter T., Ling N., Cooper J. A., (1984), *Nature*, **311**, 480—483.
82. Davis R. J., Czech M. P., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1974—1978.
83. Der K. C., Krontiris T., Cooper G., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3637—3640.
84. Parada L. F., Tabin C. J., Shih C., Weinberg R. A., (1982), *Nature*, **297**, 474—478.
85. Santos E., Tronick S. R., Aaronson S. A., Pulciani S., Barbacid M., (1982), *Nature*, **289**, 343—347.
86. Shih T. Y., Weeks M. D., Young H. O., Scolnick E. M., (1979), *Virology*, **96**, 64—79.
87. Scolnick E. M., Papageorge A. G., Shih T. Y., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5355—5359.
88. Campisi J., Gray H. E., Pardee A. B., Dean M., Sonenhein G. E., (1984), *Cell*, **36**, 241—247.
89. Gilman A. G., (1984), *Cell*, **36**, 577—579.
90. Kamata T., Feramisco J. R., (1984), *Nature*, **310**, 147—150.
91. Toda T., Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T., Broek D., Cameron S., Broach J., Matsumoto K., Wigler M., (1985), *Cell*, **40**, 27—36.
92. Kataoka T., Powers S., Cameron S., Fasano O., Goldfarb M., Broach, Wigler M., (1985), *Cell*, **40**, 19—26.
93. Spandidos D. A., (1985), *Anticancer Res.*, **5**, 485—498.
94. Donner R., Greiser-Wilke J., Moelling K., (1982), *Nature*, **296**, 262—266.

95. Reich N. C., Levine A. J., (1984), *Nature*, 308, 199—201.
96. Mercer W. E., Nelson D., DeLeo A. B., Old L. J., Baserga R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6309—6312.
97. Lane D. P., Crawford L. V., (1979), *Nature*, 278, 261.
98. Sarnow P., Ho Y. S., Williams J., Levine A. J., (1982), *Cell*, 28, 387.
99. Parada L. F., Land H., Weinberg R. A., Wolf D., Rotter V., (1984), *Nature*, 312, 649—651.
100. Eliyahu D., Raz A., Gruss P., Givol D., Oren M., (1984), *Nature*, 312, 646—649.

Z HISTORII BIOCHEMII

ANDRZEJ KLEIN *

Nobel 1986 w dziedzinie medycyny

Nobel Prize for Medicine 1986

Pół roku po złożeniu w Redakcji Postępów Biochemii serii artykułów o peptydowych czynnikach wzrostowych opublikowano wiadomość o przyznaniu nagrody Nobla w naukach fizjologiczno-medycznych pionierom badań tej grupy peptydów. Laureatami nagrody Nobla w roku 1986 zostali: 75-letnia Rita Levi-Montalcini (profesor w Narodowej Radzie Badań Naukowych w Rzymie) i 63-letni Stanley Cohen (profesor w Uniwersytecie Vanderbilta w Nashville). Levi-Montalcini i Cohen spotkali się po raz pierwszy w roku 1953 w laboratorium kierowanym przez Viktora Hamburgera w Uniwersytecie Washingtona. Próbowali wspólnie określić charakter chemiczny czynnika odkrytego przez Levi-Montalcini i Hamburgera, obecnego w ekstraktach komórek nowotworowych mysiego mięsaka 180. Czynnikiem ten wykazywał aktywność stymulacji wzrostu neuronów i nazwany został później czynnikiem wzrostu komórek nerwowych (NGF). Początkowo podejrzewano, że czynnik aktywujący wzrost komórek nerwowych jest związkiem o charakterze polinukleotydu. Za poradą Artura Kornberga, Levi-Montalcini i Cohen użyli do trawienia ekstraktów komórkowych jadu węża (*Agkistrodon piscivorus*), jako bogatego źródła fosfodiesterazy. Niespodziewanie, preparaty traktowane jadem, zamiast obniżonej, wykazywały wyraźnie zwiększoną aktywność NGF. Doświadczenia kontrolne dowiodły, że jad węża zawiera związek lub związki o aktywności NGF. Sformułowano hipotezę, że gruczoł śliniankowy ssaków może być dostępniejszym i bezpieczniejszym w użyciu źródłem NGF. W roku 1960 Stanley Cohen wyizolował z ślinianki podszczękowej myszy czysty polipeptyd o aktywności NGF. Tym razem szczęście dopisało autorom hipotezy. Spośród wszystkich dotychczas przebadanych ssaków jedynie gruczoł śliniankowy myszy i afrykańskiego gryzonia (*Praomys natalensis*) zawierają istotne, przydatne dla celów preparatywnych ilości NGF. Podczas oczyszczania NGF, którego aktywność biologiczną sprawdzano *in vivo* na noworodkach mysich, Cohen zauważył, że jedna z frakcji (niewykazująca aktywności NGF)

* Doc. dr hab., Instytut Biologii Molekularnej UJ
31-120 Kraków, al. Mickiewicza 3

powoduje o 5 dni wcześniejsze otwieranie oczu młodych myszy. Szczegółowa analiza jakościowa tej frakcji doprowadziła do wyizolowania przez Cohena w roku 1962 peptydu, który dla podkreślenia jego aktywności *in vitro*, nazwany został czynnikiem wzrostu komórek naskórka (EGF).

W dalszych badaniach czynników wzrostu syntetyzowanych w gruczole śliniankowym myszy nastąpiło wyraźne zróżnicowanie zainteresowań i celów badawczych późniejszych laureatów nagrody Nobla.

Rita Levi-Montalcini zajęła się w latach 60-tych i 70-tych badaniem właściwości i funkcji NGF. Kierowana przez nią grupa naukowców ustaliła, że NGF jest czynnikiem stymulującym wiele procesów anabolicznych w czuciowych i sympatycznych komórkach nerwowych. Levi-Montalcini i współpracownicy wykazali, że NGF stymuluje między innymi syntezę swoistych dla komórek nerwowych enzymów: β -hydroksylazy dopaminy i hydroksylazy tyrozyny. Opisali oni także wpływ NGF na wydłużanie neurytu w hodowlach *in vitro*. Obserwacja ta stała się podstawą tradycyjnej dziś metody oznaczania aktywności biologicznej NGF. Badania Levi-Montalcini pozwoliły ustalić, że biosynteza NGF jest stymulowana przez androgeny. Tłumaczy to 10-krotnie wyższy poziom tego czynnika w śliniance podszczękowej samców w porównaniu z samicami myszy, aczkolwiek znaczenie fizjologiczne tej różnicy jest dotąd niewyjaśnione.

Stanley Cohen poświęcił się badaniom struktury i mechanizmu działania EGF. Doświadczenia prowadzone w jego laboratorium na początku lat 70-tych pozwoliły na ustalenie sekwencji aminokwasowej mysiego EGF oraz lokalizację trzech wewnątrzcząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych, charakterystyczną dla wszystkich peptydów EGF-podobnych. Prace Cohena stworzyły również podstawy dla zrozumienia mechanizmu działania peptydowych czynników wzrostowych. W roku 1976 Cohen i współpracownicy wykazali doświadczalnie internalizację kompleksów EGF-receptor, w roku 1978 — zdolność EGF do aktywacji komórkowych kinaz białkowych, a w 1980 — swoistość tych kinaz w fosforylacji reszt tyrozynowych. Wynikiem prac prowadzonych przez Cohena w latach 80-tych było odkrycie, że wewnątrzkomórkowa część receptora EGF wykazuje aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej i spełnia rolę układu efektorowego, stymulowanego przyłączeniem liganda do zewnątrzkomórkowej części receptora. Poznanie niezwykłych właściwości enzymatycznych układu receptorowego i jego roli w przekazywaniu sygnału mitogennego, zainicjowały nowy kierunek w badaniach molekularnych podstaw działania produktów onkogenów jako modulatorów stymulacji wzrostu.

Trudno przecenić wkład Levi-Montalcini i Cohena w rozwój badań nad regulacją wzrostu komórkowego. Odkrycie NGF i EGF zaowocowało w ostatnim dziesięcioleciu prawdziwą lawiną prac na temat czynników

wzrostowych. W roku 1985 opublikowano ponad 400 artykułów dotyczących jednego tylko czynnika wzrostowego — EGF. Rozwój badań tych czynników przyniósł rozwiązanie wielu problemów mających kluczowe znaczenie w rozumieniu mechanizmu działania innych też peptydów regulacyjnych (internalizacja kompleksów peptyd-receptor, rola fosfatydyloinozytoli w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału, regulacja autokrynnna i inne). Wyniki badań podstawowych tej grupy związków stwarzają również nadzieję na postęp w leczeniu schorzeń wynikających z zaburzenia prawidłowego wzrostu komórkowego.

Wyróżnienie Rity Levi-Montalcini i Stanleya Cohena nagrodą Nobla jest wyrazem uznania za przeszło 30-letnią pracę, której wyniki otworzyły nowe perspektywy w naukach biologicznych i medycznych.

OPRACOWANO NA PODSTAWIE:

1. R. A. Murphy, A. Y. Watson, J. A. Rhodes, "Biological sources of nerve growth factor", *Appl. Neurophysiol.*, **47**, 33—42, 1984.
2. H. Thoenen, S. Korsching, R. Heumann, A. Acheson, "Nerve growth factor", w: *Growth factors in biology and medicine*, Pitman, London 1985, str. 113—128.
3. D. K. Berg, "New neuronal growth factors", *Ann. Rev. Neurosci.*, **7**, 149—170, 1984.
4. C. M. Stoscheck, L. E. King J r., "Functional and structural characteristics of EGF and its receptor and their relationships to transforming proteins", *J. Cell. Biochem.*, **31**, 135—152, 1986.
5. J. K. Stavos, S. Cohen, M. W. Russo, "EGF-receptor: characterization of its protein kinase activity", w: *Molecular mechanisms of transmembrane signalling*, red. S. Cohen i K. Houslay, Elsevier Sci. Publi., 1985, str. 253—277.
6. G. Carpenter, J. G. Zendegui, "Epidermal growth factor, its receptor and related proteins", *Exp. Cell Res.*, **164**, 1—10, 1986.

ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK*, ALEKSANDRA S. KOŁODZIEJCZYK**

Muramylopeptydy i ich własności farmakologiczne

Muramylopeptides and their pharmacological properties

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Bakteryjna ściana komórkowa
- III. Muramyłodipeptyd — MDP
- IV. Zależność aktywności adiuwantowej muramylopeptydów od ich konstytucji
- V. Analogi i pochodne MDP
 - V-1. Muramylopeptydy znakowane radioizotopami i grupami fluoryzującymi
 - V-2. Muramylopeptydy osadzone na nośnikach
 - V-3. Lipofilowe pochodne muramylopeptydów
- VI. Aktywność farmakologiczna
 - VI-1. Stymulacja niespecyficznego odporności przeciwbakteryjnej
 - VI-2. Próby wyjaśnienia mechanizmu działania
 - VI-3. Aktywność przeciwwirusowa
 - VI-4. Aktywność przeciwnowotworowa
 - VI-5. Zastosowanie w szczepionkach
 - VI-6. Synergiczne oddziaływanie z innymi chemoterapeutykami
 - VI-7. Własności samnogeniczne
- VII. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Bacterial cell wall
- III. Muramyl dipeptide — MDP
- IV. Relationship between structure and adjuvant activity
- V. Analogs and derivatives of MDP
 - V-1. Muramyl peptides labeled with radioisotopes and fluorescent groups
 - V-2. Muramyl peptides conjugated to carriers
 - V-3. Lipophilic derivatives
- VI. Pharmacological activities
 - VI-1. Stimulation of nonspecific resistance to bacterial infection
 - VI-2. Attempts of explanation of the action mechanisms

* doc. dr hab. inż., Zakład Chemii Organicznej, Instytut Chemii i Technologii Organicznej oraz Żywnościowej, Politechnika Gdańska, ul. Majakowskiego 11, 80-952 Gdańsk.

** dr inż., Zakład Chemii Organicznej, Instytut Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Sobieskiego 18, 80-216 Gdańsk.

VI-3. Antiviral activity**VI-4. Antitumor activity****VI-5. Application for vaccines****VI-6. Synergistic effect with other medicines****VI-7. Somnogenic activity****VII. Concluding remarks**

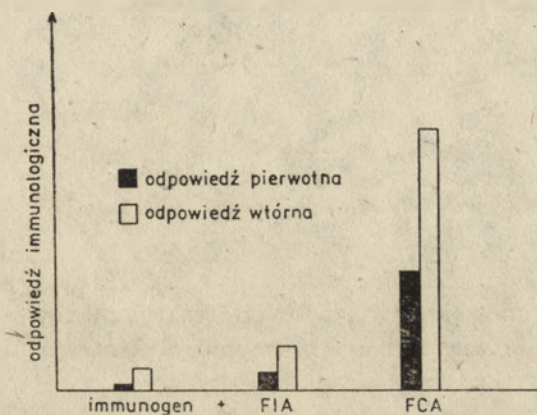
Wykaz stosowanych skrótów: CFA — cyklofosfamid, CL — test chemiluminescencyjny, stosowany do oznaczania aktywności fagocytozy, DTH — uczulenie typu późnego, synonim odporności komórkowej (delayed type hypersensitivity), EP — pirogeny endogenne, FCA — kompletny adiuwant Freund'a (Freund's complete adjuvant), FIA — niekompletny adiuwant Freund'a (Freund's incomplete adjuvant), IL-1 — interleukina 1, LAF — czynnik aktywujący limfocyty (lymphocyte activating factor), L18-MDP — 6-0-stearoilomuramylo-dipeptyd, LPS — lipopolisacharyd, LTP — laurylotetrapeptyd, MDP — muramylo-dipeptyd (N-acetylomuramylo-L-alanylo-D-izoglutamina), MLV-MDP — MDP kapsułkowany w wielowarstwowych fosfolipidowych pęcherzykach — liposomach (multilamellar vesicles-MDP), MTP — muramylotripeptyd — MDP zawierający dodatkowo kwas diaminopimelinowy lub lizynę, MTP-PE — fosforowa pochodna MTP (MTP-Phosphatidyl ethanolamine), Myc — reszta kwasów mykolinowych, NK — komórki NK (natural killer cells), nor-MDP — analog MDP nie zawierający grupy metylowej w łańcuchu bocznym kwasu muraminowego, SWS — sen wolnofalowy (slow wave sleep), TDM — dimykolan trehalozy, WSA — hydrolizat ściany komórkowej rozpuszczalny w wodzie, posiadający własności adiuwantowe (water soluble adjuvant).

I. Wprowadzenie

Syntetyczne muramylopeptydy o strukturze identycznej jak we fragmentach naturalnych ścian komórkowych oraz różnorodne ich analogi zaliczane są do jednych z najważniejszych odkryć nauk biomedycznych ostatnich lat [1]. Na początku lat siedemdziesiątych były one uważane wyłącznie za immunoadiuwanty [2, 3], czyli związki podwyższające odpowiedź organizmów wyższych na kontakt z antygenem. Obecnie wzbudzają ogromne zainteresowanie i uzasadnione nadzieje ze względu na ich własności i potencjalne zastosowanie w zwalczaniu infekcji bakteryjnych, wirusowych, pasożytniczych i grzybiczych, a także chorób nowotworowych.

Historia immunoadiuwantów (adiuwantów, immunostymulatorów) zaczęła się w 1945 r., kiedy Freund zauważył, że zabite mykobakterie zawieszane w emulsji wodno-olejowej znacznie zwiększały poziom odpowiedzi immunologicznej myszy na równocześnie podany antygen [4]. Chociaż czynnikiem aktywnym w tej emulsji są mykobakterie, to jednak ich czynność adiuwantowa ujawnia się wyłącznie po wprowadzeniu ich do ustroju w emulsji wodno-olejowej. Odczynnik złożony z zabitych mykobakterii, wody, oleju mineralnego i ewentualnie emulgatora został nazwany kompletnym adiuwantem Freund'a (FCA). Emulsja wod-

no-olejowa nie zawierająca bakterii, zwiększająca, ale w mniejszym stopniu, poziom odpowiedzi immunologicznej została nazwana niekompletnym adiuwantem Freund'a — FIA (Ryc. 1).



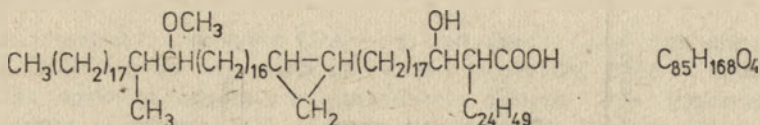
Ryc. 1. Wpływ niekompletnego (FIA) i kompletnego (FCA) adiuwanta Freund'a na odpowiedź immunologiczną określaną na podstawie miana przeciwciał.

Kompletny adiuwant Freund'a jest równocześnie immunogenem, co jest związane z obecnością bakterii, a ponadto wywołuje szereg niepożądanych efektów ubocznych, takich jak podwyższenie temperatury ciała, zapalenie stawów, powiększanie gruczołów limfatycznych, tworzenie guzów wysiękowych w jamie brzusznej, dolegliwości autoimmunologiczne, nadwrażliwość na endotoksyny, a także dolegliwości wywoływane przez niemetabolizowalny olej mineralny [5]. FCA jest więc w wysokim stopniu szkodliwy dla organizmów wyższych. Zdaniem Freund'a te niepożądane efekty FCA wywoływane przez komórki bakteryjne mogą być w znacznym stopniu ograniczone lub nawet wyeliminowane przez użycie jedynie tych fragmentów bakterii, które są nośnikami aktywności adiuwantowej.

II. Bakteryjna ściana komórkowa

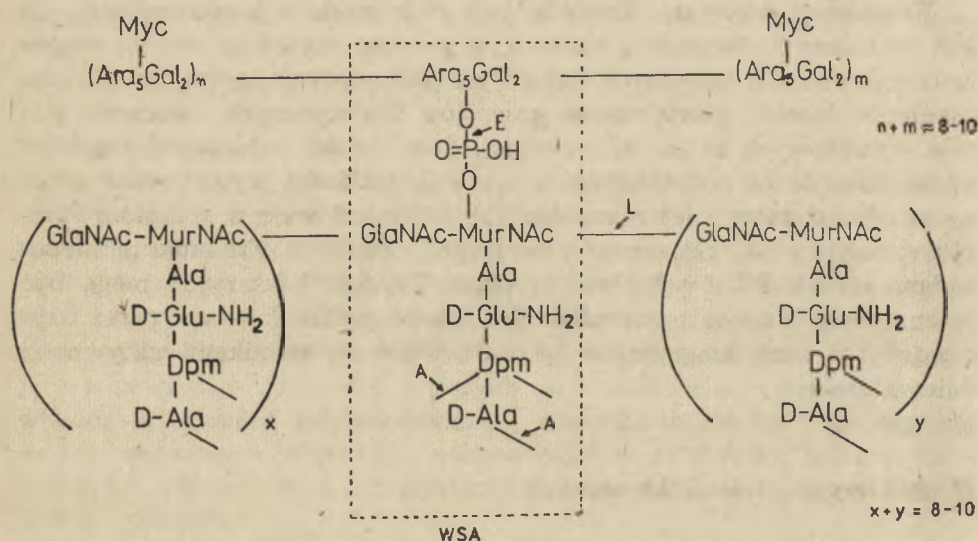
Wyniki badań Freund'a wzbudziły duże zainteresowanie i w wielu ośrodkach rozpoczęto prace prowadzące do oznaczenia i izolacji frakcji bakterii odpowiedzialnych za aktywność adiuwantową. W latach pięćdziesiątych stwierdzono, że ściana komórkowa mykobakterii uzyskana przez odwirowanie zmiażdżonych komórek całkowicie zastępuje całe bakterie w FCA. Od tego czasu ogromny wysiłek skierowano na poznanie skomplikowanej budowy ściany komórkowej bakterii, w której wyróżnić można 3 warstwy: glikolipidową, polisacharydową i glikopeptydową [6]. Warstwa glikolipidowa zbudowana jest z kwasów mykolino-

wych i arabinozy. Kwasy mykolinowe są rozgałęzionymi kwasami mono- lub dikarboksyłowymi zawierającymi od około 30 do ponad 80 atomów węgla oraz inne grupy funkcyjne jak np. hydroksylowe, ketonowe, wiązania podwójne lub pierścienie cyklopropanowe.



Wzór I. Kwas mykolinowy wyizolowany z *M. tuberculosis*.

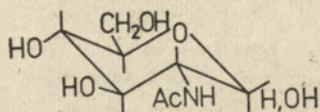
Druga warstwa, polisacharydowa (Ryc. 2), złożona jest z powtarzających się podjednostek zawierających reszty cukrowe arabinozy oraz galaktozy i dlatego nazywana jest arabinogalaktanem [6]. Arabinogalaktan połączony jest z warstwą glikopeptydową, czyli mureiną, poprzez wiązania estrowe kwasu fosforowego. Mureinę tworzą łańcuchy polisacharydowe poprzecznie sieciowane mostkami peptydowymi. Stwierdzono, że właśnie mureina jest obdarzona aktywnością adiuwantową.



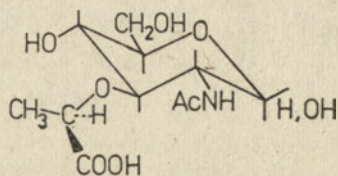
Ryc. 2. Fragment ściany komórkowej *Mycobacteria*; A — karboksypeptydaza; E — fosforodiesteraza; L — lizozym; strzałki oznaczają wiązania hydrolizowane przez zaznaczone enzymy.

W skład łańcucha polisacharydowego mureiny wchodzi N-acetylglukozoamina (II) i kwas N-acetylmuraminowy (III). Kwas muraminowy czyli 2-amino-3-0-(D-1-karboksyetylo)-2-dezoksy-D-glukopiranoza, jest analogiem glukozoaminy zawierającym resztę kwasu D-mlekowego w pozycji 3. Głównymi składnikami mostków peptydowych mureiny są

reszty L-alaniny, D-izoglutaminy, zamiennie — kwasu diaminopimelinowego lub L-lizyny oraz dodatkowo, w zależności od szczepu bakterii, D-alaniny lub/i glicyny.



Wzór II. N-Acetylglukozamina.



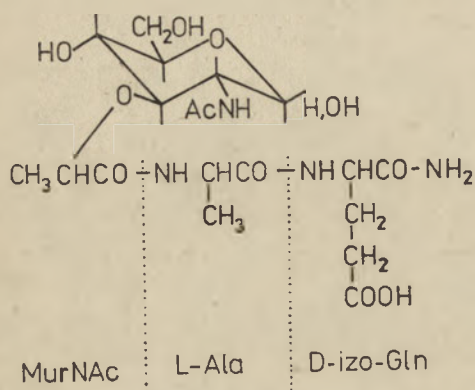
Wzór III. Kwas N-acetylmuraminowy.

Pod wpływem odpowiednich enzymów ściana komórkowa bakterii ulega fragmentacji, np. lizozym L (Ryc. 2) hydrolizuje wiązanie glikozydowe w wyniku czego powstaje frakcja zawierająca głównie muramylopeptydy i arabinogalaktan. Frakcja ta posiada pełną aktywność adiuwantową, lecz w przeciwieństwie do ściany komórkowej jest rozpuszczalna w wodzie — water soluble adjuvant (WSA). Stwierdzono, że WSA jest pozbawiony niektórych charakterystycznych dla całej ściany komórkowej niepożądanych efektów ubocznych. Fakty te zostały opublikowane w latach 1972—1973 i od tego czasu notuje się lawinę nowych odkryć. Okazało się, że muramylopeptydy — fragmenty mureiny izolowane po działaniu lizozymu (L) i fosfoesterazy (E, Ryc. 2) na ścianę komórkową, są nośnikami aktywności adiuwantowej. Badania coraz bardziej fragmentowanej mureiny doprowadziły do stwierdzenia iż pełną aktywność adiuwantową wykazuje jeszcze muramylotripeptyd — MTP [7]. Była to najmniejsza jednostka, jaką można było otrzymać przez enzymatyczną fragmentację ściany komórkowej, ponieważ wiązanie pomiędzy izoglutaminą a kwasem diaminopimelinowym lub lizyną jest utworzone poprzez grupę γ -karboksylową i nie ulega enzymatycznej hydrolizie, zaś hydroliza chemiczna powoduje rozkład wszystkich wiązań amidowych. Do dalszych badań potrzebne były fragmenty syntetyczne, wykluczające ponadto wpływ ewentualnych zanieczyszczeń zawartych w preparatach biologicznych na aktywność adiuwantową.

III. Muramylodipeptyd — MDP

Konkurencja w poszukiwaniu najmniejszego fragmentu ściany komórkowej bakterii obdarzonego aktywnością adiuwantową była ogromna. Świadczy o tym np. fakt opisanego przez badaczy francuskich syntezy N-acetylmuramyl-L-alanylo-D-izoglutaminy tzw. muramylodipeptydu (MDP, Wzór IV) w 1975 r. [8], a więc dopiero w rok po opublikowaniu

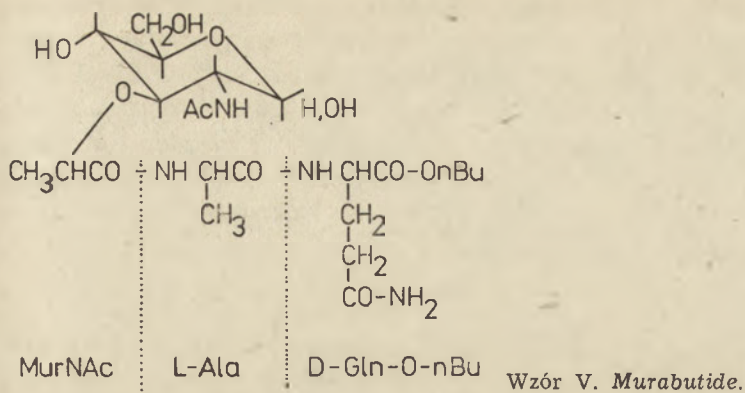
przez nich rewelacyjnych danych o jego własnościach [7] tj., że MDP jest najmniejszą adiuwantowo czynną cząsteczką otrzymaną na wzór naturalnego fragmentu ściany komórkowej bakterii. Odkrycie to zostało bardzo szybko potwierdzone i rozszerzone przez grupę badaczy japońskich, którzy wykazali, że zarówno tetrapeptyd bez kwasu muraminowego, jak i muramylo-L-alanina są adiuwantowo nieaktywne [9—11].



Wzór IV. Muramylodipeptyd (MDP).

Wykrycie prostego, syntetycznego adiuwanta wzbudziło ogromne zainteresowanie wśród biochemików i biologów. Okazało się, że wykazywał dłuższe działanie niż FCA [12], nie był immunogenem, a przede wszystkim był niskotoksyczny i pozbawiony wielu efektów ubocznych [13], które uniemożliwiały kliniczne zastosowanie FCA. Zainteresowanie wzbudził fakt, że chociaż MDP jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie jako składnik ściany komórkowej prawie wszystkich bakterii, to jednak tylko niektóre bakterie są adiuwantowo czynne. Zjawisko to zostało wytłumaczone niedostępnością fragmentu zawierającego MDP dla systemu immunologicznego gospodarza lub/i występowaniem czynnika o działaniu immunosupresorowym.

MDP i wiele jego pochodnych, podobnie jak martwe mykobakterie, bakteryjna ściana komórkowa czy WSA wykazują własności pirogenne [5]. Przez długi okres sądzono, że własności adiuwantowe i pirogenne są nierozłączne. Otrzymano jednak szereg syntetycznych immunostymulatorów, których aktywność pirogenna została bardzo obniżona lub wręcz wyeliminowana [14—16]. Spośród nich został wyselekcjonowany muramylodipeptyd zawierający ester n-butyłowy glutaminy (Wzór V), nazwany *Murabutide*, który jest adiuwantem równie silnym jak MDP, a przy tym jest apirogeny i działa jako stymulator odporności niespecyficznej [17]. *Murabutide* przeszedł pozytywnie I i II fazę testów farmakologicznych i obecnie jest poddawany badaniom klinicznym jako składnik uodporniających szczepionek dla ludzi [1, 18].



Szeroko prowadzone badania aktywności biologicznej fragmentów ściany komórkowej bakterii wykazały, że są adiuwantowo czynne peptydy nie zawierające reszty kwasu muraminowego, tzw. desmuramylpeptydy. Wszystkie one zawierają resztę kwasu diaminopimelinowego [1].

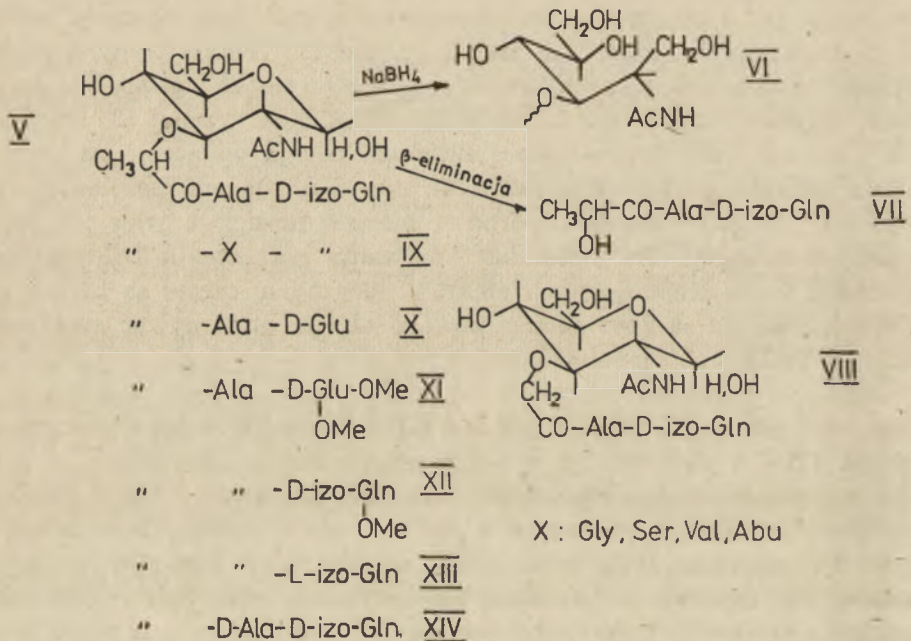
Oprócz całej uprzednio opisanej rodziny adiuwantów związanych ze ścianą komórkową znane są inne adiuwanty zarówno pochodzenia bakteryjnego, jak i proste związki nieorganiczne, np.: liposacharydy bakterii gramujemnych, dimykolan trehalozy, niektóre endotoksyny, tapioka, bromek dimetylodioktadecyloamoniowy, wodorotlenek glinu, fosforan glinu, alginian wapnia czy krystaliczny dwutlenek krzemu [3, 19]. Jednak działanie adiuwantów nieorganicznych polega wyłącznie na podnoszeniu poziomu swoistych przeciwciał; nie indukują one uczulenia typu późnego, nie podwyższają odporności niespecyficznej, a więc ich działanie jest niekompletne. Natomiast adiuwanty pochodzenia bakteryjnego wykazują wiele niepożądanych efektów ubocznych, często są bardzo toksyczne, ponadto są zbyt skomplikowane aby je otrzymywać syntetycznie i modyfikować chemicznie.

Mimo, że adiuwanty są znane od ponad 40 lat dopiero poznanie prostego, stosunkowo łatwego w syntezie MDP otworzyło nową erę w immunologii. MDP i jego analogi są adiuwantami bardzo aktywnymi, a przy tym związkami niskotoksycznymi lub nietoksycznymi, nie wywołują szkodliwych efektów ubocznych i nie wymagają podawania w szkodliwym dla organizmu oleju mineralnym. MDP i wiele jego syntetycznych pochodnych, znacznie podwyższają niespecyficzną odporność organizmów wyższych przeciwko infekcji bakteryjnej i wirusowej oraz działają przeciwnowotworowo. Zwiększają one również skuteczność szczepionek odpornościowych, a także oddziałują synergicznie z różnymi lekami. Oprócz bardzo szerokiego spektrum działania immunologicznego muramylpeptydy wykazują również własności neurofarmakologiczne oddziałując bezpośrednio na centralny system nerwowy [20—22]. Aktywność ta przejawia się zarówno we własnościach pirogennych, jak i somnoge-

nicznych [23]. MDP i jego analogi wykazują działanie przeciwzapalne [24], a także oddziałują na autonomiczny układ nerwowy [25]. Z uwagi na istotny wpływ, jaki ten typowy metabolit bakteryjny wywiera na funkcjonowanie systemu immunologicznego organizmów wyższych, zaliczono MDP do nowej kategorii witamin [1, 26], a więc do substancji egzogennych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów. Źródłem muramylopeptydów są trawione lizozymem bakterie przeżuwane pokarmowe lub bakterie dostarczane w pożywieniu [27].

IV. Zależność aktywności adiuwantowej muramylopeptydów od ich konstytucji

A d a m i w s p., odkrywcy adiuwantowej aktywności MDP, podjęli wnikliwe badania wpływu budowy cząsteczki muramylopeptydów na ich biologiczną czynność [28]. Stwierdzili oni, że redukcja MDP za pomocą NaBH_4 , otwierająca pierścień piranozydowy kwasu muraminowego prowadzi do całkowitego zaniku aktywności adiuwantowej związku zwane-



Ryc. 3. Zmiany konstytucyjne muramylo-dipeptydu prowadzące do wyjaśnienia zależności aktywności adiuwantowej od konstytucji.

go muramicytolodipeptydem VI (Ryc. 3). Beta eliminacja kwasu muraminowego w pozycji 3 daje laktodipeptyd VII, o słabych własnościach immunosupresorowych. MDP bez grupy metylowej w reszcie kwasu mle-

kowego, tzw. nor-MDP lub desmetylomuramylo-dipeptyd-VIII, jest analogiem o obniżonej aktywności, ale równocześnie jest znacznie mniej toksyczny. Związki otrzymane w wyniku zastąpienia L-alaniny glicyną — IX, a także D-izo-glutaminy kwasem D-glutaminowym — X lub takimi pochodnymi jak D-Glu(OMe)₂ — XI i D-Glu(OMe)NH₂ — XII są mniej aktywne niż MDP. Późniejsze badania spowodowały zmianę poglądów na aktywność tych związków [16]. Zmiana konfiguracji izo-Gln — XIII lub wprowadzenie D-Asn w miejsce D-izo-Gln powoduje całkowitą utratę aktywności, zaś zamiana L-Ala na D-Ala — XIV prowadzi do otrzymania immunosupresora. Jedynie analog, w którym L-Ala zastąpiono L-Ser wykazywał pełną aktywność adiuwantową. Inni autorzy wykazali, że alaninę można z powodzeniem zastąpić także waliną lub kwasem aminomasłowym, co w wielu przypadkach dało analogi o wyższej aktywności [29, 30]. Grupę acetamidową kwasu muraminowego można bez utraty aktywności zastąpić grupą aminową lub hydroksylową [31], podobnie również grupę OH przy C₆ można wymienić na funkcję aminową [32]. Natomiast pochodna 2-dezoksy nie wykazuje własności adiuwantowych [31]. Wymiana reszty glukozaminy w kwasie muraminowym na resztę innego cukru lub aminocukru z reguły prowadzi do utraty aktywności adiuwantowych, chociaż pochodna mannozy zachowuje aktywność [33—35]. Di- i polisacharydowe peptydy są bardziej aktywne od MDP, ale są znacznie trudniejsze w syntezie [36—38].

V. Analogi i pochodne MDP

V-1. Muramylopeptydy znakowane radioizotopami i grupami fluoryzującymi

Muramylo-dipeptyd znakowany radioaktywnym izotopem węgla ¹⁴C odegrał istotną rolę w badaniu metabolizmu i mechanizmu działania MDP. Stwierdzono między innymi bardzo szybkie wydalanie tego preparatu z organizmu myszy [39]. Niezwykle mała ilość — 1⁰/₀ dawki 20—100 μg, pozostająca i oddziałująca w organizmie świadczy o niezwykle wysokiej aktywności MDP *in vivo*.

Równie szybko jak MDP z organizmu myszy były wydalane większe muramylopeptydy, przy czym związki te w większym stopniu niż MDP ulegały hydrolizie [40]. Głównymi produktami hydrolizy disacharydo-pentapeptydu były: kwas glukozaminomuraminowy i pentapeptyd, co sugerowało działanie specyficznego enzymu hydrolizującego wiązanie między kwasem muraminowym i alaniną. Enzym taki został wyizolowany z ludzkiej surowicy [41—43]. Przypuszcza się, że w surowicy może występować więcej enzymów hydrolizujących muramylopeptydy i że enzymy te odgrywają ważną rolę w regulacji systemu immunologicznego [1].

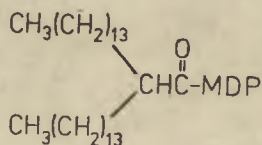
W celu śledzenia metabolizmu muramylopeptydów w organizmach ssaków zsyntezowano również pochodne MDP z ugrupowaniami fluoryzującymi [44, 45]. Zachowują one własności adiuwantowe, a jednocześnie są wykrywalne w bardzo niskich stężeniach, co umożliwia śledzenie losów muramylopeptydu w badanym organizmie.

V-2. Muramylopeptydy osadzone na nośnikach

Badania z udziałem radioaktywnie znakowanych muramylopeptydów wskazały na możliwość podwyższenia ich aktywności przez zahamowanie szybkości wydalania tych preparatów z organizmu. Cel ten osiągnięto dwoma sposobami: przez przyłączenia MDP do nośników o większej masie cząsteczkowej i przez podwyższenie lipofilowości aktywnego związku. Do najczęściej stosowanych nośników należą syntetyczne polipeptydy [5, 46], chociaż stosowano także kopolimer MDP z aldehydem glutarowym [39]. Jak ogromny wpływ na aktywność adiuwantową ma zwiększona masa cząsteczkowa preparatu świadczy fakt, że adiuwantowo nieczynny glikozyd β -p-aminofenylowy MDP po kopolimeryzacji z aldehydem glutarowym staje się nie tylko adiuwantem znacznie silniejszym od MDP, ale równocześnie stymuluje odporność niespecyficzną myszy na infekcję bakteryjną [5]. Wykazano także, że zastosowane jako antygeny, adiuwantowo czynne połączenia MDP z niektórymi białkami powodują wytwarzanie przeciwciał przeciwko MDP i to zarówno związanego z białkami, jak i wolnego syntetycznego MDP [47].

V-3. Lipofilowe pochodne muramylopeptydów

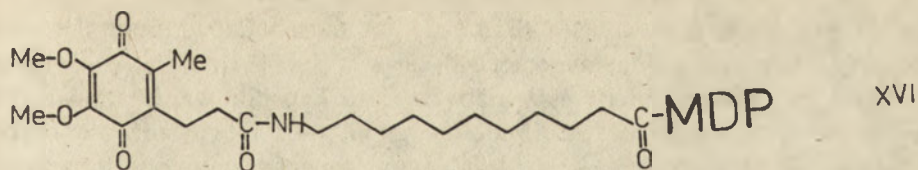
W celu zwiększenia lipofilowości preparatów muramylopeptydowych chemicy japońscy [48—52] acylowali je w pozycji 6 reszty cukrowej różnorodnymi kwasami karboksylowymi, syntetycznymi i pochodzenia naturalnego, w tym kwasami mykolinowymi. Wszystkie otrzymane pochodne były adiuwantami, wiele z nich okazało się silniejszymi niż MDP, a najaktywniejszy (B30-MDP) został wytypowany do badań farmakologicznych [53].



Wzór XV. B30—MDP.

Wiele z otrzymanych związków tego typu wykazywało aktywność przeciwnowotworową [48, 49].

Lipofilowość MDP zwiększano również przez wprowadzenie [54] w pozycję 6 reszty cukrowej różnych aminokwasów, acylowanych na grupie



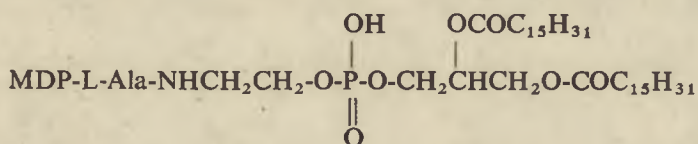
	Reakcja skórna [mm]	
	24 h	48 h
XVI	20,5	22,3
MDP	20,0	17,3
FIA	9,0	1,8
—	0	0

Ryc. 4. Aktywność adiuwantowa lipofilowej pochodnej MDP zawierającej ugrupowanie benzochinowe i kwas 11-aminoundekanowy. Oznaczenie aktywności przeprowadzono na świnkach morskich wobec N-acetylo-3/4-arsenofenyloazo/-L-tyrozyny jako antygeny.

aminowej kwasami karboksylowymi zawierającymi dodatkowe grupy funkcyjne, np. ugrupowanie benzochinonowe (Ryc. 4).

Umieszczenie reszt aminokwasów pomiędzy grupą acylową a kwasem muraminowym ułatwiło procedurę otrzymywania 6-O-pochodnych, a produkty okazały się bardzo aktywne. Szczególnie silnym adiuwantem jest pochodna zawierająca kwas 11-aminoundekanowy. Analogi MDP acylowane w pozycji 6 kwasami karboksylowymi od C₂—C₃₀ należą do silnych adiuwantów [55]. Zsyntezowano również analogi MDP acylowane w pozycji 6 reszty cukrowej sprzężonymi, polienowymi, liniowymi lub rozgałęzionymi kwasami karboksylowymi o długości łańcucha od C₆ do C₄₀ [56]. Lipofilowość muramylopeptydów podwyższano również przez przyłączanie kwasów tłuszczowych lub mykolinowych do grupy karboksylowej izoglutaminy [15, 57—59].

Do najbardziej interesujących lipofilowych pochodnych MDP należy fosforowa pochodna MDP [60] oznaczona symbolem MTP-PE:



Wzór XVII. MTP-PE

Niedawno otrzymano również cholesterolową pochodną MDP-L-Ala oznaczoną symbolem MTP-chol. Jest ona znacznie aktywniejsza od MDP [61].

Wysokolipofilowe analogi MDP w emulsji wodno-olejowej są skuteczniejsze w działaniu niż ich roztwory wodne. Dlatego podjęto próby

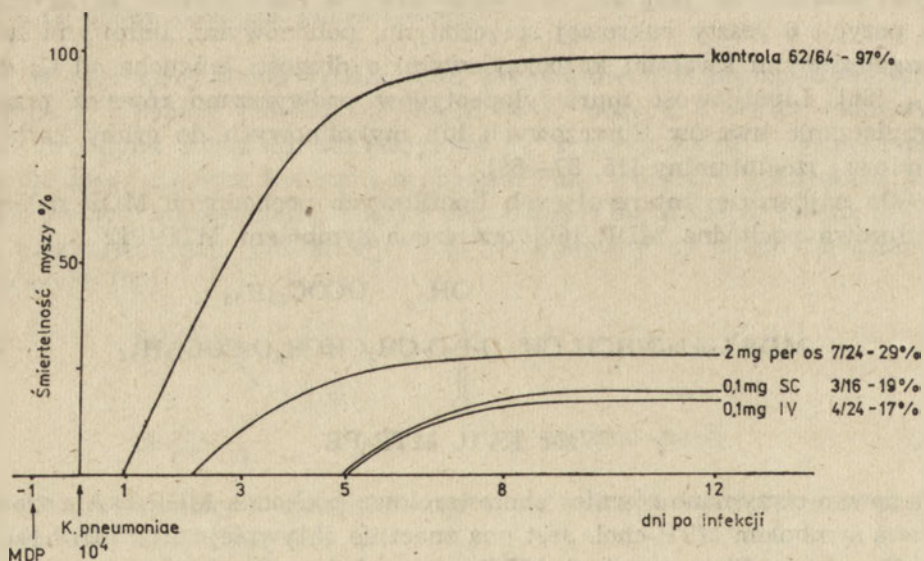
zastąpienia oleju mineralnego (FIA) olejem metabolizowalnym. Dobrym substytutem oleju mineralnego okazał się skwalan [62], a także olej arachidowy [2]. Osiągnięciem ostatnich lat jest kapsułkowanie muramylopeptydów w liposomach fosfolipidowych [63, 64]. Wprowadzenie muramylopeptydów w postaci wielowarstwowych pęcherzyków w otoczkach fosfolipidowych (liposomów) umożliwia obniżenie dawki efektywnej ponad dziesięciokrotnie w porównaniu z preparatem niekapsułkowanym.

VI. Aktywność farmakologiczna

VI-1. Stymulacja niespecyficznego odporności przeciwbakteryjnej

Duże zainteresowanie muramylopeptydami i szeroko prowadzone różnorodne badania w wielu ośrodkach ujawniły szereg niezwykle interesujących własności tych związków. Stwierdzono między innymi ich zdolność do podwyższania niespecyficznego czyli naturalnej odporności organizmów wyższych na infekcje bakteryjne. Po raz pierwszy zjawisko to opisał Chedid i wsp. [65] w 1977 r. Wykazali oni, że MDP podany dożylnie, podskórnym lub nawet doustnym w istotny sposób zmniejszał śmiertelność myszy zakażonych dzień później śmiertelną dawką *Klebsiella pneumoniae*. Rycina 5 obrazuje skuteczność działania MDP w zależności od sposobu podania preparatu [5].

MDP i szereg jego analogów skutecznie chronią myszy zakażone bakteriami *K. pneumoniae* niezależnie od sposobu zakażenia (dożylnie



Ryc. 5. Aktywność MDP w stymulowaniu niespecyficznego odporności myszy na zakażenie *K. pneumoniae* w zależności od sposobu podania preparatu.

lub domięśniowo) i niezależnie od sposobu podawania MDP (przed lub po zakażeniu, dożylnie, podskórnie czy doustnie). Okazało się również, że muramylopeptydy, w przeciwieństwie do LPS chronią także znane ze słabej odpowiedzi immunologicznej noworodki mysie [5,15]. MDP i jego analogi mogą stymulować odporność niespecyficzną różnych zwierząt na infekcje wywoływane przez różnorodne mikroorganizmy, w tym bakterie, pierwotniaki i grzyby [5]: *Mycobacterium tuberculosis* [66], *Listeria monocytogenes* [67, 68], *Pseudomonas seruginosa* [68, 69], *Escherichia coli* [55, 70, 71], *Toxoplasma gondii* [66, 72], *Staphylococcus aureus* [73], *Streptococcus pneumoniae* [15, 74], *Candida albicans* [68, 69, 71, 73], *Trypanosoma cruzi* [75]. Stymulowanie niespecyficznej odporności zależy nie tylko od typu infekcji i konstytucji muramylopeptydu, ale też od warunków podawania immunostymulatora. Muramylopeptydy stymulować mogą odporność niespecyficzną zwierząt o sztucznie osłabionym systemie immunologicznym w wyniku podawania cyklofosfamidu [69] lub naświetlania promieniami X [59, 69, 71]. Kliniczne zastosowanie preparatów o takim działaniu jest ze wszech miar pożądane, szczególnie dla pacjentów poddanych działaniu immunosupresyjnych leków przeciwnowotworowych. Może muramylopeptydy okazać się skuteczne również w leczeniu AIDS.

VI-2. Próby wyjaśnienia mechanizmu działania

Dotychczasowe badania wskazują na decydującą rolę makrofagów i limfocytów T w stymulacji układu odpornościowego przez MDP. W badaniach z udziałem muramylopeptydów znaczonych radioaktywnym jodem (^{125}I) wykryto specyficzne miejsca wiążące muramylopeptydy z makrofagami [76]. Uważa się, że MDP w pierwszym etapie oddziałuje na makrofagi uwalniając aktywny mediator, który z kolei pośredniczy w uaktywnianiu limfocytów T i B. Przeprowadzono również doświadczenia sugerujące, że interleukina 1 może pełnić rolę pośrednika w immunostymulacyjnym działaniu MDP. Wsuwane są także sugestie, że MDP może indukować wytwarzanie interleukiny-2. Wykazano ponadto bezpośrednie oddziaływanie MDP na limfocyty T i B.

W większości przypadków MDP wykazuje własności adiuwantowe, ale okazało się, że w pewnych doświadczeniach działa wyraźnie jako immunosupresor, przy czym kierunek działania zależy przede wszystkim od warunków prowadzenia doświadczeń, w tym od wielkości użytej dawki. Na podstawie tej pozornej sprzeczności wysunięto dla nich nazwę immunoregulatorów, w której to nazwie zawiera się zarówno oddziaływanie stymulujące jak i dezaktywujące. Niewątpliwie działanie tych preparatów ukierunkowane jest na układ siateczkowo-śródbłonkowy, z możliwością uaktywniania zarówno komórek odpornościowych jak i komórek immunodepresyjnych.

Przytoczone wyżej przykłady świadczą o niezwykle skomplikowanym oddziaływaniu muramylopeptydów na system odpornościowy organizmów wyższych. Wydaje się jednak, że stosunkowo dobrze rozpoznano i udokumentowano efekt oddziaływania muramylopeptydów na różnorodne funkcje makrofagów. Wśród najważniejszych oddziaływań na makrofagi można wymienić:

- zwiększenie ilości wydzielanych metabolitów tlenowych: O_2^- i H_2O_2 , które jak się przypuszcza biorą aktywny udział w niszczeniu obcych ciał, w tym mikroorganizmów i komórek nowotworowych,
- inhibicję migracji makrofagów oraz zwiększenie ich przylegania do powierzchni,
- zwiększenie aktywności cytostatycznej i cytotoksycznej w stosunku do komórek obcych, także komórek nowotworowych,
- podwyższenie aktywności fagocytotycznej,
- indukcję wydzielania monokinów: czynnika aktywującego limfocyty (LAF), interleukiny 1 (IL-1) i endogennych pirogenów (EP),
- przyspieszenie inkorporacji glukozoaminy (przyspieszenie metabolizmu),
- zahamowanie syntezy DNA,
- indukowanie namnażania kolonii makrofagów,
- stymulację funkcji mitogennej makrofagów.

Muramylopeptydy oddziałują również na funkcje biologiczne innych komórek odpornościowych, ale dzieje się to za pośrednictwem makrofagów.

VI-3. Aktywność przeciwwirusowa

Początkowo uważano, że MDP nie wykazuje aktywności przeciwwirusowej i dopiero w 1983 r. Dietrich i wsp. [77, 78] zakomunikowali o rewelacyjnym działaniu fosforowej pochodnej MDP — MTP-PE (XVII) podwyższającej odporność myszy i świnek morskich na infekcję wirusami typu RNA i DNA. Stwierdzono również, że podobnie jak w przypadku bakterii i nowotworów, MDP w połączeniu z dimykolanem trehalozy zapewnia całkowitą ochronę myszy przed wirusami grypy [66, 79]. Późniejsze badania wyjaśniły rozbieżności na temat występowania bądź braku aktywności przeciwwirusowej MDP [80]. Potwierdziły one brak przeciwwirusowego działania MDP *in vitro*, nawet w bardzo dużych stężeniach oraz aktywność przeciwwirusową jego lipofilowych pochodnych B30-MDP i MDP-Lys (L18) dopiero w dawkach zbliżonych do toksycznych. Natomiast *in vivo* te same muramylopeptydy okazały się zdolne do częściowego zahamowania infekcji wirusami *Vaccinia* (krowianki) i *Herpes simplex* (opryszczki zwykłej) u myszy.

Tabela 1

Zahamowanie infekcji myszy wirusem *Vaccinia* przez MDP i jego analogii.

Muramylopeptyd	Dawka mg/mysz p.o.	Zahamowanie infekcji %
MDP	1	38
„	3	41
„	6	34
B30-MDP	1	47
„	3	66
„	6	64
MDP-Lys(L18)	0,5	59
„	1	57
—	—	0

Mechanizm przeciwwirusowego działania muramylopeptydów nie jest dotychczas poznany. Stwierdzono, że MDP i jego analogi nie powodują wydzielania interferonu, natomiast aktywują induktory interferonu wczesnego typu, do których zaliczany jest między innymi bakteryjny liposacharyd (LPS) [81]. Spostrzeżenie to wykorzystano w leczeniu myszy zainfekowanych wirusem *Vaccinia* uzyskując przez podanie kompozycji MDP/LPS zahamowanie infekcji w 80%. Uważa się, że przeciwwirusowe działanie muramylopeptydów polega na aktywowaniu makrofagów. Pogląd ten potwierdzono w oparciu o test chemiluminescencyjny. Wirusy grypy A i B, a również wirusy zdeaktywowane lub nawet ich fragmenty stosowane w szczepionkach, znacznie obniżają chemiluminescencję (CL) makrofagów, co świadczy o dezaktywującym działaniu wirusów na proces fagocytozy. Natomiast MDP z niewielką dawką wirusów lub związany kowalencyjnie z podjednostką wirusa grypy przywraca, a nawet podwyższa poziom CL obniżony uprzednio przez wirusy grypy [82].

W badaniach *in vitro* wykazano silny wpływ lipofilowych pochodnych MDP na zwiększenie szybkości namnażania wirusa D2V w hodowli komórek odpornościowych myszy, któremu towarzyszy nasilenie fagocytozy [83]. To dwojakiego rodzaju oddziaływanie muramylopeptydów może tłumaczyć ukazujące się początkowo doniesienia o braku przeciwwirusowej aktywności MDP.

VI-4. Aktywność przeciwnowotworowa

Przeciwnowotworowa aktywność muramylopeptydów budzi niezwykle zainteresowanie ze względu na możliwość ich klinicznego zastosowania. Już od 1959 r. wiadomo, że mykobakterie działają przeciwnowo-

tworowo [84—86], a wstrzykiwanie ich bezpośrednio w rosnące guzy rakowe powoduje regres nowotworów nawet u ludzi [87, 88]. Jednak wyjątkowo szkodliwe efekty uboczne, często zagrażające życiu pacjentów uniemożliwiają stosowanie w praktyce tej metody leczenia. Podobne własności przeciwnowotworowe wykazuje ściana komórkowa wielu bakterii, w tym BCG, *M. smegmatis*, *N. rubra*. W Japonii przy pomocy preparatów zawierających ścianę komórkową bakterii wyleczono kilkuset pacjentów chorych na raka [1]. Lek pod nazwą *Ribigen* zawierający w swoim składzie ścianę komórkową *M. phlei* jest stosowany w leczeniu nowotworów u krów i koni [1]. Przez długi okres uważano, że MDP jest pozbawiony własności przeciwnowotworowych *in vivo* chociaż *in vitro* stwierdzono aktywujące działanie MDP w hamowaniu wzrostu komórek *mastocytoma* P815 [1]. Późniejsze badania potwierdziły stymulujące działanie MDP na makrofagi w procesie cytolizy komórek nowotworowych [89—91]. Wykazano, że aktywacja przeciwnowotworowa makrofagów przez MDP jest gatunkowo specyficzna, tzn. zależy od gatunku zwierząt, z których makrofagi zostały pobrane do badań [92].

Wnikliwe badania przeprowadzone z lipofilowymi analogami MDP [48, 93, 94] doprowadziły do wykrycia związków o wyraźnym działaniu przeciwnowotworowym *in vivo* — (Tab. 2).

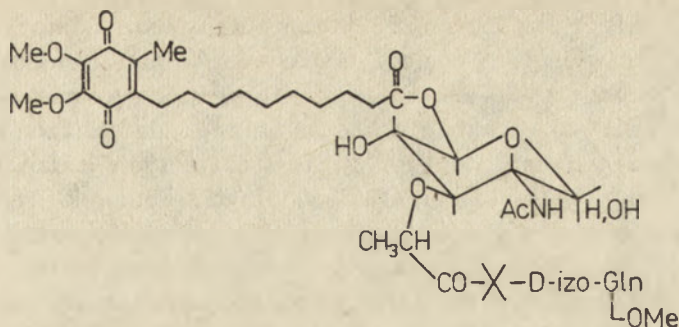
Tabela 2

Przeciwnowotworowe oddziaływanie 6-0-acylowych pochodnych MDP u myszy z wszczepionym nowotworem *MH-134 hepatoma*, $2 \cdot 10^5$ komórek

Acyl ^{a)}	Liczba myszy zdrowych po 49 dniach	Liczba myszy zakażonych
L-30		0/10
B-30		1/10
BH-32		2/10
B-46		4/10
BH-48		7/10
Nokardomykoly(51)		5/9
Korynomykoly(31)		6/7

^{a)} L — łańcuch węglowy prosty; B — łańcuch węglowy rozgałęziony; BH — łańcuch węglowy rozgałęziony, obecne grupy hydroksylowe; podana liczba oznacza liczbę atomów węgla w łańcuchu grupy acylowej.

Bardzo aktywne przeciwnowotworowo okazały się pochodne muramyllopeptydowe zawierające ugrupowanie benzochinonowe [30, 49]. Z danych przedstawionych na rycinie 6 widać, że pochodna zawierająca walinę zapewnia 100% wyleczenie myszy, którym wszczepiono nowotwór *fibrosarcoma Meth A*. Osiągnięcia te zostały potwierdzone przez innych autorów [95].



X	Liczba myszy wolnych od raka / Liczba myszy zainfekowanych
Ser	3/10
Thr	6/10
Val	10/10
kontrola	0/10

Ryc. 6. Aktywność przeciwnowotworowa analogów MDP.

Wysoką odporność nowotworową myszy uzyskano przez podawanie im szczepionki zawierającej MDP kowalencyjnie związanej z antygenem towarzyszącym nowotworowi indukowanemu przez metylocholanren [96]. Kapsułkowanie MDP w wielowarstwowych fosfolipidowych pęcherzykach, tzw. liposomach, korzystnie wpływa na aktywność cytostatyczną makrofagów [97]. Stosowanie MLV-MDP po resekcji guza pierwotnego zapewniało wyleczenie 60% myszy zakażonych nowotworem *melanoma*. Stwierdzono przy tym, że aktywność przeciwnowotworowa tego układu była niezależna od obecności limfocytów T [98]. Uważa się, że kapsułkowanie MDP zwiększa jego aktywność przez przedłużanie czasu przebywania muramylopeptydu w makrofagach.

Tabela 3

Regres wszczepionego nowotworu 10 *hepatocellular carcinoma* u świnek morskich leczonych muramylopeptydami w obecności dimykolanu trehalozy; podana jest liczba zwierząt wyleczonych w stosunku do liczby zwierząt leczonych

Analog MDP+ 150 µg+ dimykolan trehalozy, 150 µg	regres raka po 3 miesiącach
MDP	1/17
MDP(DD)	0/9
Desmetylo-MDP	2/19
N-Ac-Mur-Ser-D-izo-Gln	10/17
N-Ac-4,6-di-O-oktanoilo-Mur-Val-D-izoGln	16/18
N-Ac-desmetylo-Mur-Abu-D-izo-Gln	17/18

Świnki morskie zakażone nowotworem *hepatocarcinoma* leczono emulsją olejową zawierającą analogi MDP i dimykolan trehalozy [99]. Podobnie jak w przypadku działania przeciwwirusowego oba te adiuwanty oddziaływały synergicznie dając układy o silniejszych własnościach przeciwnowotworowych (Tab. 3). W trakcie tych badań stwierdzono, że ponowne wstrzyknięcie takich samych komórek rakowych zwierzętom wyleczonym z pierwszego zakażenia nie wywoływało u nich rozwoju nowotworu. Osobniki te zostały uodpornione na ten typ nowotworu. Niektórzy onkolodzy uważają, że immunostymulatory muramylopeptydowe powinny dać pożądaną efekt w terapii przeciwnowotworowej z uwagi na stymulowanie odporności niespecyficznej, jak i na podwyższanie odpowiedzi organizmu na antygeny nowotworowe. *

Przeciwnowotworową aktywność MDP i MDP(DD) *in vivo* porównano z działaniem cyklofosfamidu, znanego silnego czynnika cytostatycznego [100]. Cyklofosfamid był aktywny wobec wszystkich badanych nowotworów, natomiast muramylopeptydy działały selektywnie, ale wielokrotnie silniej (Tab. 4).

Tabela 4

Porównanie skuteczności leczenia różnych nowotworów myszy przy pomocy MDP, MDP(DD) i cyklofosfamidu

Typ nowotworu	ID ₅₀ , mg/kg/dzień, i.p.			ID ₅₀ CFA	ID ₅₀ CFA
	MDP	MDP(DD)	CFA	ID ₅₀ MDP	ID ₅₀ MDP(DD)
BALENTL 13	nieakt.	nieakt.	3	—	—
„ 3	„	„	4,5	—	—
„ 5	0,35	„	2	7	—
„ 7	0,1	„	2	20	—
„ 9	0,15	„	3	20	—
P1798	0,2	„	4	20	—
ABPL2	nieakt.	0,6	8	—	13
MOPC173	„	0,2	20	—	100

Badania nad mechanizmem przeciwnowotworowego działania muramylopeptydów wskazują na ich istotną rolę w aktywacji makrofagów [101]. Szczególnie silny wpływ na zwiększenie przeciwnowotworowej aktywności makrofagów wywiera obecność limfokin [102]. Wysuwane są sugestie, że aktywną częścią IL-1 jest muramylopeptyd. Duże znaczenie ma stymulacja aktywności komórek NK (natural killer cells) przez MDP [89, 103—105].

VI-5. Zastosowanie muramylopeptydów w szczepionkach

Odkrycie niskocząsteczkowych, stosunkowo łatwych w syntezie adiuwantów muramylopeptydowych, pozbawionych większości szkodliwych

efektów cechujących FCA umożliwiło zastosowanie ich do zwiększenia skuteczności znanych szczepionek uodporniających, w tym szczepionek przeciwko grypie [106, 107], gruźlicy [108] i malarii [109, 110]. Bardzo skuteczna okazała się szczepionka przeciwko *Brucella abortus* 45/20, zawierająca obok zabitych na gorąco bakterii MDP i dimykolan trehalozy [111, 112]. Doustna szczepionka otrzymana z MDP i antygenów bakterii *S. mutans* zabezpieczała szczury przed próchnicą zębów wywoływana przez te bakterie [113]. Na przykładzie myszy i świnek morskich potwierdzono adiuwantowe działanie apirogenego *Murabutide* w szczepionkach przeciwko wirusowi *hepatitis B* [114, 115]. Obecnie szczepionki zawierające *Murabutide* są poddawane próbom klinicznym [116].

Współcześnie dąży się do stosowania tzw. szczepionek drugiej generacji, w których w miejsce wirusów, bakterii, pasożytów lub ich fragmentów wprowadza się syntetyczne determinanty antygenowe [117, 118]. Są one pozbawione niebezpiecznych zanieczyszczeń pochodzenia biologicznego, ale najczęściej są bardzo słabymi immunogenami i w związku z tym ich skuteczność jest ściśle uwarunkowana współdziałaniem adiuwantów. Jedną z pierwszych szczepionek drugiej generacji zawierającą MDP była szczepionka przeciw dyfterytowi otrzymana na bazie syntetycznych oligopeptydów, fragmentów toksyny dyfterytowej (119, 120). Później otrzymano szereg innych szczepionek II generacji zawierających muramylopeptydy, a wśród nich przeciwko wirusowi pryszczycy, malarii i zapalenia wątroby [121].

Ponieważ antygenem może być prawie każde obce białko, wyprodukowano również szczepionki przeciw określonym hormonom, np. przeciwko niezbędnej do utrzymania ciąży gonadotropinie kosmówkowej. W tego rodzaju szczepionkach antykoncepcyjnych zastosowano podwyższający immunogenność hormonu nośnik białkowy oraz muramylopeptydy jako adiuwanty [122, 123]. Znana jest również powodująca kastrację immunologiczną szczepionka oparta na połączeniu hormonu uwalniającego hormon luteinizujący z MDP-Lys [124, 125] oraz szczepionki poliwalentne, otrzymane przez przyłączenie kilku różnych syntetycznych antygenów do syntetycznych lub naturalnych nośników [121, 126]. Prze-testowano między innymi w obecności *Murabutide* szczepionkę tetrawalentną wywołującą wytwarzanie przeciwciał dla czterech antygenów: zarazków dyfterytu, malarii, zapalenia wątroby i paciorkowców.

Potencjalnie duże znaczenie dla rozwoju szczepionek syntetycznych, zawierających nawet bardzo słabe immunogeny ma stwierdzenie znacznego podwyższenia aktywności adiuwantowej MDP przez stosowanie go kowalencyjnie związanego z antygenem wobec monoklonalnych przeciwciał anty-MDP [127].

VI-6. Synergiczne oddziaływanie z innymi chemoterapeutykami

Synergiczne oddziaływanie MDP z TDM stymulujące zarówno bakteryjną odporność niespecyficzną, jak i aktywność przeciwnowotworową i przeciwwirusową zostało już wielokrotnie podkreślone [79, 99, 108, 111, 112]. Muramylopeptydy zwiększają również aktywność wielu chemoterapeutyków o bardzo zróżnicowanym spektrum działania. Stwierdzono między innymi stymulujące działanie MDP i jego analogów na przeciwnowotworową aktywność endotoksyn, umożliwiające całkowitą regresję nowotworu *Meth A fibrosarcoma* u myszy [128—130].

Stosunkowo wcześniej stwierdzono synergiczne oddziaływanie muramylopeptydów z antybiotykami [131—134]. W tabeli 5 przedstawiono współdziałanie MDP-Lys(L18) z różnymi antybiotykami w zwalczaniu infekcji [59].

Tabela 5

Synergiczne oddziaływanie analogu muramylo-dipeptydu-MDP-Lys(L18) z różnymi antybiotykami w leczeniu różnych infekcji myszy

Infekcja myszy	Leczenie	ED ₅₀ , mg/kg
<i>E. coli</i>	Cefazolina	27
”	” +	11
	MDP-Lys(L18), 0,1 mg	
<i>P. aeruginosa</i>	Gentamycyna	4
”	” +	1
	MDP-Lys(L18), 0,1 mg	
<i>S. aureus</i>	Penicylina	6
”	” +	1
	MDP-Lys(L18), 0,1 mg	
<i>C. albicans</i>	Amfoterycyna	7
”	” +	4
	MDP-Lys(L18), 0,1 mg	

Kapsułkowanie w liposomach amfoterycyny B wraz z 6-0-stearoilo-MDP(Abu) znacznie powiększa jej skuteczność w leczeniu infekcji *C. albicans* u myszy [63, 135]. 6-0-stearoilo-MDP(Abu) wykorzystano także do skutecznego leczenia leishmaniozy trzewnej, choroby polegającej na osłabieniu układu immunologicznego w wyniku porażenia makrofagów pierwotniakami. Stosowany tradycyjnie wysokotoksyczny *Glucantime* jest mało skuteczny w leczeniu tej choroby, a stosowany wraz z muramylopeptydem zapewniał 100% wyleczenie zwierząt doświadczalnych

[136]. W innych badaniach opisano synergiczne współdziałanie MDP z γ -interferonem (IFN- γ) w stymulowaniu przeciwnowotworowej aktywności zwierzęcych makrofagów i ludzkich monocytów [137, 138, 139]. Stymulacja ta była jednak gatunkowo zależna. Kapsułkowanie r-IFN- γ z MDP w liposomach zniósło gatunkową specyficzność interferonu w aktywowaniu cytotoksycznej funkcji makrofagów i monocytów [139].

Kilka podanych przykładów wskazuje na niewątpliwe korzyści płynące ze stosowania muramylopeptydów w połączeniu z innymi lekami. W niedalekiej przyszłości należy oczekiwać dalszych przykładów zwiększania możliwości zwalczania chorób o różnym podłożu przy współudziale muramylopeptydów.

VI-7. Własności somnogeniczne

W 1967 r. Miller i w s.p. [140] zauważyli, że płyn mózgowy pobrany od zwierząt pozbawionych przez pewien czas snu wywołuje sen po wstrzyknięciu go innym zwierzętom. Dalsze badania wykazały wywoływanie podobnego somnogenicznego efektu przez acetonowy ekstrakt komórek mózgowych, a także przez substancję wydobytą z moczu [23]. Z moczu ludzkiego wydobyto substancję somnogenicznie czynną i stwierdzono, że jest to muramylopeptyd zawierający kwas muraminowy, alaninę, kwas glutaminowy i diaminopimelinowy w stosunku 1:2:2:1. Po tym odkryciu sprawdzono aktywność somnogeniczną MDP i okazało się, że działa podobnie, lecz wymagana jest dziesięciokrotnie wyższa dawka.

Wyzolowaną z moczu substancję nazwano czynnikiem S lub czynnikiem snu wolnofalowego (SWS factor), ponieważ oddziałuje głównie na fazę snu wolnofalowego, która jak się przypuszcza jest w największym stopniu odpowiedzialna za regenerację organizmu. Czynniki snu wolnofalowego działa podany nie tylko domózgowo i dożylnie, lecz również doustnie, co budzi nadzieję a wyprodukowanie łagodnej i nieszkodliwej pigułki nasennej.

Somnogenicznej aktywności MDP towarzyszy efekt pirogeniczny (czynnik S jest apirogeny), ale przeciwgorączkowy acetamidofenon, znosi efekt pirogeniczny MDP nie zmniejszając jego własności nasennych. Uważa się, że w mózgu muszą znajdować się receptory o bardzo silnym powinowactwie do muramylopeptydów. Jeszcze większą aktywność somnogeniczną niż czynnik S wykazuje prostaglandyna D₂; działa ona już w ilościach femtomolowych [141, 142]. Ponieważ MDP oddziałując na makrofagi uwalnia różne prostaglandyny, można założyć, że muramylopeptydy wpływają na sen poprzez uwalnianie prostaglandyn. Inni autorzy uważają natomiast MDP za częściowego agonistę serotoniny [143, 144].

VII. Podsumowanie

W okresie kilkunastu lat jakie minęły od pierwszej syntezy MDP (1975) i określenia jego immunoregulacyjnej roli zsyntezowano kilkaset jego analogów i odkryto wiele innych biologicznych efektów oddziaływania tych związków oraz wyjaśniono niezwykle ich oddziaływanie na prawidłowe funkcjonowanie organizmów wyższych. Muramylopeptydy okazały się także cennym narzędziem w próbach poznania zależności między centralnym układem nerwowym, a układem odpornościowym.

Dotychczasowe badania niezależnie od ogromnego znaczenia poznawczego wskazały na możliwość praktycznego zastosowania muramylopeptydów. Obecnie, po badaniach klinicznych, znaczenie analogów MDP jako adiuwantów podwyższających skuteczność zarówno szczepionek klasycznych jak i drugiej generacji zyskało powszechne uznanie. Wykrycie przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej aktywności muramylopeptydów stwarza dalsze perspektywy ich szerokiego stosowania w leczeniu.

Zaakceptowano do druku dnia 23 stycznia 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Adam A., Lederer E., (1984), *Medicinal Reviews*, 4, 111—152.
2. Roitt M., (1971), *Essential Immunology*, tłumaczenie polskie (1977), *Podstawy Immunologii*, str. 290, PWN, Warszawa.
3. Ślopek S., (1983), *Ilustrowany Słownik Immunologiczny*, 3 wyd., str. 788, PZWL, Warszawa.
4. Freund J., Sommer H., Walter A., (1945), *Science*, 102, 200—202.
5. Chedid L., Audibert F., Johnson A., (1978), *Prog. Allergy*, 25, 63—105.
6. Lederer E., Adam A., Ciorbaru R., Petit J., Wietzerbin J., (1975), *Mol. Cell. Biochem.*, 7, 87—104.
7. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59, 1317—1325.
8. Merser C., Sinay P., Adam A., (1975), *Res. Commun.*, 66, 1316—1322.
9. Kotani S., Watanabe Y., Kinoshita F., Shimono T., Morisaka I., Shiba T., Kusumota S., Taruni Y., Ikenaka K., (1975), *Biken J.*, 18, 105—111.
10. Kotani S., Watanabe Y., Shimono T., Narita T., Kato K., Stewart-Tull D., Kinoshita F., Yokogawa K., Kowata S., Shiba T., Kusumoto S., Tarumi Y., (1975), *Z. Immunitätsforsch.*, 149S, 302—319.
11. Tanaka A., Saito R., Sugiyama K., Morisaki K., Kotani S., Kusumoto S., Shiba T., (1977), *Infect. Immun.*, 15, 332—334.
12. Souvannavong V., Adam A., Lederer E., (1978), *Infect. Immun.*, 19, 966—971.
13. Chedid L., Lederer E., (1978), *Biochem. Pharmacology*, 27, 2183—2186.
14. Dinarello C., Elin R., Chedid L., Wolff S., (1978), *J. Infect. Dis.*, 138, 760—767.

15. Parant M., Audibert F., Chedid L., Level M., Lefrancier R., Chosy J., Lederer E., (1980), *Infect. Immun.*, **27**, 826—831.
16. Lefrancier P., Derrien M., Jamet X., Choay J., Lederer E., Audibert F., Parant M., Parant F., Chedid L., (1982), *J. Med. Chem.*, **25**, 87—90.
17. Chedid L., Parant M., Audibert F., Riveau G., Parant F., Lederer E., Choay J., Lefrancier P., (1982), *Infect. Immun.*, **35**, 417—424.
18. Telzak E., Wolff S., Dinarello C., Conlon T., Kholy A., Bahr G., Choay J., Morin A., Chedid L., (1986), *J. Infect. Dis.*, **153**, 628—633.
19. Lefrancier P., (1985), *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, **8**, 171—185.
20. Chedid L., (1986), *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.*, **8**, 101—103.
21. Mašek K., (1985), *Int. J. Immunotherapy*, **1**, 177—184.
22. Mašek K., (1986), *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.*, **8**, 97—99.
23. Pappenheimer J., (1983), *J. Physiol.*, **336**, 1—11.
24. Zidek Z., Mašek K., Šedivy F., (1984), *Agents and Actions*, **14**, 72—75.
25. Kadlec O., Mašek K., Gudla O., Ružička V., Parant M., Chedid L., (1984), *Pharmacology*, **29**, 31—39.
26. Lederer E., (1984), International Symposium on Chemistry of Natural Product, Postsymposium IUPAC, Gdańsk, Molecular Aspects of Chemotherapy, **15**.
27. Namba Y., Hidaka Y., Taki K., Morimoto T., (1981), *Infect. Immun.*, **31**, 580—583.
28. Adam A., Devys M., Souvannavong V., Lefrancier P., Choay J., Lederer E., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 339—346.
29. Fukuda T., Kobayashi S., Yukimasa H., Terso S., Fujino M., Shiba T., Saiki I., Azuma I., Yamamura Y., (1981), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 3530—3535.
30. Kobayashi S., Fukuda T., Yukimasa H., Fujino M., Azuma I., Yamamura Y., (1984), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 3182—3196.
31. Kiso M., Kaneda Y., Okumura H., Hasegawa A., (1980), *Carbohydr. Res.*, **79**, C17—C19.
32. Hasegawa A., Okumura H., Kiso M., Azuma I., Yamamura Y., (1980), *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1301—1308.
33. Kiso M., Kaneda Y., Goh Y., Hasegawa A., Azuma I., (1980), *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1971—1973.
34. Abasher Y., Andronova T., Zurabyan S., Khorlin A., (1981), *Bioorg. Chim.*, **7**, 980—984.
35. Zaoral M., Ježek J., Rotta J., (1982), *Coll. Czech. Chem. Comm.*, **47**, 2989—2995.
36. Tsujimoto M., Kinoshita F., Okunaga T., Kotani S., Kusumoto S., Yamamoto K., Shiba T., (1979), *Microbiol. Immunol.*, **23**, 933—936.
37. Duréte P., Meitzner E., Shen T., (1979), *Carbohydr. Res.*, **77**, C1—C4.
38. Kiso M., Goh Y., Tanahashi E., Hasegawa A., Okumura M., Azuma I., (1981), *Carbohydr. Res.*, **90**, C8—C11.
39. Parant M., Damais C., Audibert F., Parant E., Chedid L., Sa-che E., Lefrancier P., Choay J., Lederer E., (1978), *J. Infect. Dis.*, **138**, 378—386.
40. Yapo A., Petit J., Lederer E., Parant M., Parant F., Chedid L., (1982), *Int. J. Immunopharmacol.*, **4**, 143—149.
41. Valinger Z., Ladesic B., Tomasic J., (1982), *Biochem. Biophys. Acta*, **701**, 63—71.

42. Moliner S, Broun V., (1984), *Arch. Microbiol.*, **140**, 171—177.
43. Harrison J., Fox A., (1985), *Infect. Immun.*, **50**, 320—321.
44. Richerson H., Suelzer M., Swanson P., Butler J., Kopp W., Rose E., (1982), *Am. J. Pathol.*, **107**, 409—420.
45. Hiebert C., Kopp W., Richerson H., Barfknecht C., (1983), *J. Med. Chem.*, **26**, 1729—1732.
46. Mozes E., Sela M., Chedid L., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4933—4937.
47. Reichter C., Carelli C., Jolivet M., Audibert F., Lefrancier P., Chedid L., (1980), *Molec. Immun.*, **17**, 357—363.
48. Shiba T., Okada S., Kusumota S., Azuma I., Yamamura Y., (1978), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 3307—3311.
49. Kobayashi S., Fukuda T., Imada I., Fujino M., Azuma I., Yamamura Y., (1979), *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 3193—3196.
50. Azuma I., Sugimura K., Yamawaki M., Uemiya M., Kusumoto S., Okada S., Shiba T., Yamamura Y., (1978), *Infect. Immun.*, **20**, 600—607.
51. Uamiya M., Sugimura K., Kusama T., Saiki I., Yamawaki M., Azuma I., Yamamura Y., (1979), *Infect Immun.*, **24**, 83—89.
52. Inage M., Imoto M., Kambayashi Y., Kusumoto S., Shiba T., (1980), *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3767—3770.
53. Kotani S., Takada H., Tsujimoto M., Kubo T., Ogawa T., Azuma I., Ogawa H., Matsumoto K., Siddiqui W., Tanaka A., Nagao S., Kohashi O., Kanoh S., Shiba T., Kusumoto S., (1982), w *Bacteria and Cancer*, ed. Jeliaszewicz J., Pulver G., Roszkowski W., Academic Press, 67—107.
54. Kobayashi S., Fukuda T., Yukimasa H., Imada I., Fujino M., Azuma I., Yamamura Y., (1980), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 2917—2920.
55. Matsumoto K., Ogawa H., Kusama T., Nagase O., Sawaka N., Inage M., Kusomoto S., Azuma I., (1981), *Infect. Immun.*, **32**, 748—753.
56. Fukuda T., Kobayashi S., Yukimasa H., Tereo S., Fujino M., Shiba T., Saiki I., Azuma I., Yamamura Y., (1981), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 3530—3535.
57. Lefrancier P., Petitou M., Level M., Derrien M., Choay J., Lederer E., (1979), *Int. J. Pept. Protein Res.*, **14**, 437—444.
58. Uemiya M., Saiki I., Kusama T., Azuma I., Yamamura Y., (1979), *Microbiol. Immunol.*, **23**, 821—823.
59. Matsumoto K., Otani T., Une T., Osada Y., Ogawa H., Azuma I., (1983), *Infect. Immun.*, **39**, 1029—1040.
60. Sackmann W., Dietrich F., (1982), *Curr. Chemother. Immunother., Proc. Int. Congr. Chemother., Am. Soc. Microbiol. Washington*, **2**, 1162—1164.
61. Phillips N., Moras M., Chedid L., Petit J., Tenu J., Lederer E., Bernard J., Lefrancier P., (1985), *J. Biol. Resp. Modif.*, **4**, 464—474.
62. Carelli C., Audibert F., Chedid L., (1981), *Infect. Immun.*, **33**, 312—314.
63. Mehta R., Lopez-Berestein G., Hopper R., Mehta K., White R., Juliano R., (1985), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **28**, 511—513.
64. Fidler I., Brown N., Hart I., (1985), *J. Biol. Resp. Modif.*, **4**, 298—309.
65. Chedid L., Parant M., Parant F., Lefrancier P., Choay J., Lederer E., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2089—2093.
66. Masihi K., Brehmer W., Lange W., Werner H., Ribbi E., (1985), *Infection Immun.*, **50**, 938—940.

67. Parant M., Fiveau G., Parant F., Dinarello C., Wolff S., Chedid L., (1980), *J. Infect. Dis.*, **142**, 708—715.
68. Fraser-Smith E., Matthews T., (1981), *Infect. Immun.*, **34**, 676—683.
69. Fraser-Smith E., Waters R., Mathews T., (1982), *Infect. Immun.*, **35**, 105—110.
70. Matsumoto K., Ogawa H., Nagase O., Kusama T., Azuma I., (1981), *Microbiol. Immunol.*, **25**, 1047—1058.
71. Osada Y., Mitsuyama M., Matsumoto K., Une T., Otani T., Ogawa H., Nomoto K., (1982), *Infect. Immun.*, **37**, 1285—1288.
72. Krahenbuhl J., Sharma S., Ferraresi R., Remington J., (1981), *Infect. Immun.*, **31**, 716—722.
73. Osada Y., Mitsuyama M., Une T., Matsumoto K., Otani T., Satoh M., Ogawa H., Nomoto K., (1982), *Infect. Immun.*, **37**, 392—399.
74. Humphers R., Henika P., Ferraresi R., Krahenbuhl J., (1980) *Infect. Immun.*, **30**, 462—466.
75. Kierszenbaum F., Ferraresi R., (1979), *Infect. Immun.*, **25**, 273—278.
76. Silverman D., Krueger J., Karnowsky M., (1986), *J. Immunol.*, **138**, 2195—2201.
77. Dietrich F., Lukas B., Schmidt-Rupin K., (1983), 13th Intern. Congress of Chemotherapy, Vienna, Abstract, 2.
78. Lukas B., Schmidt-Rupin R., Dietrich F., (1983), Intern. Symp. on Immunomodulation by Chemically Defined Adjuvants, Sapporo, Proc., 42.
79. Masihi K., Brehmer W., Azuma I., Lange W., Müller S., (1984), *Infect. Immun.*, **43**, 233—237.
80. Ikeda S., Negishi T., Nishimura C., (1985), *Antiviral Res.*, **5**, 207—215.
81. Ikeda S., Matsuda Y., Nishimura C., (1985), *Antiviral Res.*, **5**, 345—353.
82. Masihi K., Lange W., Rohde-Schulz B., Chedid L., Jolivet M., (1985), *Infect. Immun.*, **50**, 146—151.
83. Hotta M., Sanchez L., Takada H., Homma M., Kotani S., (1985), *Microbiol. Immunol.*, **29**, 533—541.
84. Old L., Clarke D., Benacerraf B., (1959), *Nature*, **184**, 291—292.
85. Lemonde P., Clode M., (1966), *Cancer Res.*, **26**, 585—589.
86. Baldwin R., Pimm M., (1973), *Int. J. Cancer*, **12**, 420—428.
87. Holmes E., Morton D., Eilbert F., (1977), *West. J. Med.*, **126**, 102—109.
88. Baldwin R., Pimm, M., (1978), *Adv. Cancer. Res.*, **28**, 91—147.
89. Sone S., Fidler I., (1981), *Cell. Immunol.*, **57**, 42—50.
90. Sone S., Tsubura E., (1983), *J. Immunol.*, **129**, 1313—1355.
91. Matter A., (1979), *Cancer Immunol. Immunother.*, **6**, 201—210.
92. Reisser D., Jeannin J., Lagadec F., Martin F., (1985), *J. Biol. Resp. Modif.*, **4**, 460—463.
93. Yamamura Y., Azuma I., Sugimura K., Yamawaki M., Uemiya M., Kusumoto S., Okada S., Shiba T., (1977), *Proc. Jpn. Acad.*, **53**, 63—66.
94. Kusumoto S., Inage M., Shiba T., Azuma I., Yamamura Y., (1978), *Tethahedron Lett.*, 4899—4902.
95. Tanio Y., Souma H., Tokushima Y., Yamamura Y., Azuma I., (1983), *Gann.*, **74**, 192—195.
96. Eggers A., Tarmin L., Ginsburg S., (1982), *Cancer Immunol. Immunother.*, **12**, 167—173.
97. Fidler I., Sone S., Fogler W., Barnes Z., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1680—1684.

98. Fidler I., (1981), *J. Immunol.*, **127**, 1719—1720.
99. McLaughlin C., Schwartzman S., Horner B., Jones G., Mof-fatt J., Nestor J., Tegg D., (1980), *Science*, **208**, 415—416.
100. Phillips N., Paraf A., Bahr G., Chedid L., (1983), *Int. J. Immunopharmacol.*, **5**, 219—227.
101. Tenu J., Lederer E., Petit J., (1980), *Eur. J. Immunol.*, **10**, 647—653.
102. Fidler I., Schroit A., (1984), *J. Immunol.*, **133**, 515—518.
103. Phillips N., Moras M., Chedid L., Petit J., Tenu J., Lederer E., Bernard J., Lefrancier P., (1985), *J. Biol. Resp. Med.*, **4**, 464—475.
104. Phillips N., Moras M., Chedid L., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 128—134.
105. Talmage J., Herberman R., (1986), *Cancer Treatm. Reports*, **70**, 171—181.
106. Audibert F., Chedid L., Hannoun C., (1977), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **285**, serie D, 467—470.
107. Webster R., Glezen W., Hannoun C., Laver W., (1977), *J. Immunol.*, **119**, 2073—2077.
108. Masihi K., Brehmer W., Lange W., Ribi E., (1983), *Int. J. Immunopharmacol.*, **5**, 403—410.
109. Reese R., Trager W., Jensen J., Miller D., Tantravahi R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5665—5668.
110. Siddiqui W., Taylor D., Kan S., Kramer K., Richmond-Crum S., Kotani S., Shiba T., Kusumoto S., (1978), *Science*, **201**, 1237—1239.
111. Woodard L., Toone N., McLaughlin C., (1980), *Can. J. Comp. Med.*, **44**, 456—458.
112. Woodard L., Toone N., McLaughlin C., (1980), *Infect. Immun.*, **30**, 409—412.
113. Morisaki I., Michałek S., Harmon C., Torii M., Hamada S., McGhee J., (1983), *Infect. Immun.*, **40**, 577—591.
114. Audibert F., Przewłocki G., Lefrancier P., Choay J., Chedid L., (1982), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **295**, 611—614.
115. Audibert F., Przewłocki G., LeClerc C., Jolivet M., Gras-Masse H., Tartar A., Chedid L., (1984), *Infect. Immun.*, **45**, 261—266.
116. Telzak E., Wolf S., (1986), *J. Infect. Dis.*, **153**, 628—635.
117. Arnon R., (1980), *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**, 593—618.
118. Sela M., (1983), *Biopolymers*, **22**, 415—424.
119. Audibert F., Jolivet M., Chedid L., Alouf J., Boquet P., Rivaille P., Siffert O., (1981), *Nature*, **289**, 593—594.
120. Audibert F., Jolivet M., Chedid L., Arnon R., Sela M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5042—5046.
121. Chedid L., Audibert F., (1985), *Springer Semin. Immunopathol.*, **8**, 401—412.
122. Nash H., Chang C., Tsong Y., (1985), *J. Reprod. Immunol.*, **7**, 151—162.
123. Chang C., Tsong Y., Nash H., (1985), *J. Reprod. Immunol.*, **7**, 163—169.
124. Carelli C., Audibert F., Gaillard J., Chedid L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5392—5395.
125. Carelli C., Ralamboranto L., Audibert F., Gaillard J., Briquet N., Dray F., Fafeur V., Haour F., Chedid J., (1985), *Int. J. Immunopharmac.*, **7**, 215—224.
126. Chedid L., Jolivet M., Audibert F., Przewłocki G., Beachey I., Gras-Masse H., Tartar A., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 908—915.
127. Bahr G., Tello D., Chedid L., (1985), *Infect. Immun.*, **49**, 312—319.

128. Bloksma N., Hofhuis F., Willers J., (1984), *Cancer Lett.*, **23**, 159—165.
129. Bloksma N., Hofhuis F., Willers J., (1984), *Cancer Immunol. Immunother.*, **17**, 154—159.
130. Bloksma N., Hofhuis F., Willers J., (1985), *Cancer Immunol. Immunother.*, **19**, 205—210.
131. Sackmann W., Dietrich F., (1980), Intern. Symposium on Infections in the Immunocopromised Host, Veldhoven, The Nitherlands, Abstracts **27**, 44.
132. Fraser-Smith, Matthews T., (1981), *Infect. Immun.*, **34**, 676—683.
133. Osada Y., Ohtani T., Une T., Ogawa H., Nomoto K., (1982), *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 2361—2370.
134. Osada Y., Mitsuyama M., Une T., Matsumoto K., Ohtani T., Satoh M., Ogawa H., Nomoto K., (1982), *Infect. Immun.*, **37**, 292—300.
135. Mehta R., Lopez-Berestein G., Hopfer R., Mills K., Juliano R., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **770**, 230—234.
136. Adinolfi L., Bonventre P., Pas M., Eppstein D., (1985), *Infect. Immun.*, **48**, 409—416.
137. Saiki I., Sone S., Fogler W., Kleinerman E., Lopez-Berestein G., Fidler I., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 6188—6193.
138. Sone S., Lopez-Berestein G., Fidler I., (1986), *Cancer Immunol. Immunother.*, **21**, 93—99.
139. Fidler I., Fogler W., Kleinerman E., Saiki I., (1985), *J. Immunol.*, **135**, 4289—4296.
140. Miller T., Goodrich C., Pappenheimer J., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 513—517.
141. Ueno R., Ishikawa Y., Nakayama T., Hayaishi O., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 576—582.
142. Ueno R., Honda K., Inoue S., Haysishi O., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1735—1737.
143. Root-Bernstein R., Westall F., (1983), *The Lancet*, **1**, 653.
144. Mašek K., Kadlec O., (1983), *The Lancet*, **6**, 1277.

MARIA WARWAS*, GRZEGORZ SAWICKI**

Cystatyny

The cystatins

Spis treści

- I. Wprowadzenie**
- II. Klasyfikacja cystatyn**
- III. Rozmieszczenie w tkankach i lokalizacja komórkowa**
- IV. Właściwości fizykochemiczne**
- V. Oddziaływanie cystatyn z proteinami**
- VI. Rola fizjologiczna**
- VII. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Classification of cystatins**
- III. Distribution and tissue localisations**
- IV. Physiochemical properties**
- V. Interaction of cystatins and proteinases**
- VI. Physiological function**
- VII. Concluding remarks**

I. Wprowadzenie

W wewnątrzkomórkowej degradacji białek bardzo ważną rolę odgrywają lizosomalne proteinazy cysteinowe, należące do hydrolaz wiązania peptydowego i zawierające w swoim centrum aktywnym cysteinę (E. C. 3.4.22.-). Do ssaczych enzymów tej grupy należy katepsyna B, najlepiej poznana, oraz katepsyny H, L, i N. Poznanie ważnej roli proteinaz cysteinowych spowodowało zainteresowanie się ich specyficznymi endogennymi inhibitorami. W ciągu ostatnich 10 lat poczyniono znaczne postępy w badaniach nad tymi inhibitorami, wśród których dużą grupę stanowią inhibitory niskocząsteczkowe nazywane cystatynami.

* Doc. dr hab., ** mgr, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej, ul. Szewska 38/39, 50-139 Wrocław

Inhibitory proteinaz cysteinowych są szeroko rozpowszechnione, występują u ssaków, ptaków, płazów, ryb oraz u pierwotniaków, a także u roślin [1]. Początkowo, gdy używano do badań enzymu modelowego, jakim jest papaina sądzono, że niskocząsteczkowe inhibitory proteinaz cysteinowych występują jedynie w tkankach. Użycie do badań katepsyn B i H pozwoliło na stwierdzenie ich obecności również we krwi i płynach ustrojowych [2]. W surowicy krwi występują także inhibitory o wyższej masie cząsteczkowej (powyżej 60 kD) hamujące proteinazy cysteinowe, są to α_2 -makroglobulina i α -inhibitor proteinaz cysteinowych, który okazał się kininogenem [3].

II. Klasyfikacja cystatyn

Na początku lat osiemdziesiątych wyodrębniono dwie grupy tkankowych niskocząsteczkowych inhibitorów proteinaz cysteinowych, typu kwaśnego (pI 4.7—5.0) oraz typu obojętnego (pI 6.0—6.5) [4]. Badania następnych lat pozwoliły na wyodrębnienie trzeciej grupy typu alkalicznego (pI 8.0—9.5), obejmującej inhibitory występujące w płynach ustrojowych [2, 5, 6]. Znaczne podobieństwa w strukturze pierwszorzędowej i właściwościach pozwalają sądzić, że są to białka blisko ze sobą

Tabela 1

Inhibitory proteinaz cysteinowych (tiolowych) ludzkich tkanek i płynów ustrojowych

Źródło inhibitora	pI	Cystatyna [7]	Synonim	Písmienictwo
Epiderma	4.6—4.9			8
	5.1	A		9
Wątroba	4.5	A		
	6.25—6.35	B		10
Śledziona	4.7, 5.0	A	Typ kwaśny	
	5.9, 6.4	B	Typ alkaliczny	4
Granulocyty	4.65, 4.95	A	Stefina	11
Migdałki	5.0	A		
podniebienne	6.0, 6.5	B		12
Łożysko	5.1—	A		
	6.4	B		13, 14
Płyn owodniowy	5.2—7.8	A+B+C?		15
Surowica patologiczna	8.0	C	Ludzka cystatyna	5
Mocz patologiczny	9.5	C	γ -trace	16, 17
Nasienie	4.7—5.0	A?	Inh.-A	18
	9.5	C	Inh.-B	19
Ślina	4.5—8.2			20
	4.68	S		21
	7.5	SN		22

spokrewnione. Barrett [7] zaproponował zaliczenie ich do wspólnej rodziny i nazwanie „cystatynami”. W (Tab. 1) zestawiono właściwości ludzkich inhibitorów proteinaz cysteinowych, ich punkty izoelektryczne, klasyfikację wg Barretta [7], oraz synonimy spotykane w literaturze (Tab. 1).

Z wątroby ludzkiej wyizolowano dwa różniące się immunologicznie inhibitory nazywane cystatynami A i B [10]. Po zbadaniu ich właściwości i sekwencji aminokwasowej stwierdzono, że cystatyna A jest identyczna z wcześniej wyizolowanym inhibitorem z granulocytów [11] oraz inhibitorem z śledziony określanym jako inhibitor kwaśny [4]. Cystatyna B okazała się identyczna z neutralną formą inhibitora z śledziony [4]. Z surowicy krwi pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi oczyszczono inhibitor o sekwencji aminokwasowej identycznej z sekwencją białka znanego pod nazwami: γ -trace, gamma-CSF lub post- γ -globulina. Białko to nazwano cystatyną C [17]. Podobne do cystatyny C niskocząsteczkowe inhibitory proteinaz cysteinowych stwierdzono w fizjologicznej surowicy szczura [23], wołu [24] i człowieka [2, 25]. Różnią się one od cystatyny C tym, że słabo hamują katepsynę B, a ludzki inhibitor nie hamuje ani papainy ani ficyny [2]. Inhibitory proteinaz cysteinowych wyizolowane z śliny nazwano cystatynami S i SN [21, 22].

Inhibitory występujące u zwierząt mają w większości niższe punkty izoelektryczne, ale podobne właściwości i znaczną homologię sekwencyjną z cystatynami ludzkimi, co obrazuje (Tab. 2).

Tabela 2

Cystatyny zwierzęce

Źródło inhibitora (nazwa)	pI	Homologia sekwencyjna z cystatynami ludzkimi	Piśmiennictwo
Epiderma szczura (forma α)	4.3	58% z cystatyną A	9, 26
Wątroba szczura (forma β)	5.0		
	5.2	79% z cystatyną B	24—30
Mięśnie szkieletowe wołu	5.5		
	6.2	?	31
Białko jaja kurzego (cystatyna)	5.6		
	6.5	44% z cystatyną C	16, 32, 33, 30
Mięśnie szkieletowe kury	6.7		
	6.9	?	34
Siara bydłęca	10.0	59% z cystatyną C	35, 36

III. Rozmieszczenie w tkankach i lokalizacja komórkowa

Różnice w właściwościach antygenowych poszczególnych cystatyn pozwoliły na opracowanie czułych enzymoimmunologicznych metod oznaczeń ich stężenia w poszczególnych tkankach i płynach ustrojowych [17,

37]. Okazało się, że rozmieszczenie w tkankach zależy od gatunku ssaka [37].

W tabeli 3 zebrano wyniki badań nad lokalizacją komórkową cystatyn prowadzonych z pomocą technik immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych.

Tabela 3

Lokalizacja komórkowa cystatyn

Inhibitor	Lokalizacja	Piśmiennictwo
Cystatyna A	Komórki nabłonkowe	12
	Komórki dendryczne	12, 38
	Granulocyty obojętne	39, 40
	Komórki parenchymalne (człowiek)	39
	Monocyty	12
Cystatyna B	Komórki nabłonkowe	12
	Makrofagi	39
	Komórki Kupfera (szczur)	39
	Limfocyty	40
	Histocyty	12
Cystatyna C	Komórki neurosekcyjne	
	Komórki A trzustki	
	Komórki C tarczycy	17

Z przedstawionych danych wynika, że rozmieszczenie poszczególnych cystatyn tak w tkankach, jak i w komórkach jest różne, co odzwierciedla ich specyficzne funkcje biologiczne.

IV. Właściwości fizykochemiczne

Cystatyny są białkami niskocząsteczkowymi, o masie cząsteczkowej 11 000—13 000 Da. Punkty izoelektryczne ludzkich cystatyn A, B i C określone za pomocą chromatogniskowania wynoszą odpowiednio 5.2, 8.2 i 9.5. Odpowiedniki zwierzęce mają nieco niższe punkty izoelektryczne. Białka te mogą występować pod postacią form molekularnych, o różnych punktach izoelektrycznych (Tab. 1 i 2).

Cystatyny są białkami o dużej termo- i pH-stabilności. Na przykład, ludzkie cystatyny A i B z wątroby są trwale zarówno przy pH 2 jak i przy pH 12 oraz 80°C [10]; cystatyna białka jaja kurzego nie traci aktywności nawet po ogrzaniu do 100°C [41]. Jedynie inhibitor z mięśni wołu jest niestabilny w kwaśnym pH [31].

Ustalono sekwencję aminokwasową cystatyny B z wątroby ludzkiej [30]. Białko to składa się z 98 aminokwasów i wykazuje 79% homologii

sekwencyjnej z inhibitorem wątroby szczura (forma β). Masa cząsteczkowa obliczona ze składu aminokwasowego wynosi 11 175 Da. Cystatyna B zawiera jedną resztę cysteiny i ma zdolność tworzenia agregatów, co może tłumaczyć jej heterogenność w izoelektrycznym ogniskowaniu. Inhibitor oczyszczony z zastosowaniem chromatogniskowania jest homogeny i nie zawiera ani dimerów ani produktów degradacji [10]. Szczurza cystatyna B (β) zawiera dwie reszty cysteinowe, z których tylko jedna, Cys-3, jest istotna dla aktywności inhibitorowej [29].

Cystatyna A również składa się z 98 aminokwasów, lecz nie zawiera cysteiny [42]. Masa cząsteczkowa obliczona ze składu aminokwasowego wynosi 11 006 Da.

Cystatyny A i B występujące w cytosolu komórkowym nie zawierają wiązań dwusiarczkowych, co zabezpiecza ich stabilność w warunkach redukujących cytosolu. Najwięcej homologicznych aminokwasów występuje w fragmencie 46—75, w którym znajduje się najprawdopodobniej centrum aktywne [30].

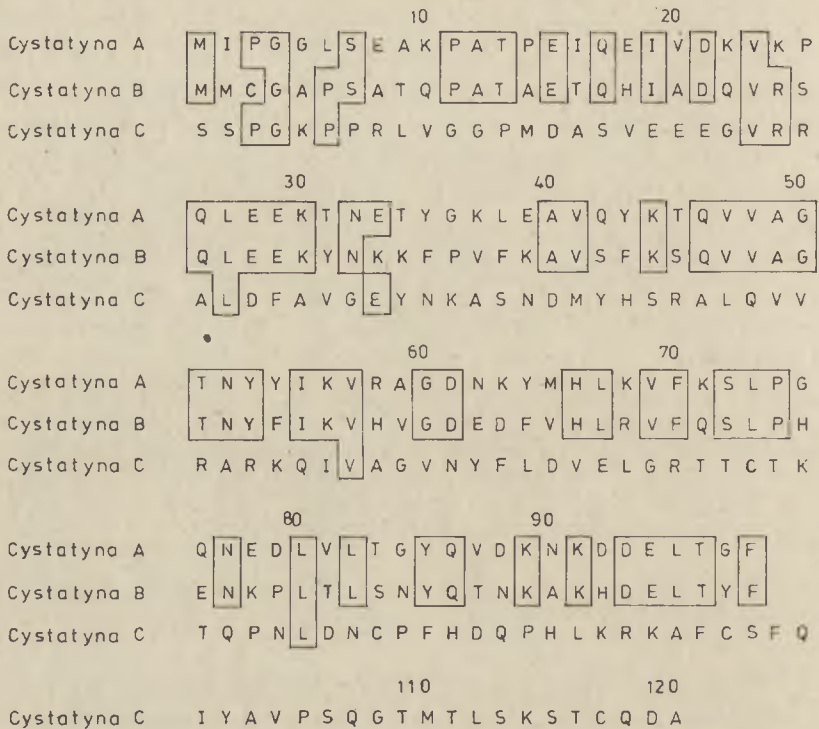
Ludzka cystatyna C zbudowana jest z jednego łańcucha polipeptydowego złożonego z 120 aminokwasów, w odróżnieniu od omawianych wyżej zawiera dwa mostki dwusiarczkowe [43]. Mostki te stabilizują natywną konformację cząsteczki. Cystatyna ta wykazuje znaczny stopień homologii sekwencyjnej z białkiem jaja kurzego (Tab. 2) zawierającym także dwa mostki dwusiarczkowe. Wykazano, że w cystatynie białka jaja kurzego przeważa struktura β , zaś struktura α -heliks stanowi jedynie 20% [33]. Znaczne podobieństwo do kurzej cystatyny C wykazuje także inhibitor z siary wołu zbudowany z 120 aminokwasów, zawierający dwa mostki dwusiarczkowe, ale cechujący się wyższym punktem izoelektrycznym [35, 36].

Inhibitory proteinaz cysteinowych śliny ludzkiej i ślinianek, cystatyny S i SN są ze sobą immunologicznie spokrewnione. Ich struktura pierwszorzędowa wykazuje około 50% homologii z ludzką cystatyną C [22, 44], punkty izoelektryczne są niższe (Tab. 1). Cystatyna SN zawiera 10 aminokwasów więcej niż cystatyna S [22].

Porównanie sekwencji aminokwasowej ludzkich cystatyn przedstawia (Ryc. 1).

Sekwencja aminokwasowa cystatyn wskazuje na ich ewolucyjne pokrewieństwo. Inhibitory te wywodzą się od jednego nieznanego białka prekursorowego. Niektórzy badacze wyróżniają inhibitory zawierające wiązania S-S, nazywane cystatynami, oraz inhibitory nie zawierające takich wiązań, nazywane stefinami. W obrębie tej drugiej grupy można wyróżnić białka zawierające lub nie zawierające cysteiny [45].

Porównując sekwencję aminokwasową ludzkiego niskocząsteczkowego kininogenu z sekwencją znanych cystatyn, wykazano, że łańcuch ciężki kininogenu zbudowany jest z trzech domen o sekwencji podobnej do



Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowej ludzkich cystatyn [16, 30]. Identyczne aminokwasy ujęto w ramki.

cystatyn [3, 46]. Jedynie domeny 2 i 3 wykazują aktywność inhibitorową. Domena 2 hamuje kalpapainę — proteinazę cysteinową aktywowaną jonami Ca^{2+} , oraz papainę i katepsynę L, zaś domena 3 hamuje silnie papainę i katepsynę L, a bardzo słabo kalpapainę [46].

V. Oddziaływanie cystatyn z proteazami

Ogólnie można powiedzieć, że cystatyny hamują na ogół proteinyz cysteinowe z superrodziny papainowej oraz egzopeptydazę, peptydazę I dipeptydylową (katepsynę C). Hamują więc takie enzymy roślinne jak: papaina, chymopapaina, ficyna oraz homologiczne proteinyz lizosomalne katepsyny B, H i L. Wiążą się z karboksymetylowaną papainą, co zostało wykorzystane do ich izolowania. Cystatyny nie hamują bromelainy, kalpains ani proteinyz serynowych, aspartylowych oraz metaloproteinyz [7].

Poszczególne cystatyny różnią się powinowactwem do hamowanych enzymów. Stałe Michaelisa reakcji ludzkich cystatyn z katepsynami i papainą podaje (Tab. 4).

Spośród badanych enzymów cystatyny A i B najslabiej hamują katepsynę B, przy czym cystatyna B jest około 10-krotnie słabszym inhibitorem katepsyny B niż cystatyna A. Cystatyna C natomiast jest najsilniejszym inhibitorem papainy i katepsyny L spośród poznanych inhibitorów. Wartości stałych kinetycznych reakcji cystatyny C z proteinazami cysteinowymi pozwalają sądzić, że jest to inhibitor o dużym znaczeniu fizjologicznym [16].

Tabela 4

Wartości K_i (nanomole) reakcji hamowania proteaz cysteinowych przez ludzkie cystatyny [10, 16].

Enzym	Cystatyna A	Cystatyna B	Cystatyna C
Papaina	0.019	0.12	0.005
Katepsyna B	8.2	73.0	0.25
Katepsyna H	0.31	0.58	0.28
Katepsyna L	1.3	0.23	0.005
Dipeptydylopeptydaza I	33.0	0.23	3.5

Badając interakcję cystatyny białka jaja kurzego z proteinazami cysteinowymi stwierdzono podobieństwo do reakcji aprotyniny z proteinazami serynowymi. Reakcja jest odwracalna, a hamowanie ma charakter kompetycyjny [10, 47]. Na ogół białkowe inhibitory endopeptydaz nie hamują egzopeptydaz, cystatyny natomiast hamują peptydazę I dipeptydylową. Sądzono, że w cząsteczce cystatyny istnieją odrębne miejsca wiążące dla proteinazy i egzopeptydazy, okazało się jednak, że papaina i peptydazę I dipeptydylową konkurują o to samo miejsce wiążące w cząsteczce inhibitora [47]. Jest to zrozumiałe w świetle doniesień o homologii peptydazy I dipeptydydowej z enzymami rodziny papainowej [7]. Kompleks cystatyna-proteinaza dysocjuje w warunkach denaturujących bez udziału czynników redukujących, nie jest więc tworzony z udziałem wiązań kowalencyjnych typu S-S [29].

Autorom nie udało się stwierdzić oznak proteolitycznej modyfikacji inhibitora po dysocjacji kompleksu.

Istotna dla aktywności inhibitora wątroby szczura jest wolna reszta cysteinowa [29]. Uważa się jednak, że nie bierze ona bezpośredniego udziału w reakcji z enzymem a tylko oddziałuje sferycznie, ponieważ inne cystatyny, nie zawierające cysteiny też są aktywnymi inhibitorami.

Cystatyny S i SN różnią się powinowactwem do hamowanych enzymów, cystatyna SN jest silniejszym inhibitorem papainy i katepsyny C niż cystatyna S [22].

VI. Rola fizjologiczna

Fizjologiczne znaczenie cystatyn znamy tylko fragmentarycznie. Wiadomo, że proteinyzazy cysteinowe, takie jak katepsyny B, H i L, hamowane przez cystatyny występują w lizosomach, podczas gdy cystatyny A i B w cytosolu komórki [39], zaś cystatyna C w płynach ustrojowych oraz wyspecjalizowanych komórkach neurowydzielniczych i innych [17]. Rola cystatyn, jako endogennych inhibitorów, ma polegać na unieczynnieniu proteinaz cysteinowych w przypadkach, gdy te przedostaną się z systemu lizosomalnego do cytoplazmy lub płynów ustrojowych. Może to mieć miejsce po uszkodzeniu lub śmierci komórki [48]. Cystatyny biorą także udział w obronie organizmu przed infekcją przez wirusy, bakterie i pierwotniaki wykorzystujące enzymy mające w swoim centrum katalitycznym cysteinę [10]. Śródskórna iniekcja katepsyny L powoduje reakcję zapalną i obniżenie stężenia cystatyny w komórkach epidermalnych w miejscu iniekcji [49]. Wykazano, że cystatyna białka jaja kurzego może przechodzić przez błonę komórkową do cytoplazmy i hamować działanie proteinaz cysteinowych poliovirusa w hodowli komórek HeLa [50]. Obecność cystatyny A w wypustkach retikulum migdałków podniebiennych świadczy także o jej udziale w obronności organizmu [38].

Stężenie cystatyny C w surowicy wzrasta znacznie u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi [5] oraz w moczu pacjentów z uszkodzeniem nerek [17]. W przypadku wrodzonej angiopatii mózgowej z amyloidozą stwierdza się złogi zawierające białko o strukturze podobnej do cystatyny C. Białko to jest krótsze od cystatyny C o 10 aminokwasów, a w pozostałym fragmencie różni się jednym aminokwasem. Przypuszcza się, że białko to jest odpowiedzialne za anomalię prowadzącą do powstania złogów amyloidowych [51]. W płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z tym schorzeniem poziom cystatyny C jest obniżony [17].

Wykazano, że podobny do katepsyny B enzym wydzielany jest przez komórki i skrawki tkanek nowotworowych w warunkach hodowli *in vitro*, a aktywność enzymu w tkance koreluje dodatnio z ilością przerzutów w przypadku wielu nowotworów doświadczalnych u zwierząt [52]. Inhibitory z śledziony i leukocytów hamując proteinyzazy nowotworowe zmniejszają rozprzestrzenianie się nowotworów płuc u myszy [53].

Pewne stany patologiczne mięśni, takie jak dystrofia czy nieprawidłowy wzrost, są wynikiem zwiększonego katabolizmu białek [54]. Niskocząsteczkowy inhibitor z mięśni kury hamuje degradację miozyny przez katepsynę L w warunkach *in vitro* [31].

VII. Uwagi końcowe

Cystatyny, niskocząsteczkowe inhibitory proteinaz cysteinowych, zaliczane do odrębnej ewolucyjnie superrodziny, są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Mechanizm hamowania proteinaz przez cystatyny wydaje się być podobny do stwierdzonego w przypadku proteinaz serynowych. Badania nad cystatynami mają zarówno aspekt teoretyczny jak i praktyczny, gdyż w niektórych chorobach lizosomalne proteinazy mogą mieć wpływ na postęp choroby [55]. Poznanie udziału cystatyn w regulacji aktywności proteaz cysteinowych, jak i opracowanie czułych metod oznaczeń, zarówno wolnych inhibitorów, jak i ich kompleksów z enzymami, ważne jest ze względu na przydatność diagnostyczną. Obecnie oznaczanie cystatyny C w płynie mózgowo-rdzeniowym stosuje się w przypadku pacjentów z chorobami neurologicznymi, zaś w moczu w przypadku pacjentów z uszkodzeniami nerek [17]. Poziom cystatyny C jest doskonałym miernikiem filtracji kłębkowej nerek [56].

Praca była finansowana z Centralnego Problemu Badawczo Rozwojowego 3.13.6.1.9.

Zaakceptowano do druku dnia 31 stycznia 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Lenney J. F., Tolan J. R., Sugai W. J., Lee A. G., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **101**, 153—161.
2. Lenney J. F., Liao J. R., Sugg S. L., Gapalakrishan V., Wong H. C. W., Ouye K. H., Chan P. W. H., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1581—1587.
3. Müller-Esterl W., Iwanaga S., Nakanishi S., (1968), *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 336—339.
4. Järvinen M., Rinne A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **708**, 210—217.
5. Brzin J., Popovic T., Turk V., Borchart U., Machleidt W., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 103—109.
6. Minakata K., Asano M., (1984), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **365**, 399—403.
7. Barrett A. J., (1985) w *Intracellular Protein Catabolism*, red. Khairallah E., Bond J. S., Bird J. W., t. 5 str. 105—116; A. R. Liss Inc., New York.
8. Järvinen M., (1978), *J. Invest. Dermatol.*, **71**, 114—118.
9. Ohtani O., Fukuyama K., Epstein W. L., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **707**, 21—27.
10. Green G. D., Kembhavi A. A., Davies M. E., Barrett A. J., (1984), *Biochem. J.*, **218**, 939—946.
11. Brzin J., Kopitar M., Turk V., Machleidt W., (1983), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 1475—1480.
12. Rinne A., Järvinen M., Dorn A., Alavaikko M., Jokinen K., Hopsu-Havu V. K., (1986), *Anat. Anzeiger*, **161**, 215—230.

13. Warwas M., Sawicki G., (1985), *Placenta*, **6**, 455—463.
14. Warwas M., Sawicki G., w przygotowaniu do druku.
15. Rohrllich S., T., Levy H., Rifkin D. B., (1985), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **366**, 147—155.
16. Barrett A. J., Davies M. E., Grubb A., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 631—636.
17. Grubb A., Löfberg H., (1985), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **45**, Suppl. **177**, 7—13.
18. Minakata K., Asano M., (1985), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **366**, 15—18.
19. Minakata K., Asano M., Yonekawa O., (1986), *Clin. Biochem.*, **19**, 171—174.
20. Minakata K., Asano M., (1984), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **365**, 399—403.
21. Isemura S., Saitoh E., Ito S., Isemura M., Sanada K., (1984), *J. Biochem.*, **96**, 1311—1314.
22. Isemura S., Saitoh E., Sanada K., (1985), *FEBS Lett.*, **198**, 145—149.
23. Iwata D., Hirado M., Niinobe M., Fujii S., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1525—1531.
24. Hirado M., Niinobe M., Fujii S., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **757**, 196—201.
25. Gauthier F., Pagano M., Esnard F., Mouray H., Engler R., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 449—455.
26. Takio K., Kominami E., Bando Y., Katunuma N., Titani K., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 149—154.
27. Kominami E., Wakamatsu N., Katunuma N., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 14648—14652.
28. Takio K., Kominami E., Wakamatsu N., Katunuma N., Titani K., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 902—908.
29. Wakamatsu N., Kominami E., Takio E., Katunuma N., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13832—13838.
30. Ritonja A., Machleidt W., Barrett A. J., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 1187—1192.
31. Bige L., Ouali A., Valin C., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **843**, 269—275.
32. Anastasi A., Brown M. A., Kembhavi A. A., Nicklin M. J., Sayers C. A., Sunter D. C., Barrett A. J., (1983), *Biochem. J.*, **211**, 129—138.
33. Schwabe C., Anastasi A., Crow H., Mc Donald J. K., Barrett A. J., (1984), *Biochem. J.*, **217**, 813—817.
34. Wood L., Yorke G., Roisen F., Bird J. W., (1985) w *Intracellular Protein Catabolism*, red. Khairallah E., Bond J. S., Bird J. W., t. 5, str. 81—90; A. R. Liss Inc., New York.
35. Hirado M., Niinobe M., Fujii S., (1984), *J. Biochem.*, **96**, 51—58.
36. Hirado M., Tsunasawa S., Sakiyama F., Niinobe M., Fujii S., (1985), *FEBS Lett.*, **186**, 41—45.
37. Kominami E., Bando Y., Wakamatsu N., Katunuma N., (1984), *J. Biochem.*, **96**, 1437—1442.
38. Alvaikko M., Rinne A., Järvinen M., Jokinen K., Hopsu-Havu V. K., (1985), *Acta Histochem.*, **77**, 1—6.
39. Katunuma N., Kominami E., (1985) w *Intracellular Protein Catabolism*, red. Khairallah E., Bond J. S., Bird J. W., t. 5, str. 71—79; A. R. Liss Inc., New York.
40. Davies M. E., Barrett A. J., (1984), *Histochem.*, **80**, 373—377.
41. Fossum K., Whitaker J. R., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 367—375.

42. Machleidt W., Borchart U., Fritz H., Brzin J., Ritonja A., Turk V., (1983) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 1481—1486.
43. Grubb A., Löfberg H., Barrett A. J., (1984), *FEBS Lett.*, **170**, 370—374.
44. Isemura S., Saitoh E., Sanada K., (1984), *J. Biochem.*, **96**, 489—498.
45. Turk V., Brzin J., Lenarčič B., Ločnikar P., Popovič T., Ritonja A., Babnik J., Bode W., Machleidt W., (1985), w *Intracellular Protein Catabolism*, red. Khairallah E., Bond J. S., Bird J. W., t. 5, str. 91—103; A. R. Liss Inc., New York.
46. Salvesen G., Parkes C., Abrahamson M., Grubb A., Barrett A. J., (1986), *Biochem. J.*, **234**, 429—434.
47. Nicklin M. J., Barrett A. J., (1984), *Biochem. J.*, **223**, 245—253.
48. Gordon S. G., Cross R. A., (1981), *J. Clin. Invest.*, **67**, 1665—1671.
49. Hibino T., Fukuyama K., Epstein W. L., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 440—447.
50. Korant B. D., Brzin J., Turk V., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 1072—1076.
51. Ghiso J., Pons-Estel B., Frangione B., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 548—554.
52. Sloane B. F., Honn K. V., (1984), *Cancer Metastasis Rev.*, **3**, 249—263.
53. Giralaldi T., Sava G., Kopitar M., Brzin J., Suhar A., Turk V., (1981), *Eur. J. Clin. Oncol.*, **17**, 1301—1306.
54. Millward D. J., Bates P. C., Brown J. G., Rosochacki S. R., Rennie M. J., (1980) w *Protein Degradation in Health and Disease*, red Evered D., Whelan J., str. 307—329; Excerpta Medica, Amsterdam.
55. Lenney J. F., (1981), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **17**, 25—57.
56. Grubb A., Simonsen O., Sturfelt G., Truedsson L., Thysell H., (1985). *Acta Med. Scand.* **218**, 499—503.

HANNA JAŃSKA *

Regulacja aktywności enzymów poprzez tworzenie mieszanych dwusiarczków białkowych

Regulation of enzyme activity by the formation of protein-mixed disulfides

Spis treści

- I. Wprowadzenie**
- II. Reakcje prowadzące do powstania mieszanych dwusiarczków białkowych**
 - II-1. Enzym w postaci zredukowanej**
 - II-2. Enzym w postaci utlenionej**
- III. Zawartość mieszanych dwusiarczków białkowych w tkankach**
- IV. Enzymy katalizujące powstawanie mieszanych dwusiarczków białkowych**
- V. Drogi prowadzące do wzrostu stężenia mieszanych dwusiarczków białkowych**
- VI. Enzymy, których aktywność jest modyfikowana po utworzeniu mieszanych dwusiarczków białkowych**
 - VI-1. Enzymy metabolizmu glukozy**
 - VI-2. Fosfatazy**
- VII. Badania *in vivo***
- VIII. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Reactions leading to formation of protein-mixed disulfides**
 - II-1. Enzym in the reduced form**
 - II-2. Enzym in the oxidized form**
- III. Content of protein-mixed disulfides in tissues**
- IV. Enzyme catalyzing formation of protein-mixed disulfides**
- V. Pathways leading to increase of protein-mixed disulfides**
- VI. Enzymes whose activities are modified by formation of protein-mixed disulfides**
 - VI-1. Enzymes of glucose metabolism**
 - VI-2. Phosphatases**
- VII. *In vivo* studies**
- VIII. Concluding remarks**

* Dr., Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

Wykaz stosowanych skrótów: RSH — niskocząsteczkowy związek tiolowy, związek o małej masie cząsteczkowej zawierający wolną grupę sulfhydrylową, RSSR — niskocząsteczkowy dwusiarczek, związek o małej masie cząsteczkowej zawierający mostek dwusiarczkowy, ESSR — mieszany dwusiarczek białkowy, wiązanie dwusiarczkowe utworzone jest pomiędzy enzymem a niskocząsteczkowym związkiem; GSH — zredukowana postać glutationu; GSSG — utleniona postać glutationu; AcPaza — fosfataza kwaśna; DTT — dwutiotreitol.

I. Wprowadzenie

Jedną z form kontrolowania metabolizmu komórki jest zmiana aktywności enzymów zachodząca po kowalencyjnym związaniu małej cząsteczki efektora. Najlepiej poznanym przykładem tego typu regulacji jest modyfikacja cząsteczki enzymu przez jej fosforylację [1, 2]. Ostatnio w kontroli działania enzymów sugeruje się również udział procesów metylacji [3], karboksylacji [4] oraz ADP-rybozylacji [5]. Z badań *in vitro* wiadomo, że aktywność wielu enzymów zmienia się po inkubacji z niskocząsteczkowymi dwusiarczkami (RSSR); znane są również enzymy, których działanie modyfikowane jest pod wpływem niskocząsteczkowych związków tiolowych (RSH). Powyższe obserwacje stanowią podstawę hipotezy o regulacji aktywności enzymów poprzez tworzenie mieszanych dwusiarczków białkowych. Zakłada ona, że aktywność katalityczna niektórych enzymów zależy od wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego środowiska, a dokładniej od stosunku stężenia niskocząsteczkowych związków tiolowych do stężenia niskocząsteczkowych dwusiarczków. Mimo licznych danych z tej dziedziny, wciąż jeszcze nie dość często mówi się o roli modyfikacji białek enzymatycznych poprzez RSSR lub RSH w regulacji aktywności enzymów *in vivo*.

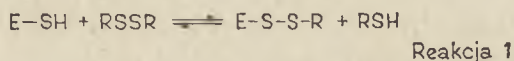
II. Reakcje prowadzące do powstania mieszanych dwusiarczków białkowych

Wiadomo, że przy zetknięciu się dwóch składników o różnym potencjale oksydacyjno-redukcyjnym, substancja o wyższym potencjale wystąpi w roli utleniacza, natomiast substancja o niższym potencjale — w roli reduktora. Z sekwencji tej wynika, że reakcja pomiędzy dwoma składnikami zdolnymi do odwracalnego utleniania i redukcji, jest możliwa tylko wtedy, gdy ich potencjały są różne i przebiega tym energiczniej im różnica potencjałów jest większa. Podana reguła dotyczy również przemian oksydacyjno-redukcyjnych jakim ulegają enzymy zawierające wolne lub związane grupy sulfhydrylowe w wyniku ich modyfikacji poprzez RSSR lub RSH. W określonym środowisku, przy tym samym potencjale red-ox, jedne enzymy występują w postaci zreduko-

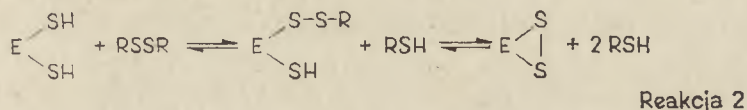
wanej, inne w postaci utlenionej. Dlatego osobno rozważymy te dwa przypadki.

II-1. Enzym w postaci zredukowanej

Reakcja pomiędzy enzymem zawierającym wolną grupę sulfhydrylową a niskocząsteczkowym dwusiarczkiem zajdzie jedynie wtedy, gdy układ grupa sulfhydrylowa enzymu (niskocząsteczkowy dwusiarczek wykaże odpowiednią różnicę potencjałów oksydacyjno-redukcyjnych. Co więcej, reakcja taka zależy również od rodzaju niskocząsteczkowego dwusiarczku (ładunek, wielkość) oraz od mikrośrodowiska otaczającego wolną grupę sulfhydrylową. W wyniku reakcji powstaje mieszany dwusiarczek białkowy (Reakcja 1)



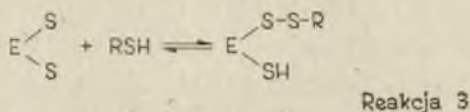
Jeśli enzym zawiera jeszcze jedną grupę sulfhydrylową blisko grupy, która utworzyła mieszany dwusiarczek białkowy, może nastąpić redukcja mieszanego dwusiarczku białkowego przez wolną grupę sulfhydrylową enzymu. W rezultacie otrzymujemy wewnątrzcząsteczkowy dwusiarczek białkowy (Reakcja 2)



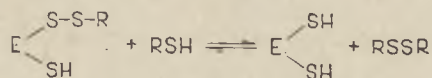
Niskocząsteczkowe związki tiolowe oczywiście nie reagują z enzymem w postaci zredukowanej, a jedynie przeciwdziałają utlenianiu jego grup sulfhydrylowych. W tych warunkach następuje stabilizacja enzymów, które do swej aktywności wymagają grup -SH.

II-2. Enzym w postaci utlenionej

Zmiana stopnia utlenienia enzymu zawierającego mostek dwusiarczkowy może nastąpić jedynie w wyniku reakcji ze związkiem o odpowiednio niższym potencjale oksydacyjno-redukcyjnym. Wynika z tego termodynamiczne uzasadnienie możliwości reakcji pomiędzy enzymem w postaci utlenionej a niskocząsteczkowym związkiem tiolowym. Reakcja ta przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie powstaje mieszany dwusiarczek białkowy (Reakcja 3)



Dalsza redukcja doprowadza do utworzenia enzymu z dwoma wolnymi grupami sulfhydrylowymi (Reakcja 4)



Reakcja 4

Jak już wspomniano, hipoteza o regulacji aktywności enzymów poprzez tworzenie mieszanych dwusiarczków białkowych zakłada, że powstała w wyniku tego procesu zmiana stopnia utlenienia enzymu związana jest z obniżeniem bądź podwyższeniem jego aktywności katalitycznej. Większość enzymów występuje w komórce w postaci zredukowanej, w związku z tym uważa się, że mieszane dwusiarczki białkowe uczestniczące w kontroli aktywności enzymów powstają głównie według reakcji 1, tzn. wtedy gdy w komórce nastąpi wzrost stężenia niskocząsteczkowych dwusiarczków. Powrót do warunków wyjściowych, czyli do wyjściowego stosunku RSSR/RSH spowoduje, że enzym odzyska swoją poprzednią aktywność.

III. Zawartość mieszanych dwusiarczków białkowych w tkankach

W wielu tkankach wykazano obecność mieszanych dwusiarczków białkowych na podstawie uwalniania rozpuszczalnych związków tiolowych z białek komórkowych po ich chemicznej redukcji. Jednakże rodzaj uwalnianych związków udało się określić tylko w nielicznych przypadkach [6—9]. W piśmiennictwie spotyka się rozbieżności odnośnie zawartości mieszanych dwusiarczków białkowych w materiale biologicznym. Stwierdzone wcześniej wysokie stężenia tych związków w normalnych tkankach uważa się obecnie za artefakty eksperymentalne. W warunkach fizjologicznych niskocząsteczkowe związki tiolowe w komórce przewyższają ilościowo niskocząsteczkowe dwusiarczki [9]. Jest mało prawdopodobne, aby w redukującym środowisku występowały duże ilości mieszanych dwusiarczków białkowych. Sytuacja zmienia się natomiast w warunkach szoku tlenowego, gdy stężenie niskocząsteczkowych dwusiarczków wzrasta kosztem utlenienia niskocząsteczkowych związków tiolowych. Zawartość mieszanych dwusiarczków białkowych w tkance powinna wtedy wzrastać. Potwierdzają to liczne doświadczenia. Przykładowo, płuco szczura zawiera od 250 do 450 nmoli mieszanych dwusiarczków białkowych na gram mokrej tkanki; hodowanie zwierząt przez 4 godziny w atmosferze ozonu powoduje wzrost ilości tych związków do 600—800 nmoli/g [10]. Po perfuzji 0.1 M roztworem wodorotlenku III-rz. butylu wątroby szczura, stwierdzono zwiększenie stężenia mieszanych dwusiarczków białkowych z początkowej wartości 25 do 90 nmoli na gram mokrej tkanki [7]. Przypuszcza się, że podwyższenie zawartości

mieszanych dwusiarczków białkowych obserwowane w warunkach szoku tlenowego może stanowić mechanizm obrony organizmu przed jego skutkami albo może wynikać z braku odpowiedniej ilości związków redukujących mieszane dwusiarczki białkowe.

IV. Enzymy katalizujące powstawanie mieszanych dwusiarczków białkowych

Mieszane dwusiarczki białkowe mogą powstawać spontanicznie, ale tworzenie ich w komórce jest najprawdopodobniej katalizowane enzymatycznie. W cytosolu i frakcji błonowej wykryto bowiem enzymy biorące udział w syntezie i redukcji wiązań dwusiarczkowych; są nimi cytosolowe transferazy tiolowe [11—13] i związane z błonami disulfido-izomeryazy białek [13—15]. Transferazy tiolowe oprócz tworzenia mieszanych dwusiarczków białkowych katalizują w komórce reakcję transhydrogenacji pomiędzy niskocząsteczkowymi związkami tiolowymi a niskocząsteczkowymi dwusiarczkami. Disulfido-izomeryazy białek natomiast uczestniczą przede wszystkim w powstawaniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych podczas biosyntezy łańcucha peptydowego; ponadto wykazują również zdolność do przemieszania wiązań dwusiarczkowych utworzonych w błędnych pozycjach tzn. między innymi resztami cysteiny, niż to ma miejsce w natywnym białku. Przegrupowanie wiązania przebiega w ten sposób, że najpierw zachodzi redukcja niewłaściwie położonego mostka dwusiarczkowego, a następnie enzym katalizuje powstanie wiązania pomiędzy właściwymi resztami cysteiny. Transferazy tiolowe i disulfido-izomeryazy białek nie przejawiają specyficzności substratowej, a kierunek katalizy zależy od stanu utlenienia substratu białkowego i warunków reakcji. Stwierdzono na przykład, że disulfidoizomeryazy białek mogą katalizować następujące reakcje [15]:

1. w obecności łagodnych utleniaczy (O_2 , mieszanina GSSG/GSH) i zredukowanego substratu białkowego — tworzenie wiązań dwusiarczkowych;
2. w warunkach silnie redukujących ($10^{-2}M$ GSH) — redukcję utlenionego substratu białkowego;
3. w łagodnych warunkach redukujących ($10^{-5}M$ DTT, 10^{-3} GSH) — przemieszczanie mostków dwusiarczkowych do prawidłowych pozycji.

V. Drogi prowadzące do wzrostu stężenia mieszanych dwusiarczków białkowych

W tym rozdziale rozważymy kilka dróg metabolicznych, które mogą doprowadzić do zwiększenia zawartości niskocząsteczkowych dwusiarczków w komórce, a w konsekwencji, zgodnie z reakcją 1 do wzrostu ilo-

ści mieszanych dwusiarczków białkowych. Uważa się, że główną rolę w tworzeniu mieszanych dwusiarczków białkowych odgrywa dwusiarczek glutationu, ponieważ w komórce występuje w dużych stężeniach. Rozpatrzmy więc wpieryw, w jaki sposób może dojść do wzrostu ilości GSSG.

Reduktaza glutationowa katalizuje reakcję redukcji tego związku za pomocą NADPH (Reakcja 5)



Dotychczas nie wykazano fizjologicznych modulatorów tej reakcji. Zakłada się natomiast, że szybkość jej zależy od dostępności substratów [16]. Niedobór jednego substratu — NADPH może więc doprowadzić do wzrostu stężenia drugiego substratu — dwusiarczku glutationu.

Wzrost ilości GSSG może również nastąpić w wyniku reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową (Reakcja 6)



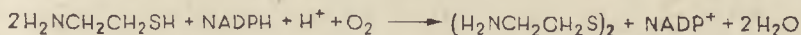
Zredukowana forma glutationu jest utleniana kosztem redukcji nadtlenu wodoru. Sugeruje się, że szybkość utleniania GSH *in vivo* jest pośrednio kontrolowana przez cykliczny AMP [17, 18]. Zaobserwowano bowiem, że wzrost poziomu cAMP w wątrobie szczura połączony jest z obniżeniem aktywności katalaz i z podwyższeniem stężenia niskocząsteczkowych dwusiarczków. Prawdopodobnie w wyniku zmniejszenia aktywności katalaz więcej nadtlenu wodoru bierze udział w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową, co w rezultacie doprowadza do wzrostu ilości dwusiarczku glutationu w komórce.

Gilbert wysunął hipotezę, że stosunek niskocząsteczkowych związków tiolowych do niskocząsteczkowych dwusiarczków działa w komórce jako trzeci pośrednik pomiędzy hormonem a enzymem według następującego schematu: hormon aktywuje cyklazę adenylową, co prowadzi do wzrostu poziomu cAMP, cAMP indukuje zmianę stosunku RSH/RSSR (np. przez zahamowanie aktywności katalaz), a to w konsekwencji powoduje wzrost lub obniżenie aktywności określonych enzymów po utworzeniu mieszanych dwusiarczków białkowych [19, 20]. Taką hipotezę proponuje się także w stosunku do insuliny — hormonu nie działającego poprzez cAMP. W tym przypadku funkcję drugiego pośrednika pełniłby nadtlenek wodoru [21]. Wykazano mianowicie, że insulina wywołuje wzrost stężenia nadtlenu wodoru przez aktywację oksydaz (NADPH) zlokalizowanych w błonach adipocytów [22]. Powstający nadtlenek wodoru rozkłada się kosztem utleniania GSH do GSSG w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową (Reakcja 6). W rezultacie do-

chodzi do zmiany stosunku GSH/GSSG i modulacji aktywności odpowiednich enzymów.

Hipotezę o działaniu układu RSH/RSSR jako trzeciego pośrednika podważa Ziegler [16]. Uważa bowiem, że gdyby ona była prawdziwa, to peroksydaza glutationowa odgrywałaby ważną rolę w regulacji reakcji metabolicznych *in vivo*. Przeczą temu jednak doświadczenia wykazujące, że u szczurów, u których aktywność peroksydazy glutationowej zmniejszyła się do 1—2% wartości kontrolnej, nie występują znaczące zmiany w metabolizmie węglowodanów i tłuszczu [23].

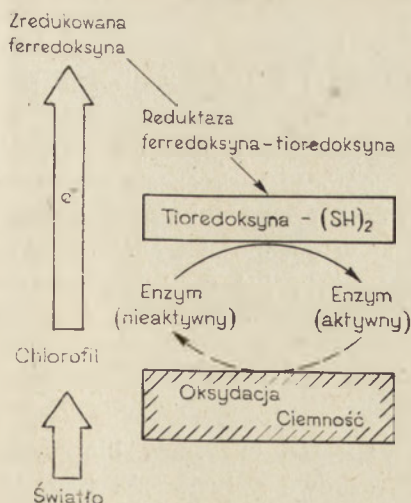
Oprócz dwusiarczku glutationu w tworzeniu mieszanych dwusiarcz-ków białkowych mogą też brać udział inne, fizjologicznie występujące niskocząsteczkowe dwusiarczki, np. cystamina [24]. Powstaje ona w reakcji utleniania cysteaminy katalizowanej poprzez monooksygenazy (Reakcja 7)



Reakcja 7

Ponieważ monooksygenazy są związane z błonami uważa się, że w pobliżu błon nie dwusiarczek glutationu, ale cystamina jest tym niskocząsteczkowym dwusiarczkiem, który tworzy mieszane dwusiarczki białkowe z enzymami. Stężenie cysteaminy w tkankach ssaków jest bardzo małe [25], dlatego też tworzenie mieszanych dwusiarcz-ków białkowych z cystaminą jest najprawdopodobniej *in vivo* ograniczone i kontrolowane szybkością syntezy cysteaminy. Dotychczas nie poznano mechanizmów regulujących szybkość biosyntezy cysteaminy [16].

Zarówno dwusiarczek glutationu jak i cystamina tworzą mieszane dwusiarczki białkowe według reakcji 1, natomiast przykładem niskocząsteczkowego związku, który w formie zredukowanej zmienia aktywność enzymów (Reakcja 3, 4) jest tioredoksyna—małe białko, rozpow-



Ryc. 1. Udział tioredoksyny w regulacji aktywności enzymów odpowiedzialnych za przyswajanie CO₂ w chloroplastach [34].

szechnione zarówno u prokariota jak i eukariota [26]. Najpierw została rozpoznana jako donor wodoru w biosyntezie dezoksyrybonukleotydów [27]. Dopiero intensywne badania Buchana pokazały, że tioredoksyna uczestniczy również w regulacji aktywności kluczowych enzymów odpowiedzialnych za przyswajanie CO₂ w chloroplastach (Ryc. 1).

Pod wpływem światła elektrony z chlorofilu przenoszone są na ferredoksynę, a następnie poprzez reduktazę ferredoksyna—tioredoksyna na tioredoksynę. Zredukowana tioredoksyna aktywuje wiele enzymów, między innymi fruktozo-1,6-bisfosfatazę [28], sedoheptulozo-1,7-bisfosfatazę [29], dehydrogenazę gliceroaldehydo-fosforanową [30], fosforybulo kinazę [31], dehydrogenazę jabłczanową [32] oraz amoniako-liazę fenyloalaninową [33]. Rośliny zawierają kilka tioredoksyn; z chloroplastów szpinaku wyizolowano dwie — tioredoksynę f aktywującą wyłącznie fruktozo-1,6-bisfosfatazę oraz tioredoksynę m, która aktywuje przede wszystkim dehydrogenazę jabłczanową [34]. Enzymy zaktywowane przez tioredoksynę w ciemności są reoksydowane za pomocą GSSG, co powoduje ich inaktywację.

U zwierząt występuje tylko jeden rodzaj tioredoksyny, a rola jej z wyjątkiem uczestniczenia w procesie redukcji rybonukleotydów do dezoksyrybonukleotydów jest mało poznana. Wiadomo jedynie, że zredukowana forma tioredoksyny redukuje *in vitro* wiązania dwusiarczkowe zarówno niskocząsteczkowych związków (np. cystyna), jak i polipeptydów (np. insulina) [35]. Potencjalnie więc tioredoksyna może u zwierząt — podobnie jak u roślin — zmieniać aktywność enzymów, ale jak dotychczas brak na ten temat doniesień.

VI. Enzymy, których aktywność jest modyfikowana po utworzeniu mieszanych dwusiarczków białkowych

W tabeli 1 zestawiono enzymy, które w badaniach *in vitro* wykazują wzrost lub spadek aktywności katalitycznej po inkubacji z niskocząsteczkowymi dwusiarczkami lub hormonami peptydowymi zawierającymi wiązanie dwusiarczkowe. Obserwowane zmiany były we wszystkich przypadkach łatwo odwracane za pomocą niskocząsteczkowych związków tiolowych. Warto zaznaczyć, że w czasie inkubacji kinazy pirogronianowej z dwusiarczkim glutationu w obecności transferaz tiolowych, mieszane dwusiarczki białkowe powstają już po kilku sekundach [12].

VI-1. Enzymy metabolizmu glukozy

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że spośród enzymów biorących udział w metabolizmie glukozy niskocząsteczkowe dwusiarczki hamują

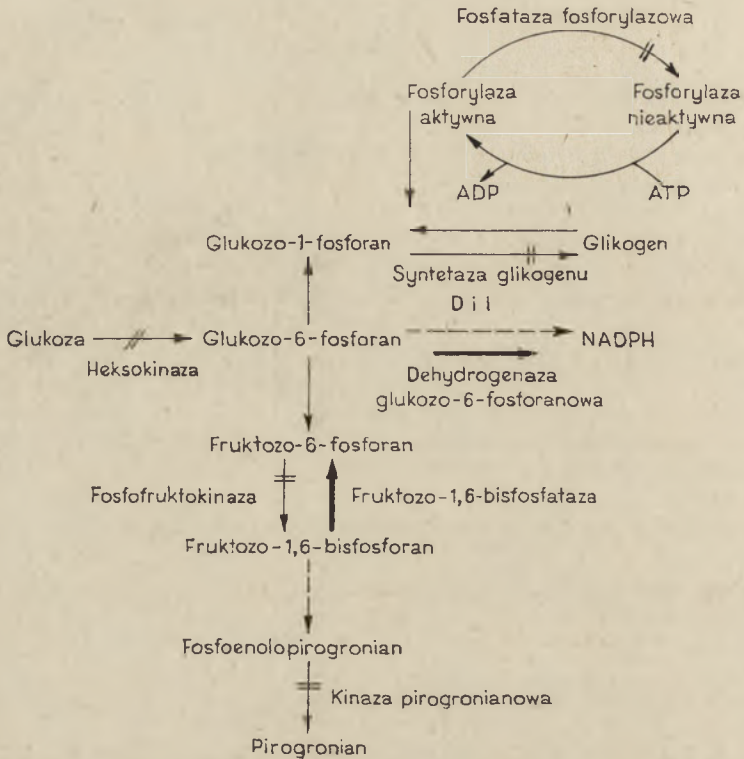
Tabela 1

Przykłady enzymów, których aktywność zmienia się po inkubacji z niskocząsteczkowymi dwusiarczkami

Enzym	Niskocząsteczkowy dwusiarczek	Piśmien- nictwo
Enzymy aktywowane po inkubacji z niskocząsteczkowymi dwusiarczkami		
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (EC 1.1.1.49) wyizolowana z wątroby szczura	GSSG	36
Fruktozo-1,6-bisfosfataza (EC 3.1.1.11) wyizolowana z wątroby szczura	homocystyna; cystamina	37, 38
Hydrolaza acetylo-CoA (EC 3.1.2.1) wyizolowana z szyszynki	cystamina; somatotropina; wazopresyna	39, 40
Kolagenaza (EC 3.4.24.3) wyizolowana z leukocytów ludzkich	cystyna; GSSG; insulina	41, 42
Enzymy hamowane po inkubacji z niskocząsteczkowymi dwusiarczkami		
Aminotransferaza tyrozynowa (EC 2.6.1.5) wyizolowana z wątroby świnki morskiej	cystyna	43
Cyklaza adenylowa (EC 4.6.1.1) wyizolowana z mózgu wołu	GSSG; cystyna; cystamina	44
Cyklaza guanylanowa (EC 4.6.1.2) wyizolowana z wątroby wołu	GSSG; cystyna; cystamina; CoASSG	45, 46
Dehydrogenaza aldehydowa (EC 1.2.1.3) wyizolowana z wątroby konia	GSSG; dwusiarczek 2-hydroksyetylu	47
Fosfataza fosforylazowa (EC 3.1.3.37) wyizolowana z wątroby królika	GSSG	48
Fosfataza kwaśna (EC 3.1.3.2) wyizolowana z wątroby ludzkiej		49,50
Fosfofruktokinaza (EC 2.7.1.11) wyizolowana z mięśni szkieletowych królika	GSSG; CoASSG	19, 20
Heksokinaza (EC 2.7.1.1) wyizolowana z mózgu wołu	cystamina	51
Kinaza pirogronianowa (EC 2.7.1.40) wyizolowana z wątroby szczura	GSSG	12
Reduktaza hydroksymetyloglutarylo-CoA (EC 1.1.1.88) wyizolowana z wątroby szczura	GSSG	52, 53
Syntetaza glikogenu (EC 2.4.1.11) I wyizolowana z serca wołu oraz	GSSG	54
D wyizolowana z wątroby szczura	GSSG	55

aktywność fosfatazy fosforylazowej [48], syntetazy glikogenowej [54, 55], heksokinazy [51], fosfofruktokinazy [19, 20] oraz kinazy pirogronianowej [12], a aktywują fruktozo-1,6-bisfosfatazę [37, 38] i dehydrogenazę glukozy-6-fosforazową [36]. Zastanówmy się zatem, jakie zmiany mogą zajść w metabolizmie glukozy, gdy w komórce nastąpi wzrost stężenia niskocząsteczkowych dwusiarczków. Najpierw rozpatrzmy dro-

gę rozkładu glikogenu. Zahamowanie w tym samym czasie zarówno fosfatazy fosforylazowej jak i syntetazy glikogenowej prowadzi do aktywacji glikogenolizy (Ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat dróg metabolicznych glukozy. Zaznaczono tylko te enzymy, których aktywność modyfikowana jest po inkubacji z niskocząsteczkowymi dwusiarcznikami. Strzałki przekreślane symbolizują enzymy hamowane po inkubacji, strzałki (→) enzymy aktywowane. Zmodyfikowany schemat [21].

Spadek aktywności trzech enzymów glikolitycznych (heksokinazy, fosfofruktokinazy, kinaza pirogronianowej) spowoduje zwolnienie procesu glikolizy. Na szczególną uwagę zasługuje fakt przeciwstawnego zachowania się enzymów katalizujących konwersję fruktozo-6-fosforanu do fruktozo-1,6-bisfosforanu i vice versa. Jak już wcześniej wspomniano fosfofruktokinaza po utlenieniu ulega inaktywacji, podczas gdy enzym katalizujący tę samą reakcję lecz w odwrotnym kierunku (fruktozo-1,6-bisfosfataza) ulega aktywacji. Jest to niezmiernie interesujące, ponieważ dotyczy reakcji będącej „zwrotnicą” pomiędzy glikolizą a glukoneogenezą.

W 1982 roku Moser wyizolował z wątroby szczura dwie formy fruktozo-1,6-bisfosfatazy o jednakowej masie podjednostek, różniące się stanem utlenienia grup tiolowych [56]. Stałe Michelisa obu postaci wobec

substratu były jednakowe, ale bardziej utleniona forma enzymu była słabiej hamowana przez AMP i po redukcji odzyskiwała wrażliwość na hamujące działanie tego związku. Chociaż nie wiadomo, czy forma utleniona powstaje z formy zredukowanej w czasie oczyszczania, czy też występuje w hepatocytach, to z powyższych danych wynika, że stan utlenienia białka enzymatycznego wpływa na wrażliwość enzymu wobec zewnętrznych allosterycznych efektorów.

Wspomniano już, że w warunkach silnie utleniających, gdy ilość dwusiarczku glutationu wzrasta, następuje zahamowanie glikolizy i aktywacja dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Enzym ten katalizuje pierwszy etap bezpośredniej przemiany glukozy w tzw. cyklu pentozomonofosforanowym. Jedną z głównych funkcji tego cyklu jest dostarczanie NADPH, który z kolei potrzebny jest do redukcji dwusiarczku glutationu. Jeżeli przedstawione wyżej procesy rzeczywiście zachodzą *in vivo*, to przesunięcie metabolizmu glukozy na drogę cyklu pentozomonofosforanowego można uważać jako mechanizm zabezpieczający komórki przed nagromadzeniem się NADP.

Wykazano, że dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa występuje w dwóch formach, a ilość jednej z nich znacznie wzrasta, gdy ekstrakty wątroby poddaje się działaniu czterochlorku węgla [57]. Efekt działania CCl_4 można odwrócić za pomocą glutationu w postaci zredukowanej. Wysunięto ciekawą koncepcję zakładającą, że jedna forma dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej odpowiada samemu enzymowi, zaś druga enzymowi związanemu z glutationem. Przypuszcza się, że utworzenie mieszanego dwusiarczku pomiędzy enzymem a glutationem prowadzi do zmiany konformacji białka enzymatycznego, a w konsekwencji do wyeksponowania na nim ujemnych ładunków i dlatego formy te są odróżnialne elektroforetycznie.

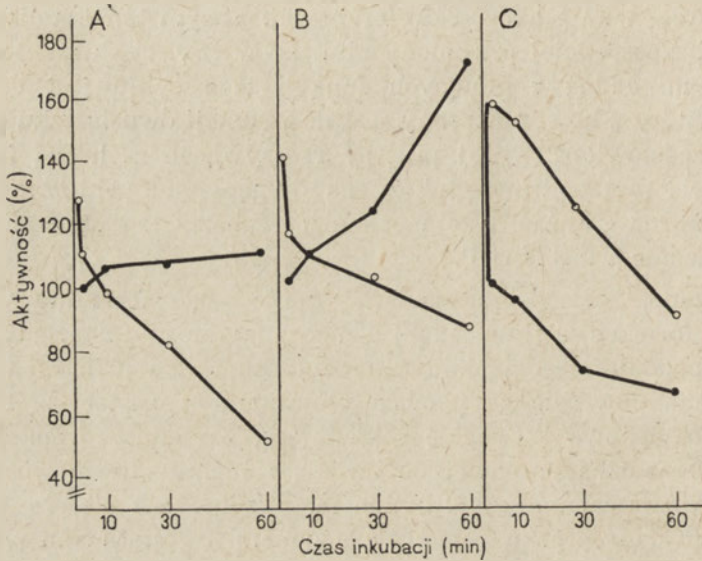
VI-2. Fosfatazy

O ważności reszt cysteiny dla katalitycznych właściwości kwaśnych fosfataz donoszono już niejednokrotnie [49, 50].

Kwaśna fosfataza z liści szpinaku ulega kilkakrotnej aktywacji po inkubacji z dwusiarczkiem glutationu lub dehydroaskorbinianem [58]. Aktywacji towarzyszy przesunięcie optimum działania enzymu z pH 5 do 7, co powoduje, że jest on aktywny zarówno w pH kwaśnym jak i obojętnym. Dodanie zredukowanej postaci glutationu przywraca pierwotne właściwości enzymu. Podobnie zachowuje się kwaśna fosfataza z bulw ziemniaka [58]. Wspomniano już wcześniej, że w chloroplastach występują enzymy zachowujące się w sposób odmienny tzn. są deaktywowane przez dwusiarczek glutationu i dehydroaskorbinian, a aktywowane przez tioredoksynę. Wynika z tego, że GSSG i dehydroaskorbinian

mogą uczestniczyć zarówno w aktywacji jak i inaktywacji enzymów roślinnych.

Dwie formy kwaśnej fosfatazy (AcPazy) z wątroby suma różniące się stopniem glikozylacji wykazują odmienną wrażliwość w stosunku do czynników blokujących i ochraniających grupy tiolowe [59]. Efekt działania czynników redukujących, takich jak 2-merkaptoetanol, DTT i askorbinian zmienia się w zależności od stężenia i czasu ich działania (Ryc. 3).



Ryc. 3. Zależność aktywności AcPazy I i II z wątroby suma od czasu inkubacji z askorbinianem. AcPazy inkubowano z 0,1 (A); 1 (B); 10 (C) mM askorbinianem. Aktywność enzymu inkubowanego w tych samych warunkach, ale bez askorbinianu przyjęto za 100%.

(—•—) AcPaza I; (—○—) AcPaza II.

Po dodaniu askorbinianu obserwuje się natychmiastową aktywację AcPazy II, podczas gdy aktywność AcPazy I nie ulega zmianie. Przedłużając czas preinkubacji enzymu z askorbinianem AcPaza II ulega inaktywacji, a aktywność AcPazy I wzrasta. W rezultacie, kiedy jedna forma enzymu jest aktywowana, aktywność drugiej nie ulega zmianie albo jest hamowana. Warto podkreślić, że w surowych ekstraktach zawierających obie formy nie wykazano zmian aktywności fosfatazowej po inkubacji z askorbinianem. Przypuszcza się, że w zależności od warunków oksydacyjno-redukcyjnych panujących w komórce działa jedna bądź druga forma molekularną kwaśnej fosfatazy.

W poprzednim rozdziale wspomniano o dwóch fosfatazach, których aktywność zmienia się po utworzeniu mieszanych dwusiarczków z glu-

tationem. Są to fosfataza fosforylazowa i fruktozo-1-6-bisfosfataza. Molekularna masa katalitycznej podjednostki fosfatazy fosforylazowej wynosi około 35000 [60]. Fruktozo-1,6-bisfosfataza jest tetramerem o masie cząsteczkowej podjednostki 37000 [56]. Aktywność innego enzymu, 6-fosfofrukto-2-kinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy, który pełni funkcje fosfatazy lub kinazy zmienia się po inkubacji z czynnikami blokującymi grupy sulfhydrylowe, chociaż dwusiarczek glutationu w stężeniu 0.1—10 mM nie wpływa na jego aktywność [61]. Jest rzeczą interesującą, że po trawieniu tego enzymu termolizyną otrzymuje się fragmenty o masie 32000—38000, które wykazują już tylko aktywność fosfatazową.

Znane są również kwaśne fosfatazy, których aktywność wzrasta po inkubacji z czynnikami redukującymi, a hamowana jest przez czynniki blokujące grupy tiolowe [62, 63, 64]. Masy cząsteczkowe większości z nich wahają się od 30000 do 40000. Warto zaznaczyć, że masa podjednostkowa omawianej poprzednio kwaśnej fosfatazy z wątroby suma wynosi również 35000 [65].

Podsumowując, należy zwrócić uwagę na fakt, że wymienione fosfatazy mają masę cząsteczkową albo masę podjednostkową lub też fragment odpowiadający aktywności fosfatazowej o masie około 30 000. Nie wiadomo, czy ta zbieżność jest przypadkowa, czy też fosfatazy te posiadają homologiczny fragment struktury odpowiedzialny za uzależnienie ich aktywności od warunków oksydacyjno-redukcyjnych.

VII. Badania *in vivo*

Wiele badań wykonanych *in vivo* przemawia za hipotezą dotyczącą regulacji metabolizmu poprzez tworzenie i rozpad mieszanych dwusiarczków białkowych. Przytoczę kilka przykładów. Stwierdzono, że podanie zwierzęciu 100 do 200 mg cystaminy na kilogram wagi ciała spowodowało w czasie dwóch godzin spadek ilości glikogenu w wątrobie do wartości mniejszej niż 10% wartości kontrolnej [66]. Po perfuzji wątroby szczura roztworem wodorotlenku III-rz. butylu następował wzrost stężenia wolnej glukozy i stymulacja glikogenolizy [67]. Oba efekty były odwracalne przez dwutioerytrol. W płucu szczura poddanego działaniu parakwatu wykazano aktywację cyklu pentozomonofosforanowego przy jednoczesnym zahamowaniu glikolizy [68, 69]. Keeling stwierdził liniową zależność pomiędzy stężeniem mieszanych dwusiarczków białkowych, a przyrostem znakowanego CO₂ z (1-¹⁴C) glukozy [70]. Jest więc wielce prawdopodobne, że sposób regulacji przemiany glukozy proponowany w rozdziale VI-1 rzeczywiście funkcjonuje *in vivo* współdziałając z innymi mechanizmami odpowiedzialnymi za regulację metabolizmu tego cukru.

VIII. Uwagi końcowe

Nie ulega wątpliwości, że zmiana stosunku niskocząsteczkowych związków tiolowych do niskocząsteczkowych dwusiarczków w komórce, a w konsekwencji zmiana aktywności wielu enzymów w wyniku utworzenia mieszanych dwusiarczków białkowych oddziałuje na liczne, jeśli nie na wszystkie procesy metaboliczne. Przyczyną mogą być silne warunki utleniające, a odpowiedź organizmu pod postacią opisanych w tym artykule efektów metabolicznych można potraktować jako mechanizm obronny. Z drugiej strony brak jest bezpośrednich danych wskazujących na zmianę stanu utlenienia enzymów pod wpływem fizjologicznych stymulatorów. Wyjątek stanowią układ tioredoksyny uruchamiający się pod wpływem światła oraz aktywacja kolagenazy w czasie fagocytozy. W tym drugim przypadku leukocyty wytwarzają dużą ilość nadtlenku wodoru [71], który z kolei prowadzi do powstania GSSG w ilości wystarczającej do aktywacji enzymu [72]. Tak więc, hipoteza o regulacji dróg metabolizmu poprzez tworzenie mieszanych dwusiarczków białkowych jest atrakcyjna, choć jeszcze nie w pełni udowodniona.

Autorka składa serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Aleksandrze Kubiczowej za krytyczne uwagi i pomoc w przygotowaniu niniejszego artykułu.

Opracowanie wykonano w ramach Programu CPBR 3.13.1.

Zaakceptowano do druku 22 stycznia 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Krebs E. G., Beavo J. A., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 923—959.
2. Cohen P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **151**, 439—448.
3. DeFranco A. L., Koshland D. E., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2429—2433.
4. Magnusson S., Peterson T., Sottrup-Jensen L., Claeys H., (1975) w *Proteases and Biological Control*, red. Reich E., Rifkin D., Shaw E., str. 123—150; Cold Spring Harbor Press, Long Island, NY.
5. Vaughn M., Moss J., (1981), *Curr. Top. Cell Regul.*, **20**, 205—246.
6. Jocely P. C., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **369**, 427—436.
7. Brigelius R., (1983), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 989—996.
8. Meredith M. J., (1983), *Anal. Biochem.*, **131**, 504—509.
9. Meister A., Anderson M., (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711—760.
10. Ishikawa T., Sies H., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3838—3843.
11. Axelsson K., Erikson, S., Mannervik B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2978—2984.
12. Mannervik B., Axelsson K., (1980), *Biochem. J.*, **190**, 125—130.
13. Freedman R. B., (1979), *FEBS Lett.*, **97** 201—210.
14. Żak Z., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 313—329.

15. Freedman R. B., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 438—441.
16. Ziegler D. M., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 305—329.
17. Isaacs J., Binkley F., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 192—204.
18. Isaacs J., Binkley F., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **498**, 29—38.
19. Gilbert H. F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12086—12091.
20. Gilbert H. F., (1984), *Methods Enzymol.*, **107**, 330—351.
21. Brigelius R., (1985) w *Glutathione Mixed Disulfides*, str. 243—271, Academic Press, Londyn.
22. Mukherjæe S. P., Lynn W. S., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **184**, 69—76.
23. Hafeman D. G., Sunde R. A., Hockstra W. G., (1974), *J. Nutr.*, **104**, 580—587.
24. Ziegler D. M., Poulsen L., (1977), *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 79—81.
25. Ida S., Tanaka Y., Ohkuma S., Kuriyama K., (1984), *Anal. Biochem.*, **136**, 352—356.
26. Holmgren A., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 237—271.
27. Przybyszewski W. M., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 321—333.
28. Wolosiuk R. A., Buchanan B. B., (1977), *Nature*, **266**, 565—567.
29. Breazeale V. G., Buchanan B. B., (1978), *Z. Naturforsch.*, **33**, 521—528.
30. Wolosiuk R. A., Buchanan B. B., (1978), *Plant Physiol.*, **61**, 669—671.
31. Wolosiuk R. A., Buchanan B. B., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**, 97—101.
32. Scheibe R., Fickenscher K., Ashton A. R., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **870**, 191—197.
33. Nishizawa A. N., Wolosiuk R. A., Buchanan B. B., (1979), *Planta*, **145**, 7—12.
34. Buchanan B. B., Wolosiuk R. A., Schurmann P., (1979), *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 26—29.
35. Mannervik B., Axelsson K., Sundewall A. C., Holmgren A., (1983), *Biochem. J.*, **213**, 519—523.
36. Eggleston L. V., Krebs H. A., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 425—435.
37. Pontremoli S., Traniello S., Enser M., Shapiro S., Horecker B. L., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 286—293.
38. Pontremoli S., Melloni E., Michetti M., Salamino F., Sparatore B., Horecker B. L., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **213**, 731—733.
39. Namboodiri M. A. A., Favilla J., Klein D. C., (1981) *Science*, **213**, 571—575.
40. Namboodiri M. A. A., Favilla J. T., Klein D. C., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10030—10032.
41. Steven F. S., Griffin M. M., Smith R. H., (1981), *Eur. J. Biochem.* **119**, 75—78.
42. Tschesche H., Macartney H. W., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **120**, 183—190.
43. Federici G., Di Cola D., Sacchetta P., Di Ilio C., Del Boccio G., Polidoro G., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 650—655.
44. Baba A., Lee E., Matsuda T., Kihara T., Iwata H., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1204—1218.
45. Tsai S. G., Adamik R., Manganiello V. C., Vaughan M., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 637—643.
46. Brandwein H. J., Lewicki J. A., Murad F., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2958—2962.
47. Brotherton J. E., Rodwell V. M., (1980), *Physiol. Chem. Phys.*, **12**, 483—495.

48. Usami M., Matsushita H., Shimazu T., (1980), *J. Biol. Chem.*, **225**, 1928—1931.
49. Lawrence G. L., Van Etten R. L., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.* **206**, 122—131.
50. Taga E. M., Van Etten R. L., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 505—515.
51. Nesbakken R., Eldjarn L., (1963), *Biochem. J.*, **87**, 526—532.
52. Dotan I., Shechter I., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **226**, 401—410.
53. Ness G. C., McCreery M. J., Sample C. E., Smith M., Pendleton L. C., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 16395—16399.
54. Lau K. H. W., Thomas J. A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2321—2326.
55. Ernest M. J., Kim K. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5011—5018.
56. Moser U. K., Althaus-Salzmann M., Van Dop C., Lardy H. A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4552—4556.
57. Watanabe A., Taketa K., Kosaka K., (1972), *J. Biochem. (Tokyo)*, **72**, 695—701.
58. Buchanan B. B., Crawford N. A., Wolosiuk R. A., (1979), *Plant Sci Lett.*, **14**, 245—251.
59. Jańska H., Kubicz A., Bem M., Van Etten R. L., (1986), *Comp. Biochem. Physiol.*, **85B**, 753—758.
60. Tung H. Y. L., Resink T. J., Hemmings B. A., Sheonolikar S., Cohen P., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **138**, 635—641.
61. El-Maghrabi M. R., Pate M. T., Pilkins J., Pilkins S. J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13104—13110.
62. Hara A., Sawada H., Kato T., Nakayama T., Yamamoto H., Matsumoto Y., (1984), *J. Biochem.*, **95**, 67—74.
63. Hara A., Kato T., Sawada H., Fukuyama K., Epstein W. L., (1985), *Comp. Biochem. Physiol.*, **82B**, 269—274.
64. Ketcham C. M., Baumbach G. A., Bazer F. W., Roberts R. M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5768—5776.
65. Kubitz A., Waheed A., Van Etten R. L., (1985), *Comp. Biochem. Physiol.*, **81B**, 177—183.
66. Eldjarn L., Pihl A., (1960) w *Mechanisms in Radiobiology*, red. Errera M., Forssberg A., str. 231—296; Academic Press, New York.
67. Sies H., Gerstenecker C., Summer K., Menzel H., Flohe L., (1974) w *Glutathione*, red. Flohe L., Benohr H., Sies H., Waller H. D., Wendel A., str. 261—275; Thieme Verlag, Stuttgart.
68. Rose M. S., Smith L. L., Wyatt J., (1976), *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1763—1767.
69. Rossouw D., Fuchs J., (1979), *S. Afr. Med. J.*, **55**, 558—560.
70. Keeling P. L., Smith L. L., Aldridge W. N., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **716**, 249—257.
71. Baehner R. L., Gilman N., Karnovsky M. L., (1970), *J. Clin. Invest.*, **49**, 692—700.
72. Voetman A. A., Loos J. A., Ross D., (1980), *Blood*, **55**, 741—747.

DCROTA SKOWYRA *, MACIEJ ŻYLICZ **

Białka szoku termicznego

The heat shock proteins

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Geny kodujące białka szoku termicznego
- III. Regulacja ekspresji genów kodujących białka szoku termicznego
 - III-1. Warunki szoku
 - III-2. Warunki bezstresowe
- IV. Rozmieszczenie białek szoku termicznego w komórce
- V. Indukcja syntezy białek szoku termicznego w wyniku infekcji wirusowej
- VI. Udział białek szoku termicznego w transformacji nowotworowej
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Genes of the heat shock proteins
- III. Expression of the genes of heat shock proteins
 - III-1. Stress conditions
 - III-2. Non-stress conditions
- IV. Cellular location of the heat shock proteins
- V. Virus infection and heat shock proteins synthesis
- VI. Involvement of heat shock proteins in cell proliferation
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Hsp—heat shock protein, białko szoku termicznego, Hsc—heat shock cognate, białko podobne do białek szoku termicznego, *dna*—mutacje w genach odpowiedzialnych za replikację DNA, hs-box — heat shock box, sekwencja DNA niezbędna do indukcji syntezy mRNA kodujących białka szoku termicznego, wirus RSV — wirus Mięśaka Rousa (ang. *Rous sarcoma virus*), wirus HSV — wirus opryszczki (ang. *Herpes simplex virus*), wirus SV40 — wirus małpi 40 (ang. *Simian virus 40*).

* mgr, Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk.

** dr hab., Pracownia Biofizyki, Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk.

I. Wstęp

W komórkach organizmów Prokaryota i Eukaryota, pod wpływem temperatury o kilka stopni wyższej niż temperatura fizjologiczna, następuje indukcja syntezy białek szoku termicznego, tzw. białek Hsp (ang. heat shock proteins). Efekt ten został po raz pierwszy zaobserwowany przez F. M. Ritossa, w 1962 roku, w komórkach muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [1, 2]. Przez następne 15 lat uważano, że synteza białek szoku termicznego jest charakterystyczna jedynie dla *Drosophila*. W roku 1978 analogiczna odpowiedź komórki na zmianę temperatury otoczenia została opisana w przypadku Eukaryota [3] i dla bakterii *Escherichia coli* [4, 5]. Od tego czasu ukazało się wiele prac opisujących syntezę białek szoku termicznego w praktycznie wszystkich badanych organizmach, od prymitywnych bakterii aż po komórki ludzkie (prace przeglądowe [6—12]). Podwyższenie temperatury nie jest jedynym czynnikiem wywołującym syntezę białek Hsp. Podobny efekt jest wywołany przez obecność etanolu, niektórych barwników i analogów aminokwasów, jonów wapnia, czynników uszkodzających DNA lub zaburzających równowagę oksydo-redukcyjną, a nawet przez niedobór niektórych składników odżywczych [6, 13]. Nie wszystkie induktory wywołują jednakowy efekt w komórkach pochodzących z różnych organizmów. Etanol, na przykład, stymuluje syntezę białek szoku termicznego w komórkach *Escherichia coli* [9], drożdży [14] i fibroblastach chomika chińskiego [15] natomiast nie wpływa na indukcję syntezy białek Hsp w komórkach *Drosophila* i HeLa.

W komórkach roślinnych i zwierzęcych, indukcja syntezy białek Hsp jest obserwowana nie tylko *in vivo* przy zmianie temperatury otoczenia lub w czasie gorączki, lecz także przy zmianie temperatury hodowli komórkowych i tkankowych [9, 10]. Synteza białek szoku termicznego występuje w różnorodnych tkankach, w tym także w komórkach nerwowych [16], lecz w wielu przypadkach jest zależna od stadium morfogenezy komórek.

Białka szoku termicznego spełniają dwa kryteria [12]: 1. ich synteza jest silnie stymulowana przez podwyższenie temperatury, oraz 2. geny kodujące białka Hsp zawierają na końcu 5' sekwencję hs-box (Ryc. 1).

Stosując kryterium względnej masy cząsteczkowej, większość białek szoku termicznego można zaklasyfikować do jednej z trzech grup: 1. białka Hsp90 (o względnej masie cząsteczkowej w granicach od 80 000 do 90 000), 2. białka Hsp70 (o względnej masie cząsteczkowej w granicach od 68 000 do 74 000), 3. Hsp20 (o względnej masie cząsteczkowej w granicach od 18 000 do 30 000). Najmniejszym białkiem szoku termicznego jest polipeptyd złożony z 76 aminokwasów (ubikwityna), uczestniczący w zależnej od ATP degradacji białek Eukaryota [17].

Sekwencje aminokwasowe białek o zbliżonej masie cząsteczkowej, pochodzących nawet z różnych organizmów, są w wysokim stopniu homologiczne [10]. Istnieje też wiele podobieństw w mechanizmach indukcji syntezy białek Hsp. Podobieństwa w strukturze białek szoku termicznego i w mechanizmach regulacji ich syntezy świadczą o tym, że funkcje pełnione przez białka Hsp mają charakter uniwersalny. Białka Hsp w warunkach stresowych uczestniczą w tworzeniu oporności komórek na podwyższoną temperaturę (termotolerancja) [18—26]. Niektóre białka Hsp syntetyzowane są jednak w warunkach określanych jako bezstresowe. Przymuszcza się, że białka szoku termicznego stanowią ogniwa alternatywnych szlaków metabolicznych, uruchamianych nie tylko po podwyższeniu temperatury lecz także w różnych stadiach morfogenezy komórek, podczas infekcji wirusowej czy transformacji nowotworowej.

II. Geny kodujące białka szoku termicznego

Dzięki stosowaniu technik hybrydyzacji DNA-DNA oraz RNA-DNA, w wielu organizmach zidentyfikowano a następnie zsekwencjonowano geny kodujące białka szoku termicznego. Gen *Drosophila* kodujący białko Hsp83, zlokalizowano w pojedynczym miejscu na chromosomie [27]. Gen *hsp83* posiada sekwencję intronową [10, 28]. Sekwencja nukleotydowa tego genu jest w ok. 60% identyczna z sekwencjami nukleotydowymi genów pochodzących z innych Eukaryota a należących do grupy *hsp90* [10]. Homologie między sekwencjami nukleotydowymi genów należących do grupy *hsp90* *hsp83* posiada sekwencję intronową [10, 28]. Sekwencja nukleotydowymi z *Drosophila* i bakterii *Escherichia coli* są szacowane na około 45% [10]. Metodami immunologicznymi wykazano, że białka szoku termicznego, należące do grupy Hsp90, posiadają ponadto podobną strukturę. Przeciwciała anti-Hsp89 kurczenia immunoprecypitują białka grupy Hsp90 pochodzące z komórek innych Eukaryota [29]. Mapy peptydowe tych białek wykazują także wyraźne podobieństwa [30].

Zsekwencjonowano geny kodujące białka należące do grupy Hsp70 z *Drosophila*, komórek ludzkich HeLa, *Saccharomyces cerevisiae* oraz bakterii *Escherichia coli* (gen *dnaK*). Homologie między sekwencjami nukleotydowymi tych genów zostały oszacowane na 50—80% [11, 31, 32]. Podobieństwa w strukturze białek należących do grupy Hsp70 zostały także wykazane metodami immunologicznymi [29, 33]. Białka Hsp70 komórek *Drosophila*, HeLa i drożdży kodowane są przez (odpowiednio) 7, 10, 9 niemal identycznych genów [34, 35, 36], zlokalizowanych często na różnych chromosomach. Geny kodujące białka stresu termicznego zlokalizowano także w DNA mitochondrialnym [37].

W warunkach podwyższonej temperatury w komórkach *Drosophila* syntetyzowane są także białka należące do grupy Hsp20 (tzn. białka o względnej masie cząsteczkowej 27 000, 26 000, 23 000, 22 000) [10]. Ge-

ny kodujące te białka zlokalizowane są obok siebie we fragmencie DNA o długości 12 000 par zasad [38, 39]. Geny te posiadają wspólny fragment sekwencji DNA, co świadczy o tym, że powstały one przez powielenie i inwersję jednego pra-genu [40, 41]. Ten wspólny fragment DNA, kodujący 75 aminokwasów, pozostał niezmieniony w procesie ewolucji także w innych genach Eukaryota, kodujących białka należące do grupy Hsp20 [42, 43]. Sekwencja nukleotydowa tego fragmentu wykazuje także ok. 50% homologii z sekwencją genu kodującego łańcuch B białka strukturalnego soczewki oka ssaków (α -krystaliny) [44]. Białka *Drosophila* należące do grupy Hsp20 mają tendencje do tworzenia struktur oligomerycznych. Struktury te mogą odgrywać rolę w ochronie komórki przed działaniem warunków stresowych.

Tabela 1

Białka szoku termicznego *Escherichia coli*

Białka Hsp uczestniczące w:	nazwa genu	Rola białek hsp
1. replikacji DNA	<i>dnaK</i> * <i>dnaJ</i> * <i>groPE</i> *	inicjacja replikacji λ (45) inicjacja replikacji λ (46) inicjacja replikacji λ (47)
2. transkrypcji DNA	<i>rpoD</i>	podjednostka RNA polimerazy, inicjacja syntezy mRNA (48)
3. translacji	<i>lysU</i>	lizolo-tRNA syntetaza (49)
4. modyfikacji białek	<i>dnaK</i>	autofosforylacja (50)
5. morfogenezie	<i>groEL</i> * <i>groES</i> *	morfogeneza faga T4 i λ (51) morfogeneza faga T4 i λ (52)
6. degradacji białek	<i>lon</i>	ATP-zależna proteaza (53, 54)

* mutacje w tych genach blokują także syntezę *Escherichia coli* DNA i RNA (47)

W wyniku szoku termicznego bakterie *Escherichia coli* syntetyzują około 19 białek Hsp [9]. Dotychczas zidentyfikowano 9 genów kodujących białka Hsp (Tab. 1). Mutacje w genach *hsp* bakterii *Escherichia coli* powodują zaburzenia podstawowych czynności komórkowych: syntezy DNA, RNA i białek, oraz modyfikacji i degradacji białek [45—54]. Większość wyizolowanych mutacji w genach *hsp* *Escherichia coli* powoduje także zahamowanie replikacji DNA i morfogenezy fagów lambda i T4 (rozdział V). Mutacje w genach kodujących białka Hsp *E. coli* mają charakter plejotropowy. Na przykład w bakteriach zawierających mutację *dnaK756* obserwuje się: 1. zahamowanie syntezy DNA i RNA [55], 2. zahamowanie inicjacji replikacji DNA bakteriofaga lambda [50], 3. zmianę kinetyki syntezy innych białek Hsp [57], 4. zmianę puli ATP w komórce [58], 5. zwiększenie stabilności niektórych białek regulacyjnych [59] 6. brak fosforylacji niektórych białek bakteryjnych [60]. Nie wiadomo, który z tych fenotypów jest wynikiem bezpośredniego,

a który pośredniego, działania zmutowanego genu *dnaK*. Bezpośredni udział białka DnaK został jedynie udowodniony w przypadku inicjacji replikacji lambda DNA (rozdział V). Wbudowanie transpozonu do genu *dnaK* nie jest letalne dla komórki w temperaturach niższych od 37°C [61]. Jeśli więc nawet białko DnaK odgrywa jakąś rolę w komórkach bakteryjnych w warunkach bezstresowych, to może być ono zastąpione przez inne elementy komórkowe.

Określenie fenotypu mutacji w genach kodujących białka Hsp Eukaryota jest utrudnione istnieniem wielu kopii tych genów w komórce. W komórkach drożdży *S. cerevisiae*, w których można generować mutacje *in vitro*, uzyskano mutacje w ośmiu genach kodujących białka Hsp70 [62, 63, 11]. Określenie fenotypu tych mutacji sugeruje, że białka Hsp70 uczestniczą w tworzeniu oporności komórek na podwyższoną temperaturę oraz są niezbędne do wzrostu komórek w warunkach bezstresowych [63]. Indukowanie mutacji w genie kodującym białko Hsp90 drożdży doprowadziło do identyfikacji nowego genu kodującego to białko [64]. Delecja genu kodującego białko Hsp26 drożdży (produkt tego genu uczestniczy w warunkach bezstresowych w sporulacji [65]), nie spowodowała wykrywalnych zmian w rozwoju zmutowanych komórek [66]. Przypuszczalnie, tak jak w przypadku białka DnaK, funkcja jaką spełnia białko Hsp26 drożdży może być zastąpiona przez inne białka komórkowe.

III. Regulacja ekspresji genów kodujących białka szoku termicznego

III-1. Warunki szoku

Regulacja ekspresji genów Prokaryota kodujących białka szoku termicznego zachodzi na etapie transkrypcji a genów Eukaryota na etapie transkrypcji i translacji [6—12, 67, 68].

W bakterii *Escherichia coli*, mRNA kodujący białka Hsp jest syntetyzowany *de novo* po wzroście temperatury z 30°C do 43°C. Indukcja transkrypcji genów *hsp E.coli* rozpoczyna się w czasie krótszym od 15 sekund po zmianie temperatury. Maksymalny poziom syntezy Hsp mRNA osiągany jest po upływie 4 do 8 minut [23, 69]. Badanie struktury miejsc promotorowych genów *hsp E.coli* wykazało istnienie rejonów bogatych w cytozynę (tak zwana sekwencja *hs-box*), w pozycji -35 i -10 od miejsca startu syntezy Hsp mRNA [9, 70] (Ryc. 1). Tak zmodyfikowana sekwencja promotora jest słabo rozpoznawana przez normalnie preegzystującą w komórce *E.coli* podjednostkę σ -70 (produkt genu *rpoD*) polimerazy RNA [71]. Pozytywnym regulatorem ekspresji genów *hsp E.coli* jest produkt genu *htpR* (zwany przez innych autorów *hin* lub *rpoH*) [23, 72]. Produkt genu *htpR*, białko o względnej masie cząsteczkowej 32 000 jest

nową podjednostką polimerazy RNA, nazwaną σ -32, która w warunkach podwyższonej temperatury odpowiedzialna jest za inicjację syntezy Hsp mRNA [71, 73]. Występująca przed promotorami genów *hsp* sekwencja *hs-box* wyróżnia te promotory spośród innych i jest przypuszczalnie miejscem wiązania się białka σ -32. Transkrypcja genu *htpR* jest regulowana w inny sposób niż transkrypcja genów *hsp*. Podwyższenie temperatury indukuje zarówno intensywną syntezę HtpR mRNA jak i mRNA kodującego białka szoku termicznego [74]. Mutacja w genie *htpR* uniemożliwia jednak syntezę Hsp mRNA, nie wpływa natomiast na poziom syntezy HtpR mRNA w podwyższonej temperaturze [74]. Ponieważ mutacje w genie kodującym białko σ -70 zmieniają ekspresje genów *hsp*, można przypuszczać, że zmodyfikowane przez nieznanne czynniki białko σ -70 jest odpowiedzialne za inicjację syntezy HtpR mRNA [48]. W doświadczeniach *in vitro* transkrypcja genu *htpR* wymaga obecności białka σ -70 a nie białka σ -32 [71]. Podwyższenie temperatury może w pośredni lub bezpośredni sposób wpłynąć na modyfikację białka σ -70 lub też, jak sugeruje Neidhardt i wsp. [71], zmienić konformację DNA w pobliżu promotora genu *htpR*. Zmiana konformacji DNA wpływa, jak wiadomo, na powinowactwo polimerazy RNA do sekwencji promotora [75]. Hipoteza ta jest zgodna z doświadczeniami, w których związki chemiczne indukujące zmianę superzwiniętej struktury DNA powodują także indukcję białek szoku termicznego [76].

Synteza białek Hsp *E. coli* podlega procesowi autoregulacji. W niezmutowanych komórkach *E. coli*, po upływie 4—8 minut od momentu podwyższenia temperatury synteza białek Hsp wzrasta 5 do 20 razy w porównaniu z warunkami bezstresowymi [23]. W czasie przedłużającego się szoku synteza Hsp mRNA (jak i białek Hsp) zostaje częściowo zahamowana. Po 20—30 minutach od momentu podwyższenia temperatury ustala się nowy poziom syntezy Hsp mRNA, nieznacznie tylko wyższy niż w warunkach bezstresowych [23, 57]. Bakterie *E. coli* zawierające mutację w genie kodującym białko Hsp70 (mutacja *dnaK756*), syntetyzują wydajnie białka Hsp nawet w warunkach przedłużającego się stresu [57]. Wprowadzenie do bakterii *dnaK756* DNA plazmidowego zawierającego dziki gen *dnaK*, powoduje zahamowanie syntezy białek Hsp [57]. Białko DnaK, samo będąc białkiem Hsp, uczestniczy w regulacji ekspresji własnego genu oraz innych genów kodujących białka szoku termicznego. Podwójne mutanty w genach *dnaK* i *htpR* mają fenotyp identyczny jak bakterie *htpR*⁻ [57]: nie następuje w nich indukcja syntezy białek Hsp a bakterie nie przeżywają temperatury wyższej niż 36°C. Wydaje się to wykluczać możliwość, że produkt genu *dnaK* jest represorem promotorów genów *hsp*, a białko σ -32 (produkt genu *htpR*) jest odpowiedzialne za usunięcie represora związanego z sekwencją promotora. Bardziej prawdopodobna jest natomiast hipoteza, że białko DnaK moduluje aktywność pozytywnego elementu, białka σ -32 [57].

Produkt genu *dnaK*, białko kwaśne o względnej masie cząsteczkowej 72 000 [45], posiadające aktywność 5'-nukleotydyazy [77] i ulegające autofosforylacji [50], może modulować syntezę białek Hsp na dwóch etapach: 1. Na etapie inicjacji transkrypcji Hsp mRNA. Białko DnaK może rozbić kompleks polimerazy RNA z białkiem σ -32 poprzez proteolizę, fosforylację białek wchodzących w skład kompleksu lub konkurencję z białkiem σ -32 o miejsce wiązania się z polimerazą RNA. 2. Na etapie inicjacji transkrypcji HtpR mRNA.

W komórkach Eukaryota, podobnie jak w komórkach Prokaryota, pod wpływem szoku termicznego rozpoczyna się synteza Hsp mRNA. Badania struktury miejsca promotorowego genu *hsp70 Drosophila* wykazały istnienie sekwencji niezbędnej do zainicjowania syntezy Hsp mRNA przez podwyższenie temperatury. Oprócz sekwencji TATA w pozycji -30 nukleotydów od miejsca startu syntezy mRNA istotną okazała się, powtórzona (w pozycji -85, -62), sekwencja C--GAA--TTC--G. Brak tej sekwencji wyklucza indukcję syntezy Hsp mRNA po wzroście temperatury [78, 79] (Ryc. 1). Ponieważ podobne sekwencje znaleziono przed promotorami innych genów *hsp Drosophila* [8, 78, 79], można je nazwać *hs-box* (w literaturze spotyka się także nazwy HSE, ang. heat shock element, lub Pelham-box). Wbudowanie sekwencji *hs-box Drosophila* przed promotorem genu kinazy tymidynowej wirusa herpes,

Promotory genów *hsp Escherichia coli*

geny:	-35	-10
<i>dnaK</i>	...GCATCTCCCCCTTGATGAC.....	CGA-CCCATTAGTA..
<i>groEL</i>	...CTTTTCCCCCTTGAAGGG.....	AT--CCCATTCTCT..
<i>hs-box</i>CCCC.....	CCCC.....

Promotory genów *hsp Drosophila melanogaster*

	-87	-65	-30
<i>hsp70</i>	..CTCTCGTTGGTTTCGAGAGAGCGCGCCTCGAATGTTGCG.....		TATA
<i>hsp83</i>	..ATCCAGAAGCCTCTAGAAGTTT--	CTAGAGACTTCCAGTT.....	TATA
<i>hsp26</i>TCACTTCCGGACTCT	TCTAGAA.....	TATA
<i>hs-box</i>	...C--GAA--TTC--G.....	C--GAA--TTC--G.....	

Ryc. 1. Sekwencje nukleotydowe promotorów genów *hsp* bakterii *Escherichia coli* i *Drosophila melanogaster* (według danych opublikowanych w pracach [9, 10, 78, 79]). Pozycje nukleotydów liczone są w stosunku do miejsca, z którego rozpoczyna się synteza mRNA. Sekwencje nukleotydowe, niezbędne do indukcji syntezy Hsp mRNA w czasie stresu zaznaczono jako *hs-box*.

umożliwiło indukcję tego enzymu przez szok termiczny [80]. Gen kodujący białko Hsp70 *Drosophila*, przeniesiony wraz z genem kinazy tymidynowej wirusa herpes, ulega ekspresji w warunkach podwyższonej temperatury w komórkach myszy, małpy i oocytach *Xenopus* [79, 81—83]. Przed genami *hsp* pochodzącymi z innych organizmów, zidentyfikowano także sekwencję *hs-box* homologiczną do *hs-box* *Drosophila* [32, 84, 85, 86]. Jak wynika z tych doświadczeń, nie tylko sekwencja aminokwasowa białek szoku termicznego lecz także sam mechanizm indukcji syntezy tych białek pozostał niezmienny w procesie ewolucji.

Z komórek *Drosophila* wyizolowano białko HSTF o względnej masie cząsteczkowej ok. 48 000, które wiąże się specyficznie z sekwencją *hs-box*. Ponieważ białko HSTF nie jest związane z tą sekwencją w warunkach bezstresowych uważa się, że pełni ono rolę pozytywnego elementu regulatorowego [87, 88]. W komórkach *Drosophila*, RNA polimeraza II jest odpowiedzialna za syntezę mRNA. Przynajmniej dwa białka: czynnik A i B, niezbędne są do tego, aby RNA polimeraza II rozpoznała sekwencję promotora. Zgodnie z hipotezą C. Parkera, w warunkach szoku białko HSTF jest aktywowane i zastępuje czynnik B w procesie inicjacji syntezy Hsp mRNA [87]. Wyizolowane, z komórek *Drosophila* rosnących w warunkach fizjologicznych, białko HSTF jest mniej aktywne niż białko HSTF wyizolowane z komórek poddanych działaniu podwyższonej temperatury [87]. Białko HSTF w warunkach bezstresowych jest przypuszczalnie modyfikowane przez 76 aminokwasowy polipeptyd ubikwitynę [89]. Zgodnie z hipotezą przedstawioną przez R. H. Burdona [8] szok termiczny powoduje zmianę konformacji wielu białek, do których przyłącza się ubikwityna, odpowiedzialna za ich degradację. Zapotrzebowanie komórki na ubikwitynę w pierwszych minutach po podwyższeniu temperatury jest tak duże, że ubikwityna odłączana jest od białka HSTF. Aktywowane w ten sposób białko HSTF uczestniczy w inicjacji transkrypcji Hsp mRNA (w tym także mRNA kodującego ubikwitynę [17]). Po translacji mRNA kodującego ubikwitynę, stężenie tego polipeptydu w komórce wzrasta i, w reakcji sprzężenia zwrotnego, aktywność białka HSTE maleje [8].

W czasie przedłużającego się stresu w komórkach *Drosophila*, analogicznie jak w bakteriach *E. coli*, synteza Hsp mRNA zostaje częściowo zahamowana [90]. Zablockowanie syntezy białek *Drosophila* przez dodanie cykloheksymidu już po zaindukowaniu syntezy Hsp mRNA przez wzrost temperatury, powoduje utrzymanie syntezy Hsp mRNA na wysokim poziomie, bez tendencji spadkowej przez okres następnych paru godzin [90]. Doświadczenia te sugerują, że także w komórkach Eukaryota istnieje mechanizm autoregulacji ekspresji genów kodujących białka szoku termicznego. Podobnie jak u bakterii *Escherichia coli*, białko z grupy Hsp70 *Drosophila* jest przypuszczalnie odpowiedzialne za spowolnienie syntezy białek Hsp w czasie przedłużającego się stresu [90].

Ekspresja genów *hsp* Eukaryota regulowana jest dodatkowo na etapie translacji. Preferencyjną translację Hsp mRNA zaobserwowano w układzie *in vitro* syntezy białek *Drosophila* [91]. W komórkach *Drosophila*, 5' koniec Hsp mRNA jest niezbędny aby to mRNA ulegało preferencyjnej translacji w warunkach podwyższonej temperatury [92]. W komórkach ludzkich HeLa białko szoku termicznego Hsp73 wiąże się z sekwencją poliA na końcu 3' niektórych mRNA ulegających translacji [93]. Zgodnie z hipotezą przedstawioną przez Schonfeldera i w s.p., białko Hsp73 jest odpowiedzialne za preferencyjną translację tego mRNA, z którym pozostaje w kompleksie [93]. Ponieważ białko Hsp73 syntetyzowane jest także w warunkach bezstresowych, może ono brać udział w regulacji ekspresji genów niezbędnych w procesie różnicowania się komórek.

Efektom towarzyszącym indukcji syntezy białek szoku termicznego jest defosforylacja białek rybosomalnych S6 oraz fosforylacja czynnika eIF-2 [94, 95]. Ponieważ jednak udział fosforylacji tych białek w translacji nie został jeszcze w pełni wyjaśniony, interpretacja tych wyników jest utrudniona.

Jedynym znanym przypadkiem regulacji ekspresji genów *hsp*, zachodzącej wyłącznie na etapie translacji, jest synteza białek Hsp w oocytach *Xenopus* [43, 96]. Synteza białek szoku termicznego w oocytach spowodowana jest preferencyjnym odczytaniem zapasowego Hsp mRNA, który był syntetyzowany przed szokiem [43, 96]. Mechanizm aktywacji zapasowego Hsp mRNA przez szok termiczny nie jest znany.

III-2. Warunki bezstresowe

Większość genów Eukaryota, kodujących białka Hsp90, Hsp70 i niektóre białka z grupy Hsp20, ulega ekspresji w warunkach bezstresowych. Określone białka szoku termicznego pojawiają się wybiórczo na różnych etapach różnicowania się komórek [97—114].

Wszystkie, zidentyfikowane dotychczas, produkty genów *hsp E. coli* są syntetyzowane także w warunkach fizjologicznych [9]. Dotychczas nie jest wyjaśnione, czy synteza Hsp mRNA *E. coli* w warunkach bezstresowych jest zależna od białka σ -32 czy σ -70 [71].

Za ekspresję genów *hsp* Eukaryota w warunkach bezstresowych mogą być odpowiedzialne:

1. Białko HSTF, które w małym stężeniu jest obecne w tych warunkach w komórce. W tym przypadku ekspresja genów *hsp* będzie zależała od powinowactwa białka HSTF do sekwencji hs-box [103]. Nie wykluczone jest także, że białko HSTF może być, w tych warunkach, modyfikowane przez aparat enzymatyczny komórki.
2. Inne niż hs-box sekwencje regulatorowe promotorów genów.

Synteza białek z grupy Hsp20 *Drosophila* jest indukowana przez hormony [115]. Białka Hsp20 syntetyzowane są nie we wszystkich stadiach różnicowania się komórek. Przed sekwencją kodującą gen *hsp26 Drosophila*, zidentyfikowano sekwencję nukleotydową (zlokalizowaną w innym miejscu niż sekwencja *hs-box*) odpowiedzialną za regulację ekspresji tego genu w specyficznych stadiach morfogenezy [114]. Po usunięciu sekwencji *hs-box*, gen kodujący białko Hsp26 ulega ekspresji w warunkach bezstresowych [114]. Ekspresja genu *hsp70 Drosophila*, przeniesionego do komórek HeLa, znajduje się pod kontrolą komórkowego onkogenu *c-myc* [116]. Synteza Hsp70 mRNA zależna jest od sekwencji oddalonej ok. 100 nukleotydów od sekwencji *hs-box* [116]. Także ekspresja genu *hsp72 HeLa*, w pewnych warunkach jest regulowana niezależnie od sekwencji *hs-box*. Inkubacja komórek HeLa w minimalnej pożywce bez dodatku surowicy, powoduje zahamowanie ich wzrostu w fazie S [117]. Dodanie surowicy do pożywki stymuluje syntezę paru białek, między innymi białek histonowych oraz białka Hsp72, i rozpoczyna się normalna replikacja DNA chromosomalnego. Dodanie surowicy nie indukuje syntezy białka Hsp72 w obecności antybiotyku hamującego replikację. Jeśli jednak komórki z zahamowaną przez antybiotyk replikacją DNA zostaną przeniesione do wyższej temperatury, następuje indukcja syntezy białek szoku temperaturowego, w tym białka Hsp72. Indukcja syntezy białka Hsp72 w czasie inicjacji replikacji DNA chromosomalnego sugeruje, że białko to jest niezbędne w czasie syntezy DNA.

We wszystkich badanych typach komórek *Eukaryota* zidentyfikowano tak zwane geny *hsc* (heat shock cognate) [10, 102]. Geny te posiadają niemal identyczne sekwencje jak geny *hsp*. Geny *hsc* ulegają ekspresji w warunkach bezstresowych, ale nie zaobserwowano indukcji syntezy Hsc mRNA po podwyższeniu temperatury. Produkty genów *hsc* są prawdopodobnie wersjami białek Hsp, niezbędnymi w normalnych, bezstresowych warunkach rozwoju komórki. Być może, w wyniku ewolucji i przystosowania się do zmiennych warunków zewnętrznych, utrwaliły się przed niektórymi genami *hsc* sekwencje *hs-box*, umożliwiając indukcję białek niezbędnych do przetrwania w warunkach stresowych. Ekspresja zmodyfikowanego przez insercję sekwencji *hs-box*, genu *hsc*, może być regulowana przy pomocy niezależnych mechanizmów w warunkach fizjologicznych i w warunkach szoku termicznego.

IV. Rozmieszczenie białek szoku termicznego w komórce

Stosując metody immunofluorescencji oraz frakcjonowania organeli komórkowych wykazano, że natychmiast po podwyższeniu temperatury, białka należące do grupy Hsp70 przedostają się z cytoplazmy do jądra

komórkowego i koncentrują się w jąderku [118—121]. Po usunięciu czynników stresowych białka te powracają do cytoplazmy. W czasie trwania szoku w jąderku obserwowane są agregaty białek rybosomalnych, niezdolne do tworzenia aktywnych rybosomów [122, 123]. Obecność białka Hsp70 *Drosophila* w jąderku zmienia strukturę nieaktywnych rybosomów [123]. W doświadczeniach *in vitro*, białka z grupy Hsp70 *Drosophila* i HeLa, mające wyraźne powinowactwo do hydrofobowych domen znajdujących się na powierzchni rybosomów, są uwalniane z jąderka pod wpływem hydrolizy ATP [122, 123]. W czasie trwania szoku białka Hsp70 znajdują się także w kompleksie z filamentarną strukturą białkową, odpowiedzialną za kształt komórki (ang. cytoskeleton) [11]. Białka Hsp70 przypuszczalnie uczestniczą w wiązaniu tej filamentarnej struktury do błony komórkowej [10]. Także i w tym przypadku, hydroliza ATP jest niezbędna do uwolnienia białka Hsp70 z kompleksu [10]. Białka Hsp70 *Drosophila* i HeLa usuwają, w ATP zależnej reakcji, białkową osłonę (ang. clathrin) z pęcherzyków błony, znajdujących się w cytoplazmie. Aktywność usuwania osłony białkowej tych pęcherzyków przez białko Hsp70 wzrasta 10 do 20 krotnie w czasie szoku termicznego [124, 125].

Według hipotezy przedstawionej przez Pelhama [123], białka z grupy Hsp70 wiążą się z hydrofobowymi powierzchniami innych białek i, działając jak detergent, rozbijają powstałe w czasie szoku nieaktywne struktury białkowe. Białka Hsp70 wykorzystując energię z hydrolizy ATP, uwalniają się z kompleksu, umożliwiając w ten sposób prawidłową morfogenezę białkowych struktur komórkowych.

Białka z grupy Hsp90 tworzą kompleks z receptorem hormonów sterydowych [126—128] a także oddziałują z kinazą białkową pp60^{rsv}, kodowaną przez genom wirusa RSV [129]. Prawdopodobnie białka Hsp90 zaangażowane są w transporcie receptorów hormonów sterydowych i kinazy białkowej w komórce.

Małe białka z grupy Hsp20, w czasie trwania stresu, tworzą duże, nierozpuszczalne struktury białkowe (agregaty) w okolicy jądra komórkowego. Rola tych struktur nie jest wyjaśniona. Być może ochraniają one jądro komórkowe przed działaniem podwyższonej temperatury [118, 129].

V. Indukcja syntezy białek szoku termicznego w wyniku infekcji wirusowej

Zakażenie bakterii *E. coli* bakteriofagiem lambda wywołuje indukcję syntezy białek szoku termicznego nawet w temperaturze 30°C [130—132]. Synteza białek Hsp wywołana infekcją wirusową jest zależna od białka σ -32 produktu genu *htpR* [131]. W warunkach gdy białko σ -32 jest nie-

aktywne (mutacja temperaturo-wrażliwa w genie *htpR*), nie dochodzi do indukcji syntezy białek Hsp i mimo wydajnej syntezy wczesnych białek fagowych rozwój bakteriofaga lambda jest zahamowany [131]. W genomie bakteriofaga lambda zidentyfikowano gen *cIII*, odpowiedzialny za indukcję syntezy białek Hsp [59]. Gen *cIII*, znany był wcześniej jako regulator aktywności komórkowej proteazy i pośredni induktor syntezy mRNA genów bakteriofaga lambda, odpowiedzialnych za integrację fagowego DNA do chromosomu bakteryjnego [133].

Wyizolowano mutanty bakteryjne, które uniemożliwiają rozwój bakteriofaga lambda (mutacje typu *gro*) [56]. Większość tych mutacji została zlokalizowana w genach kodujących białka Hsp: mutacje w genach *dnaK*, *dnaJ* i *groPE* blokują replikację lambda DNA [134, 135, 47], natomiast mutacje *groEL* i *groES* hamują jego morfogenezę [51, 52]. Produkty genów *dnaK* [45], *dnaJ* [46] oraz *groPE* (M. Żylicz, D. Ang, C. Georgopoulos, wyniki nie publikowane) zostały oczyszczone do homogenności. Wykazano, że są one niezbędne do inicjacji replikacji lambda DNA *in vitro*, na etapie syntezy startera RNA [46, 136, 137]. Aktywność 5'-nukleotydu białka DnaK jest niezbędna do procesu preinicjacji replikacji lambda DNA ([136] oraz M. Żylicz, wyniki nie publikowane). Białko DnaK, należące do grupy białek Hsp70, aktywuje powstały w czasie inicjacji replikacji lambda DNA kompleks preinicjacyjny [138]. Przypuszczalnie białko DnaK, w ATP-zależnej reakcji usuwa z kompleksu preinicjacyjnego białkowe inhibitory procesu replikacji DNA.

Zakażenie wirusowe komórek *Eukaryota* także indukuje syntezę białek Hsp. Zostało to stwierdzone w przypadku adenowirusa [139, 140, 141], wirusa HSV [142], wirusa sinbis [143], siman wirusa 5 [144], wirusa polyoma i SV40 [145] oraz paramykowirusa [146]. Przy zakażeniu adenowirusem hodowli komórek HeLa, specyficzny gen wirusowy *eiA* (odpowiedzialny także za transformację nowotworową) kontroluje indukcję syntezy komórkowego białka Hsp72 [141]. Natomiast przy braku indukcji białek szoku termicznego rozwój adenowirusa jest zablokowany [139]. Istnienie tej zależności sugeruje, że podobnie jak w przypadku białek Hsp *E. coli*, białka szoku termicznego organizmów eukaryotycznych mogą być niezbędne dla rozwoju wirusów w komórce. Zależność ta powinna być dokładniej zbadana. Izolacja mutacji w genach kodujących białka Hsp może doprowadzić do uzyskania komórek opornych na infekcję wirusów nowotworowych.

VI. Udział białek szoku termicznego w transformacji nowotworowej

Komórki ulegające transformacji nowotworowej posiadają podwyższony poziom syntezy białek Hsp [139]. Ekspresja przynajmniej jednego

z białek szoku termicznego (Hsp70) jest pod kontrolą komórkowego onkogeny *c-myc* [116].

Przeciwciała specyficzne dla innego komórkowego onkogeny p53, koprecypitują kompleks białka p53 z dwoma białkami stresowymi Hsp70 i Hsp68 [147]. Kompleks ten jest specyficzny i tworzy się tylko w jądrach komórek podlegających transformacji nowotworowej [147]. Onkogen p53 był uprzednio zidentyfikowany jako białko znajdujące się w kompleksie z antygenem T wirusa SV40 [148—150]. Przypuszczalnie kompleks białka p53 i antygeny T stabilizował onkogen p53 i był niezbędny do transformacji komórek wywołanej wirusem SV40 [151, 152]. Monoklonalne przeciwciała anty-p53 immunoprecypitują kompleks p53-antygen T, związany ponadto z dwoma komórkowymi białkami o względnej masie cząsteczkowej około 70 000 [153] (przypuszczalnie są to białka Hsp70 oraz Hsp68 [147]). Natomiast przeciwciała anty-T immunoprecypitują tylko kompleks antygeny T wraz z onkogenem p53 [147]. Doświadczenia te sugerują, że między antygenem T a białkiem Hsp70 może występować współzawodnictwo o wiązanie z onkogenem p53 [147]. Białko Hsp70 może podobnie jak antygen T, stabilizować onkogen p53 i w ten sposób powodować transformację nowotworową bez udziału infekcji wirusowej. Istnieje kilka analogii między antygenem T wirusa SV40 oraz białkami należącymi do grupy Hsp70:

1. antygen T jest, podobnie jak białka Hsp70, obecny w jądrze komórkowym
2. antygen T jest, podobnie jak białko DnaK 5'-nukleotydazą [154, 150]
3. antygen T uczestniczy, podobnie jak białko DnaK, w inicjacji replikacji DNA wirusowego [154, 150, 45, 46]
4. antygen T, podobnie jak białko DnaK, jest posttranslacyjnie modyfikowany przez fosforylację [154, 50].

Poznanie molekularnych podstaw działania białek Hsp70 powinno zweryfikować hipotezę o bezpośrednim udziale tych białek w transformacji nowotworowej.

VII. Uwagi końcowe

Mimo różnic w regulacji ekspresji genów *Eukaryota* i *Prokaryota*, bakteria *E. coli* syntetyzuje białka szoku termicznego o sekwencjach aminokwasowych w dużym stopniu homologicznych do sekwencji białek syntetyzowanych przez organizm ludzki. Także i mechanizmy indukcji syntezy tych białek wydają się być podobne. Prawdopodobnie mechanizm indukcji syntezy białek szoku wykształcił się w bardzo wczesnych etapach powstawania życia na ziemi, przed podziałem na *Eukaryota* i *Prokaryota*. Białka szoku termicznego są niezbędne dla ochrony komórki przed działaniem czynników stresowych, nie tylko podwyższonej

temperatury, lecz także czynników uszkodzających DNA czy zaburzających równowagę metaboliczną komórki. Niektóre z białek szoku termicznego są także syntetyzowane w warunkach bezstresowych. Nieliczne doświadczenia z tego zakresu, najlepiej udokumentowane dla bakterii *E. coli* przemawiają za tym, że białka szoku termicznego mogą być zaangażowane w procesach morfogenezy, replikacji i transkrypcji DNA, translacji, modyfikacji i degradacji białek, a także w procesach prowadzących do transformacji nowotworowej.

Praca wykonana w ramach problemu CPBR 3.13

Zaakceptowano do druku 24 lutego 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Ritossa F. M., (1962), *Experientia*, **18**, 571—582.
2. Ritossa F. M., (1984), *Exp. Cell Res.*, **36**, 515—522.
3. Kelley P., Schlesinger M. J., (1978), *Cell*, **15**, 1277—1286.
4. Lemeaux P. G., Herendeen S. L., Bloch P. L., Neidhardt C. F., (1978), *Cell*, **13**, 427—434.
5. Yamamori T., Ito K., Nakamura Y., Yura T., (1978), *J. Bacteriol.*, **134**, 1133—1140.
6. Ashburner M., Bonner J. J., (1979), *Cell*, **17**, 241—254.
7. Schlesinger M. J., Ashburner M., Tissieres A., (1982), w *Heat Shock from Bacteria to Man*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
8. Burdon R. H., (1986), *Biochem. J.*, **240**, 313—324.
9. Neidhardt F. C., VanBogelen R. A., Vaughn V., (1984), *Ann. Rev. Genet.*, **18**, 295—329.
10. Craig E. A., (1985), *Critical Rev. Biochem.*, **18**, 239—280.
11. Lindquist S., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 1151—1191.
12. Schlesinger M. J., (1986), *J. Cell. Biol.*, **103**, 321—325.
13. Schoffl F., Key J. L., (1982), *J. Mol. Appl. Gen.*, **1**, 301—306.
14. Plesset J., Palm C., McLaughlin C. S., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1340—1344.
15. Li G. C., Werb Z., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3218—3221.
16. Clark B. D., Brown I. R., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**, 1281—1285.
17. Bond U., Schlesinger M. J., (1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 949—956.
18. Garner E. W., Schneider M. J., (1985), *Nature*, **256**, 500—501.
19. Gerwick L. E., (1986), *Cancer Res.*, **45**, 3408—3474.
20. Loomis W. F., Wheeler S. A., (1982), *Dev. Biol.*, **90**, 412—418.
21. Landry J., Barnier D., Chretien P., Nicole L., Tanguay R., Marceau N., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 2457—2461.
22. Altschuler M., Masdarenhas J. P., (1982), *Plant Mol. Biol.*, **1**, 103—106.
23. Yamamori T., Yura T., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 860—864.
24. Laszlo A., Li G. C., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8029—8033.
25. Hall B., (1983), *J. Bacteriol.*, **156**, 1363—1367.
26. Li G. C., Mak J. Y., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 3816—3824.
27. Holmgren R., Livak K., Morimoto R., Freund R., Meselson M., *Cell*, **18**, 1359—1364.

28. Hackett R. W., Lis, J. T., (1983), *Nucl. Acid Res.*, **11**, 7011—7018.
29. Kelley P., Schlesinger M. J., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 267—272.
30. Voellmy R., Bromley P., Kocker H. P., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3515—3520.
31. Bardwell J. C. A., Craig E. A., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 848—852.
32. Hunt C., Morimoto R. ., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6455—6459.
33. Schlesinger M. J., Kelley P. M., Aliperti G., Malfer C., (1982), w *Heat Shock from Bacteria to Man*, str. 242—250, red. Schlesinger M. J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
34. Mirault M. E., Goldschmidt-Clermont M., Schedl P., Artavanis-Tsakonas S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5254—5260.
35. Mues G. I., Munn T. Z., Rease A., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 874—877.
36. Ingolia T. D., Slater M. J., Craig E. A., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1388—1394.
37. Sinibaldi R. M., Turpen T., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 15382—15385.
38. Corces V., Homgren R., Freund R. Morimoto R., Meselson M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5390—5395.
39. Voellmy R., Goldschmidt-Clermont M., Southgate R., Tissiers A., Levis R., Gehring W. J., (1981), *Cell*, **23**, 261—268.
40. Ingolia T. D., Craig E. A., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2360—2365.
41. Southgate R., Ayme A., Voellmy R., (1983), *J. Mol. Biol.*, **165**, 35—40.
42. Russnak R., Jones D., Condido E. P. M., (1983), *Nucl. Acis. Res.*, **11**, 3187—3192.
43. Beinz M., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3138—3142.
44. Ingolia T. D., Craig E. A., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2360—2364.
45. Żylicz M., Georgopoulos C., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8820—8825.
46. Żylicz M., Yamamoto T., McKittrick N., Sell S., Georgopoulos C., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7591—7598.
47. Ang D., Chandrasekhar G. N., Żylicz M., Georgopoulos C., (1986), *J. Bacteriol.*, **167**, 25—29.
48. Gross C. A., Grossman A. D., Libke H., Walter W., Burgess R. R., (1984), *J. Mol. Biol.*, **172**, 283—300.
49. VanBogelen R. A., Vaughn V., Neidhardt F. C., (1983), *J. Bacteriol.*, **154**, 1066—1068.
50. Żylicz M., LeBowitz J. H., McMacken R., Georgopoulos C., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6431—6435.
51. Neidhardt F. C., Phillips T. A., VanBogelen R. A., Smith M. W., Georgalis Y., Subramanian A. R., (1981), *J. Bacteriol.*, **145**, 513—525.
52. Tilly K., VanBogelen R. A., Georgopoulos C., Neidhardt F. C., (1983), *J. Bacteriol.*, **154**, 1505—1515.
53. Charette M. F., Henderson G. W., Markovitz A., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4718—4722.
54. Phillips T. A., VanBogelen R. A., Neidhardt F. C., (1984), *J. Bacteriol.*, **159**, 237—245.
55. Tanaka M., Wada M., Itikawa H., (1985), *Jpn. J. Genet.*, **60**, 27—38.
56. Georgopoulos C., Herskowitz I., (1971), w *The Bacteriophage lambda*, str. 553—567, red. Hershey A. D., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
57. Tilly K., McKittrick N., Żylicz M., Georgopoulos C., (1983), *Cell*, **34**, 641—645.

58. Kadokami Y., Wada M., Iticawa H., (1984), *Jpn. J. Genet.* **59**, 323—333.
59. Żylicz M., Tilly K., Chandrasekhar G. N., Ang D., Sell S., Jonson C., Spencer J., King J., Sharma S., Myers R., Cegielska A., Fayet O., Georgopoulos C., (1985), w *Heat Shock*, red. Craig E., str. 52, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
60. Wada M., Sekine K., Itikawa H., (1986), *J. Bacteriol.* **168**, 213—220.
61. Walker G. C., Peak K. H., Dycstra Ch. (1985), w *Heat Shock*, str. 53, red. Craig E., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
62. Craig E. A., Jacobson K., (1984), *Cell*, **38**, 845—849.
63. Craig E. A., Jacobson K., (1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3517—3524.
64. Farrelly F. W., Finkelstein D. B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5745—5751.
65. Kuetz S., Lindquist S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7323—7327.
66. Petko L., Lindquist S., (1986), *Cell*, **45**, 885—894.
67. Lawrence F., Robert-Gero M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4414—4417.
68. Beinz M., Gurdon J. B., (1982), *Cell*, **29**, 811—815.
69. Yamamori T., Yura T., (1980), *J. Bacteriol.*, **142**, 843—850.
70. Cowling D. W., Bardwell J. C. A., Craig E. A., Woolford C., Hendrix R. W., Gross C. A., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2679—2683.
71. Bloom M., Skelly S., VanBogelen R., Neidhardt F., Brot N., Weissbach H., (1986), *J. Bacteriol.*, **166**, 380—384.
72. Landick R., Vaughn V., Lau F. T., Van Bogelen R. A., Erickson J. W., Neidhardt F. C., (1984), *Cell*, **38**, 175—179.
73. Grossman A. D., Ericson J. W., Gross C. A., (1984), *Cell*, **38**, 383—387.
74. Tilly K., Erikson J., Sharma S., Georgopoulos C., (1986), *J. Bacteriol.* **168**, 1155—1158.
75. Drlica K., (1984), *Microbiol. Rev.*, **48**, 273—289.
76. Kruger J. H., Walker G., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1499—1503.
77. Bochner B. R., Żylicz M., Georgopoulos C., (1986), *J. Bacteriol.*, **168**, 931—935.
78. Pelham H. R. B., (1982), *Cell*, **30**, 517—521.
79. Pelham H. R. B., (1985), *Trends Genet.* **1**, 31—35.
80. Pelham H. R. B., Bienz M., (1982), *EMBO J.*, **1**, 1473—1478.
81. Corces V., Pellicer A., Axel R., Meselson M., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7038—7043.
82. Mirault M. E., Southgate R., Delwart E., (1982), *EMBO J.*, **1**, 1279—1284.
83. Voellmy R., Runnger D., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1776—1779.
84. Czarnecka E., Gurley W. B., Nagao R. T., Mosquera L. A., Key J. L., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3726—3730.
85. Voellmy R., Ahmed A., Schiller P., Bromley P., Rungger D., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4949—4953.
86. Schoffl F., Baumann G., (1985), *EMBO J.*, **4**, 1119—1124.
87. Parker C. S., Topol J., (1984), *Cell*, **37**, 273—276.
88. Wu C., (1984), *Nature*, **309**, 229—231.
89. Munro S., Pelham H., (1985), *Nature*, **317**, 477—478.
90. DiDomenico B. J., Bugaisky G. E., Lindquist S., (1982), *Cell*, **31**, 593—598.

91. Sanders M. M., Triemer D. F., Olsen A. S., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **261**, 2189—2196.
92. McGarry T. J., Lindquist S., (1985), *Cell*, **42**, 903—911.
93. Schonfelder M., Horsch A., Schmid H. P., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6884—6888.
94. Kennedy I. M., Burdon R. H., Leader D. P., (1985), *FEBS lett.*, **169**, 267—273.
95. de Benedetti A., Baglioni C., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **261**, 338—342.
96. Beinze M., Gurdon J. B., (1982), *Cell*, **29**, 811—815.
97. Kurtz S., Lindquist S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7323—7327.
98. Beusaude O., Babinet C., Morange M., Jacob F., (1983), *Nature*, **305**, 331—333.
99. Glaser R. L., Wolfner M. F., Lis J. T., (1986), *EMBO J.*, **5**, 747—754.
100. Kurtz S., Rossi J., Petko L., Lindquist S., (1986), *Science (Wash DC)*, **231**, 1154—1157.
101. Mason P. J., Hall L. M. C., Gausz J., (1984), *Mol. Gen. Genetics* **194** 73—78.
102. Palter K. B., Watanabe M., Stinson L., Mahowald A. P., Craig E. A., (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1187—1203.
103. Bienze M., (1985), *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 157—161.
104. Velazquez J. M., Sonoda S., Bugaiski G., Lindquist S., (1983), *J. Cell. Biol.*, **96**, 286—291.
105. Craig E. A., Ingolia T. D., Manseau L. J., (1983), *Dev. Biol.*, **99**, 418—423.
106. Zimmerman J. L., Petri W., Meselson M., (1983), *Cell*, **32**, 1161—1165.
107. Fyrberg E. A., Mahaffey J. W., Bonol B., Davidson N., (1983), *Cell*, **33**, 115—121.
108. Wadsworth S. C., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 286—291.
109. Georgopoulos C., Tilly K., Drahos D., Hendrix R., (1982), *J. Bacteriol.*, **149**, 1175—1177.
110. Sirotkin K., Davidson N., (1982), *Dev. Biol.*, **89**, 196—210.
111. Cheney C. M., Shearn A., (1983), *Dev. Biol.*, **95**, 325—329.
112. Dura J. M., (1981), *Mol. Gen. Genet.*, **184**, 381—185.
113. Rocchery M. C., DiBernardo M. G., Gividice G., (1984), *Dev. Biol.*, **83**, 173—176.
114. Cohen R. S., Meselson M., (1985), *Cell*, **43**, 737—746.
115. Morganelli C. M., Berger E. M., Pelham H. R. B., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5865—5869.
116. Kingston R. E., Bardwell J. A. S., Sharp P. A., (1984), *Nature*, **312**, 280—282.
117. Wu B. A., Kingston R. E., Morimoto R. I., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 629—633.
118. Milarski K. L., Morimoto R. I., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9517—9521.
119. Munro S., Pelham H. R. B., (1984), *EMBO J.*, **3**, 3087—3093.
120. Pelham H. R. B., (1984), *EMBO J.*, **3**, 3095—3100.
121. Welch W. J., Suhan J. P., (1985), *J. Cell. Biol.*, **101**, 1198—1211.
122. Lewis M. J., Pelham H. R. B., (1985), *EMBO J.*, **4**, 3137—3143.
123. Pelham H. R. B., (1986), *Cell*, **46**, 959—961.

124. Chappell T. G., Welch, Schlossman M. D., Palter K. B., Schlesinger M. J., Rothman J. E., (1986), *Cell*, **45**, 3—13.
125. Ungewickell E., (1985), *EMBO J.*, **4**, 3385—3391.
126. Catelli M. G., Binart N., Jung-Testas I., Renoir J. M., Baulieu E. E., Faramisco J. R., Welch W. J., (1985), *EMBO J.*, **4**, 3131—3135.
127. Sanchez E. H., Toft D. O., Schlesinger M. J., Pratt W. B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12398—12401.
128. Schun S., Yonemoto W., Brugge J., Bauer V. J., Riehl R. M., Sullivan W. F., Toft D. O., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 14292—14296.
129. Nover L., Schart K. D., Neuman D., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1648—1655.
130. Kochan J., Murialdo J., (1982), *J. Bacteriol.*, **149**, 1166—1170.
131. Tilly K., Chandrasekhar G. N., Żylicz M., Georgopoulos C., (1985), w *Microbiology-1985*, str. 322—326, red. Leive L., American Society for Microbiology, Washington D. C.
132. Drahos D. J., Hendrix R. W., (1982), *J. Bacteriol.*, **149**, 1050—1063.
133. Wulff D. L., Rosenberg M., (1983), w *Lambda II*, str. 53—73, red. Hendrix R. W., Roberts J. W., Stahl F. W., Weisberg R. A., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
134. Georgopoulos C., Tilly K., Drahos D., Hendrix R., (1982), *J. Bacteriol.*, **149**, 1175—1177.
135. Bardwell J. C. A., Tilly K., Craig E., King J., Żylicz M., Georgopoulos C., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1782—1785.
136. LeBowitz J. H., Żylicz M., Georgopoulos C., McMacken R., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3988—3992.
137. Yamamoto T., McIntyre J., Sell S., Georgopoulos C., Skowryra D., Żylicz M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 7996—7999.
138. McMacken R., Alfonso Ch., Gomes B., LeBowitz J. H., Mensa-Wilmot K., Roberts J. D., Wold M., (1987), w *Mechanisms of DNA Replication and Recombination*, red. MacMacken R., str. 227—245 Alan R. Liss,
139. Imperiale M. J., Koa H. T., Feldman L. T., Nevins J. R., Strickland S., (1984), *Cell. Biol.*, **4**, 867—874.
140. Kao H. T., Nevins J. R., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2058—2065.
141. Nevins J. R., (1982), *Cell*, **29**, 913—917.
142. La Thangue N. B., Shriver K., Dawson C., Chan W. L., (1984), *EMBO J.*, **3**, 267—277.
143. Garry R. F., Ulug E. T., Rose J. R. Jr, (1983), *Virology*, **128**, 319—323.
144. Peluso R. W., Lamb R. A., Choppin P. W., 1977, *J. Virol.*, **23**, 117—127.
145. Khandijan E. W., Turler H., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1—5.
146. Collins P. L., Hightower L. E., (1982), *J. Virol.*, **44**, 703—707.
147. Pinhasi-Kimbi O., Michalovitz D., Ben-Zee A., Oren M., (1986), *Nature*, **320**, 182—185.
148. Crawford L. V., (1980), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 179—187.
149. McCormick F., Harlow E., (1980), *J. Virol.*, **34**, 213—224.
150. Lane D. P., Maltzman W., Winchester G., (1982), *Adv. Viral Oncol.*, **2**, 23—39.
151. May E., Lasne C., Prives C., Borde J., May P. J., (1983), *J. Virol.*, **45**, 901—913.
152. Montenarh M., Kohler M., Aggeler G., Henning R., (1985), *EMBO J.*, **4**, 2941—2947.
153. Pinhasi O., Oren M., (1984), *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2180—2186.
154. Tooze J., (red), (1982), w *DNA Tumor Viruses*, t. 2, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

LILLA LACHOWICZ *

Kinazy białkowe mózgowia aktywowane przez cAMP

Brain protein kinases cyclic AMP-dependent

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Drogi fosforylacji białek w mózgowiu
- III. Kinazy białkowe zależne od cAMP
 - III-1. Struktura podjednostek enzymu
 - III-2. Polimorfizm
 - III-3. Komórkowe i subkomórkowe rozmieszczenie kinaz białkowych
 - III-4. Oddziaływanie makrocząsteczkowe
- IV. Fosforylacja białek mózgowia na poziomie rybosomów
- V. Fosfoproteiny występujące w mózgowiu
 - V-1. Synapsyna I
 - V-2. DARPP-32
 - V-3. Białko III
- VI. Inne białka mózgowia podlegające fosforylacji
 - VI-1. Kanał sodowy wrażliwy na różnicę potencjałów
 - VI-2. Kanały potasowe
 - VI-3. Hydroksylaza tyrozyny
 - VI-4. GABA — modulina
- VII. Regulacja aktywności kinazy białkowej
- VIII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Protein Phosphorylation Pathways in Brain
- III. cAMP — dependent Protein Kinases
 - III-1. Subunit Structure
 - III-2. Polymorphism
 - III-3. Cellular and Subcellular Localization
 - III-4. Macromolecular Interactions
- IV. Phosphorylation of Brain Ribosomal Protein
- V. Phosphoproteins of Brain
 - V-1. Synapsin I

* Doc. dr hab., II Zakład Biochemii IFiB, AM w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131
Łódź

V-2. DARPP-32**V-3. Protein III****VI. Other phosphorylated Proteins of Brain****VI-1. Voltage — Sensitive Sodium Channel****VI-2. Potassium Channels****VI-3. Tyrosine Hydroxylase****VI-4. GABA — Modulin****VII. Regulation of Protein Kinase Activity****VIII. Final remarks**

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — cykliczny 3', 5'adenozynomonofosforan, cGMP — cykliczny 3', 5'guanozynomonofosforan, GTP — guanozotrifosforan, DARPP-32 — białko cytosolowe mózgowia fosforylowane w obecności dopaminy i cAMP, GABA — kwas gamma aminomasłowy, D₁-DA — receptor dopaminy.

I. Wstęp

Już w 1957 r. Heald [1, 2] wysunął pogląd, że zmiany jakie pojawiają się w procesie fosforylacji białek mózgowia świnki morskiej mogą regulować przenikanie jonów przez błony komórkowe [3].

W następnych latach potwierdzono eksperymentalnie, że proces fosforylacji białek mózgowia jest jednym z podstawowych mechanizmów regulujących wiele funkcji komórek nerwowych [4—6]. Udział fosforylacji i defosforylacji białek w regulacji wielu różnych zjawisk fizjologicznych jest już dobrze udokumentowany. Między innymi fosforylacją i defosforylacją białek mózgowia tłumaczyć można także występowanie zmian behawioralnych, tolerancję lub uzależnienie od leków, a także regulację transportu przez błony (w tym jonów) [6—8]. Uważa się, że większość zewnątrzkomórkowych sygnałów w mózgowiu, pośrednio indukując fosforylację odpowiednich białek, reguluje na tej drodze wewnętrzne funkcje w mózgowiu. Dotyczy to metabolizmu produktów pośrednich, biosyntezy neuroprzekazników i ich uwalniania, także wzrostu, pobudzania oraz różnicowania i morfologii neuronów [9].

W białkach neuronalnych seryna jest tym aminokwasem, który najczęściej podlega procesowi fosforylacji. Fosfoproteiny charakteryzują się dość szybkim metabolizmem w różnych tkankach różnych gatunków zwierząt, ale najwyższą przemianę tych białek stwierdzono w mózgowiu. Zdolność endogennych białek do fosforylacji wyraźnie wzrasta we frakcjach subkomórkowych mózgowia, a zwłaszcza we frakcjach wzbogaconych w błony synaptyczne [10].

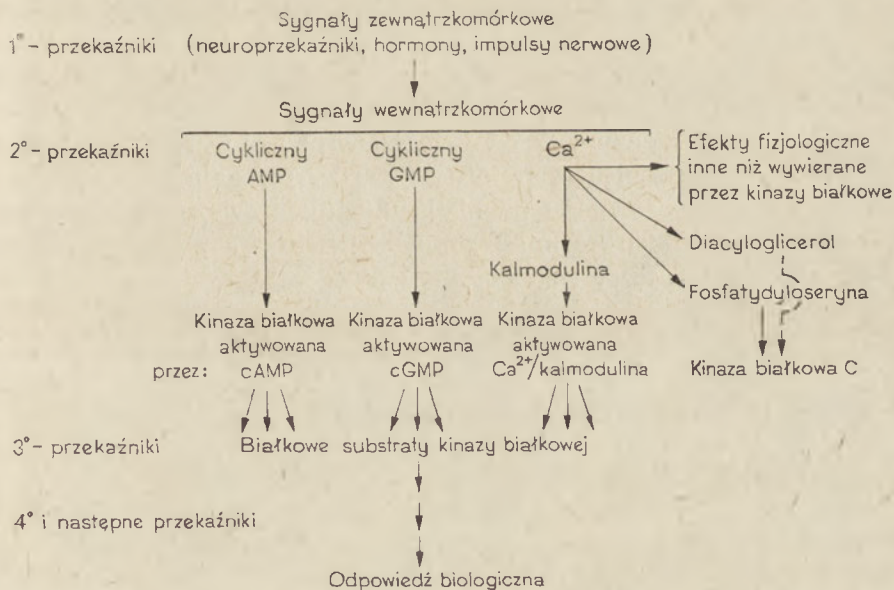
Odwracalność procesów fosforylacji i defosforylacji jest warunkiem powstawania odwracalnych zmian w strukturze białek, co powoduje zmiany stereokonformacji. Stanowi to, podobnie do regulacji czynności białek innych tkanek, również regulację funkcji białek neuronalnych.

Fosforylacja białka enzymatycznego zmienia jego właściwości katal-

lityczne, fosforylacja białek strukturalnych, zwłaszcza błonowych powodować może np. zmiany przepuszczalności kanałów jonowych błon [10]. Na tej drodze również może być pośrednio kontrolowany stan depolaryzacji błon neuronalnych mózgowia [11]. Fosforylacja i defosforylacja zależy od katalitycznej aktywności przynajmniej dwóch enzymów: kinazy białkowej i fosfatazy fosfoproteinowej. Kinaza przenosi resztę fosforanową z pozycji gamma z ATP na substrat białkowy, a fosfataza na drodze hydrolizy katalizuje usunięcie grupy fosforanowej z ufosforylowanego białka. W niniejszym artykule przedstawiono charakterystykę i rolę kinaz białkowych mózgowia aktywowanych przez cAMP oraz poglądy na temat fizjologicznej roli białek mózgowia fosforylowanych przez kinazy. Artykuł ten nie wyczerpuje w pełni omawianego zagadnienia, pozwoli jednakże zorientować się w zakresie badań i poglądów w tym temacie.

II. Drogi fosforylacji białek mózgowia

Przyjmuje się, że fosforylacja białek mózgowia odgrywa podstawową rolę w przekazywaniu biologicznych odpowiedzi na różnorodne, ze-



Ryc. 1 przedstawia drogi specyficznych odpowiedzi biologicznych we „wrażliwych” neuronach wywołanych zewnątrzkomórkowymi sygnałami. Uruchomienie wielostopniowych, różnorodnych efektorów w konsekwencji prowadzi do odpowiedzi neuronu. Wśród przekaźników 2 stopnia — cykliczny adenozylo 3', 5'-monofosforan jest szczególnie interesujący ze względu na istniejące obecnie sugestie, że aktywacja kinazy białkowej zależnej od cAMP i w następstwie fosforylacja białek wydaje się być główną jeżeli nie jedyną drogą działania cAMP w komórkach eukariotów, zwłaszcza w ośrodkowym układzie nerwowym [13].

wnątrzkomórkowe sygnały odbierane przez różne tkanki. Udział fosforylacji białek w molekularnych mechanizmach stanowiących odpowiedź na bodźce powstające w mózgowiu przedstawiono schematycznie na rycinie 1 zgodnie z danymi Nestlera i Greengard z 1984 r. [12].

Kinazy białkowe występujące w tkankach mózgowia dają się podzielić na kilka klas. Podstawą klasyfikacji jest rodzaj związku odpowiedzialnego za aktywację kinazy. Wyróżniamy mianowicie klasę kinaz aktywowanych przez cAMP, klasę kinaz aktywowanych przez cGMP oraz klasę kinaz aktywowanych przez Ca^{2+} , wśród których wyróżnia się kilka podklas, zależnie od związku współdziałającego w aktywacji z jonami wapnia. Są to fosfatydyloseryna, inne fosfolipidy błonowe oraz inne lipidy jak diacyloglicerole [14—17]. Na szczególną uwagę zasługuje enzym zwany kinazą białkową C. Jest on niewrażliwy na cykliczne nukleotydy, a jego „uczulenie” na wapń zachodzi pod wpływem diacyloglicerolu. Aktywacja enzymu zachodzi także pod działaniem proteazy zależnej od Ca^{2+} . Kinaza C fosforyluje m.in. histon H_1 , białko rybosomalne S 6, eukariotyczny czynnik inicjujący e IF-2, syntazę glikogenu, nikotynowy receptor acetylocholinyl i inne substraty w mózgowiu [18—28]. Kinazy białkowe aktywowane przez cykliczne nukleotydy, jak cAMP i cGMP, uznane są za główne wewnątrzkomórkowe receptory białkowe dla przekaźników drugiego stopnia występujących w mózgowiu i innych tkankach. Stwierdzono, że kinazy aktywowane przez cAMP lub cGMP wykazują wyraźną homologię strukturalną; wysunięto stąd przypuszczenie o ewolucji obu enzymów od jednego wspólnego „prebiałka” (ancestral) [6, 29, 30]. Różnice cechujące te kinazy polegają na specyficzności substratowej, wrażliwości na białka modulatorowe, immunochemicznej reaktywności i ich rozmieszczeniu potwierdzają pogląd, że kinazy te regulują różne procesy fizjologiczne.

III. Kinazy białkowe aktywowane przez cAMP

Mózgowie w porównaniu z innymi tkankami i narządami organizmu charakteryzuje się najwyższą zawartością kinaz białkowych (ATP: fosfotransferaza białkowa) zależnych od obecności cAMP (EC 2.7.1.37). Wskazuje to na szczególne znaczenie tego enzymu w funkcjach neuronalnych i synaptycznych [31]. Należy podkreślić, że zwłaszcza błony synaptyczne wykazują oprócz szczególnie wysokiej aktywności kinazowej, także wysoką aktywność fosfatazy fosfoproteinowej oraz znaczne stężenie substratów białkowych zdolnych podlegać fosforylacji. Sugeruje się, że te trzy białka występujące w błonach synaptycznych jako kompleks, umożliwiają szybką odpowiedź na odpowiedni bodziec w postaci fosfo-

rylacji i defosforylacji [10, 32]. Cykliczność procesów fosforylacji i defosforylacji stanowi m.in. podstawę mechanizmu „otwierania” i „zamykania” kanałów błonowych.

III-1. Struktura podjednostek

Kinaza białkowa zależna od obecności cAMP jest tetramerem składającym się z dwóch rodzajów podjednostek: podjednostki regulatorowej R (masa cząsteczkowa — 49 000—55 000 datonów) i podjednostki katalitycznej C (masa cząsteczkowa — 40 000). W nieobecności cAMP holoenzym jest nieaktywny; zawiera on dwie podjednostki R połączone wiązaniem dwusiarczkowym, łączące się z dwiema podjednostkami C ($R_2 C_2$) [33—40]. Punkt izoelektryczny holoenzymu wynosi 5,5 i różni się od PI podjednostki R (4,8) i podjednostki C (7,0). Wiązanie cAMP z podjednostką R nieaktywnego holoenzymu obniża jego powinowactwo do podjednostki C i powoduje dysocjację holoenzymu na dwie wolne podjednostki C, które wykazują aktywność fosfotransferazową [40, 41]. Podjednostka R po dysocjacji holoenzymu pozostaje w kompleksie z cAMP. Każda podjednostka R zawiera dwa miejsca wiążące cAMP, prowadzące do synergistycznej aktywacji kinazy białkowej.

III-2. Polimorfizm

Do niedawna uważano, że kinazy białkowe aktywowane przez cAMP z mózgowia i innych tkanek nie różnią się od siebie znacząco. Wykazano jednakże różnice w ich podjednostkach regulatorowych. Kinaza białkowa mózgowia np. zawiera strukturalnie jednolite podjednostki katalityczne C, ale dwie różne podjednostki regulatorowe określane jako podjednostka regulatorowa R_I i R_{II} . Podjednostki regulatorowe R_I i R_{II} kinazy białkowej z mózgu różnią się powinowactwem do Mg^{2+} — ATP, cAMP i jego analogów, zdolnością do autofosforylacji, wiązaniem podjednostki katalitycznej, rodzajem antygeny, sekwencją aminokwasową, masą cząsteczkową (49 000 i 52 000—55 000), a także rozmieszczeniem w mózgowiu [43—49, 36—40, 49—60].

Jak wspomniano, zaobserwowano różnice w podjednostkach regulatorowych kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP izolowanych z mózgu, mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych nawet tego samego gatunku. Stwierdzono je właśnie w obrębie podjednostek regulatorowych R_{II} , a dotyczą one właściwości immunochemicznych i związanej z tym ruchliwości elektroforetycznej [62]. Przypuszcza się, że odrębność mózgowej podjednostki R_{II} może wynikać z ewolucji tkanki nerwowej [63]. Jak dotychczas nie stwierdzono różnic w podjednostce R_I kinaz białkowych izolowanych z różnych tkanek. Wykazano natomiast heterogenność wyizolowanej z mózgowia podjednostki R_{II} , wynikającą — jak

sugeruje się — z modyfikacji posttranslacyjnych [9, 14, 64]. Podjednostka R_{II} kinazy białkowej mózgowia aktywowana przez cAMP może wiązać w jednym miejscu wiążącym kompleks kalmodulina-wapń, blokując w ten sposób jedno z dwu miejsc wiązania cyklicznego nukleotydu. Tworzenie kompleksów kalmodulina-wapń z podjednostką R_{II} przebiega znacznie sprawniej w obecności kalcineuryny [64, 65, 66]. Należy podkreślić, że regulowanie aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP poprzez kompleks kalmodulina-wapń wykazano wyłącznie w przypadku kinazy mózgowej [64]. W komórkach neuronalnych wykryto kinazę białkową zarówno w cytosolu (tzw. „rozpuszczalną”), jak i związaną z błonami [3, 9, 65—73]. Podjednostka regulatorowa (R) kinazy aktywowanej przez cAMP związanej z błonami wydaje się służyć jako błonowe „zakotwiczenie” (anchor) podjednostki katalitycznej C [65—67].

III-3. Komórkowe i subkomórkowe rozmieszczenie kinaz białkowych

Poziom kinaz białkowych zależnych od cAMP w różnych obszarach mózgowia kształtuje się podobnie [67—69]. W mózgowiu szczura występuje i kinaza związana z błonami i rozpuszczalna: zawartość kinazy białkowej z podjednostką R_{II} jest kilkakrotnie wyższa niż z podjednostką R_I . Właśnie kinaza białkowa zależna od cAMP posiadająca podjednostkę R_{II} ma być charakterystyczna dla komórek neuronalnych. Podanie bowiem do prądkowia mózgu szczura neurotoksyny (kwasu kainowego) wywołuje wyraźną redukcję aktywności kinazy białkowej zawierającej podjednostkę R_{II} , podczas gdy aktywność kinazy z podjednostką R_I zmienia się tylko nieznacznie. Neuronalne rozmieszczenie kinazy białkowej z podjednostką R_{II} potwierdzono immunocytochemicznie stosując przeciwciała przeciw podjednostce R_{II} . Wysokie stężenie podjednostki R_{II} stwierdzono w neuronach, ale w różnych rodzajach neuronów zaobserwowano też różnice stężeń w poszczególnych subkomórkowych kompartmentach [70, 71]. Dość interesujące wydaje się spostrzeżenie, że kinaza białkowa z podjednostką R_I występuje głównie we frakcji mielinowej [72]. Chociaż w większości tkanek kinazy białkowe aktywowane przez cAMP występują we frakcji enzymów rozpuszczalnych, w mózgowiu występuje w równych ilościach rozpuszczalna i tzw. nierozpuszczalna związana z błonami. Obie formy enzymu, zarówno rozpuszczalna, jak i związana z błonami kinaza zawierająca podjednostki regulatorowe R_{II} wykazują identyczne właściwości biochemiczne i immunologiczne. Stwierdzono obecność kinazy białkowej zależnej od cAMP we wszystkich subkomórkowych frakcjach mózgu szczura, a najwyższą specyficzną aktywność tego enzymu zanotowano w cytosolu i frakcji wzbogaconej w błony synaptyczne [68]. Również we frakcji jądrowej komórek mózgowia i innych tkanek wołu wykryto kinazę białkową. Przy-

puszcza się, że niektóre hormony i neuroprzekazniki, które podnoszą poziom komórkowego cAMP mogą indukować przemieszczanie podjednostki katalitycznej C kinazy białkowej z cytoplazmy do jądra [74]. Stwierdzono również, że agonista adrenergicznego receptora (izoprotterenol) powodując przesunięcie podjednostki C do jądra w komórkach nowotworowych mózgowia, zmienia fosforylację histonów [75, 76] i indukuje de novo syntezę różnych białek w tych komórkach [77]. Sugeruje się także przemieszczanie podjednostki R_{II} kinazy białkowej do jądra komórkowego [78, 79]. Te i inne obserwacje wskazują, że pewne efekty jakie wywierają kinazy białkowe aktywowane przez cAMP na regulację ekspresji genów mogą zachodzić także poprzez przemieszczanie podjednostek C lub R do jądra komórkowego.

III-4. Oddziaływania makrocząsteczkowe

W pracach ostatnich lat wykazano wysokie powinowactwo wiązania aktywowanej przez cAMP kinazy białkowej ze specyficznymi białkami cytoplazmatycznym. Wiązanie to zachodzić ma poprzez podjednostkę regulatorową R_{II} . Wykryto wysoce specyficzne oddziaływania podjednostki R_{II} kinazy i białka zwanego MAP-2 z mikrotubul (microtubule-associated protein 2) [65, 80, 81, 82], kalcineuryną [83] i innymi białkami cytosolu mózgowia o nieokreślonych bliżej funkcjach [84, 85]. W cytosolowej frakcji mózgowia zawierającej MAP-2 stwierdzono około 30% aktywności kinazy białkowej aktywowanej cAMP przypadającej na całe mózgowie [80, 81, 85]. Białko MAP-2 (masa cząsteczkowa 270 000) związane z neuronalnymi mikrotubulami, stanowi zatem ważny substrat kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP [86, 87]. Obszary występujące w MAP-2 wiążące podjednostkę R_{II} i mikrotubule, fosforylowane są przez kinazę białkową posiadającą podjednostkę R_{II} . MAP-2 jest również fosforylowane zarówno przez kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} , jak i innych cyklicznych nukleotydów [87—89]. Stwierdzono, że fosforylacja MAP-2 przez zależną od cAMP kinazę białkową zmniejsza aktywność biologiczną mikrotubul oraz ich współdziałanie z aktyną i neurofilamentami [90, 91]. Rozmieszczenie MAP-2 i kinazy białkowej w dendrytach neuronów sugeruje, że proces fosforylacji MAP-2 może spełniać ważną funkcję w transporcie neurotubularnym [92—96]. Mózgowe białko MAP-2 wykazuje również pewną aktywność „fosfatazową” [9].

IV. Fosforylacja białek mózgowia na poziomie rybosomów

Stosunkowo wiele informacji na temat fosforylacji białek mózgowia uzyskano w izolowanych układach rybosomalnych [97—105]. Fosforylacja białek rybosomalnych jest procesem niezwykle aktywnym w móz-

gowiu, a odbiciem tego jest wysoka aktywność właśnie układu kinaz białkowych jak i wysoka aktywność polirybosomów w tej tkance. Stwierdzono, że rybosomalne białko kory mózgowej młodych szczurów, podlegające niezwykle szybkiej fosforylacji, zwane białkiem S6 (masa cząsteczkowa około 32 000) wchodzi w skład małej podjednostki 40S rybosomu. Inne rybosomalne białka tej podjednostki rybosomu określane jako S 3, L 6, L 19, podlegające fosforylacji *in vitro* wiążą się z takimi czynnikami procesu translacji jak np. czynnik inicjujący u eukariontów (e IF-2), oraz tRNA i rRNA. Natomiast białko S 6, uczestniczy w wiązaniu mRNA z mniejszą podjednostką rybosomu [100]. Białko S 6 uznaje się za główny składnik rybosomalnej podjednostki 40 S. Zawiera ono kilka reszt seryny, której grupy hydroksylowe *in vivo* niezmiernie łatwo ulegają fosforylacji. Okazało się pozatem, że podanie dibutyrylo-cAMP nawet doostrzewnowo wyraźnie nasila ten proces, podobnie jak podanie 3-izobutyrylo-1-metyloksantyny inhibitora fosfodiesterazy. Natomiast dibutyrylo-cGMP nie stymuluje fosforylacji tego białka w korze mózgowej szczura [97].

Stwierdzono, że cAMP uczestniczy w procesie fosforylacji białka rybosomalnego S 6. Nie udało się wykazać, czy nukleotyd ten bierze udział w fosforylacji innych białek rybosomalnych mózgowia. Dane te wskazują, że fosforylacja białek rybosomalnych mózgowia może odbywać się z udziałem kinaz białkowych zależnych i niezależnych od cAMP. Potwierdzają to ostatnie prace, wykazujące, że nawet białko S 6 fosforylowane jest przez kinazy białkowe aktywowane zarówno przez cAMP, jak i przez pozostałe czynniki (Ryc. 1) [101, 102]. Wyniki te sugerują, że niektóre neuroprzekaźniki i czynniki, które podnoszą aktywność cyklicznej adenylowej lub inhibują aktywność fosfodiesterazy mogą wywierać wpływ na rozwój i funkcję obszarów mózgowych poprzez zmiany w procesie fosforylacji białka rybosomalnego. Zmianom w fosforylacji rybosomalnego białka S 6 mogą towarzyszyć zmiany w strukturze i funkcji podjednostki 40 S. Należy podkreślić, że zmiany w procesie fosforylacji białka S 6 wynikają prawdopodobnie również z defektów metabolicznych, które pośrednio lub bezpośrednio wpływają na syntezę białka. Stwierdzono bowiem zależność między fosforylacją białek rybosomalnych i regulacją syntezy białek w mózgowiu niedojrzałych szczurów, a występowaniem hiperfenyloalaninemii. Podanie 1 mg L-Fen na g masy ciała (L-fenyloalaniny) obniża wydatnie inkorporację ³²P ortofosforanu do korowych białek podjednostki 40 S. Mniej wyraźne zmiany w tych warunkach zaobserwowano w procesie fosforylacji białek podjednostki 60 S. „Obciążenie” fenyloalaniną powoduje wyraźną inhibicję fosforylacji białek podjednostki 40 S, zwłaszcza białka S 6 [87]. Wcześniejsze badania wykazały, że nawet umiarkowane „obciążenie” zwierzęcia egzogenną L-fenyloalaniną powoduje maksymalny wzrost stężenia tego aminokwasu w osoczu szczurów. Podobny wzrost stężenia fenyloalaniny

w osoczu i korze mózgowej obserwuje się u ludzi z fenyloketonurią [103, 104], a zjawisku temu towarzyszy zahamowanie aktywności mózgowej kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP [103, 104].

Warto również podkreślić, że fosforylacja „kwaśnych” białek podjednostki 60 S może regulować funkcję eukariotycznego czynnika elongacji EF-1 w procesie transkrypcji [105].

V. Fosfoproteiny występujące w mózgowiu

Dotychczas znaleziono około 70 specyficznych, neuronalnych fosfoprotein, które są substratami kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP, cGMP i Ca^{2+} , a prawdopodobnie to tylko część podlegających fosforylacji białek tkanki nerwowej. Nierównomierne pod względem ilościowym i jakościowym rozmieszczenie fosfoprotein w neuronach, wynika zapewne z funkcji jakie spełniają one w danym obszarze komórki nerwowej. Różnią się one między sobą ciężarem cząsteczkowym, ilością i rodzajem reszt aminokwasowych, które ulegają fosforylacji, punktem izoelektrycznym i rozpuszczalnością w kwasach.

Spośród najlepiej poznanych neuronalnych substratów: MAP-2 i ufosforylowana podjednostka regulatorowej kinazy R_{II} były krótko omawiane w podrozdziałach III.4, III.3. Charakterystykę innych białek substratowych kinaz mózgowia, jak synapsyny I, białka zwanego DARPP-32, którego fosforylacja regulowana jest przez dopaminę i cAMP, tzw. białka III i innych przedstawię poniżej. Białka te stosuje się jako „substraty porównawcze” w ocenie właściwości i funkcji innych mało znanych, a fosforylowanych przez kinazy mózgowia białek neuronalnych [12, 17, 68, 69, 106].

V-1. Synapsyna I

Synapsyna I, określana poprzednio jako białko I [106], jest ważnym substratem kinaz białkowych mózgowia zależnych od obecności cAMP i Ca^{2+} . Białko to składa się z dwu podjednostek synapsyny Ia i synapsyny Ib (masa cząsteczkowa 86 000 i 80 000 odpowiednio) połączonych w stosunku molarnym 1:2. Jest to białko specyficzne dla neuronów [17, 108, 109—111], a występujące głównie we wszystkich zakończeniach nerwowych [112—114], na zewnętrznej powierzchni pęcherzyków synaptycznych [108—118]. Proces fosforylacji synapsyny I w presynaptycznych zakończeniach nerwowych jest specyficznie regulowany przez serotoninę, dopaminę i prawdopodobnie przez noradrenalinę [107, 119—126]. W procesie fosforylacji synapsyny I przez kinazę białkową zależną od cAMP reszta fosforanowa przyłącza się do seryny. Jest to tzw. I miejsce fosforylacji. W miejscu tym seryna może być również fosforylowana

na przez kinazy białkowe aktywowane kompleksem Ca^{2+} -kalmodulina. Dwie inne „reszty” seryny w cząsteczce synapsyny I (zwane miejscem II) są fosforylowane wyłącznie przez kinazy białkowe aktywowane kompleksem Ca^{2+} -kalmodulina [15, 16, 124]. I chociaż funkcja synapsyny I nie jest dokładnie poznana, jej obecność w dużym stężeniu na powierzchni pęcherzyków synaptycznych sugeruje, że białko to może brać udział w regulacji uwalniania neuroprzekazników.

V-2. DARPP-32

DARPP-32 (dopamine — and cAMP — regulated phosphoprotein) jest białkiem cytosolowym (masa cząsteczkowa 32 000), kwasorozpuszczalnym, termostabilnym, które fosforylowane jest w nienaruszonych komórkach nerwowych w odpowiedzi na podanie dopaminy i cAMP [17, 68]. Fosforylacji podlega wówczas pojedyncza reszta treoniny [17, 124, 125]. Ufosforylowana forma DARPP-32 funkcjonuje jako potężny inhibitor fosfatazy proteinowej — 1. W przeciwieństwie do synapsyny I DARPP-32 nie podlega fosforylacji przez kinazy białkowe aktywowane Ca^{2+} i kalmodulinę. Stosując metody biochemiczne i immunochemiczne, w różnych obszarach mózgowia szczura stwierdzono zbieżność rozmieszczenia DARPP-32 oraz receptorów dopaminy (zwłaszcza podklasę D_1 -DA) sprzężonych z cyklazą adenylową [122, 126, 127]. DARPP-32 działa jako inhibitor fosfatazy proteinowej 1, ale nie znane są jego prawdopodobnie inne jeszcze biologiczne funkcje. Wzrost stężenia ufosforylowanej postaci tego białka może odgrywać pewną rolę w aktywacji receptorów D_1 -DA, powodując fizjologiczne odpowiedzi w neuronach wrażliwych na dopaminę. Może również poprzez regulację aktywności fosfatazy białkowej uczestniczyć w procesach defosforylacji substratów neuronalnych [9, 123, 128].

V-3. Białko III

Jako trzecie w kolejności wyizolowane białko z mózgowia podlegające fosforylacji z udziałem kinazy tzw. białko III składa się z dwóch podjednostek oznaczanych jako białko IIIa i IIIb (masa cząsteczkowa 74 000 i 55 000). Białko III okazało się ważnym substratem neuronalnym kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP, które występuje głównie w pęcherzykach synaptycznych. Jego fosforylacja regulować ma przemieszczanie neuroprzekazników z pęcherzyków synaptycznych. Pewne właściwości białka III i synapsyny I są podobne. Oba białka mogą być fosforylowane w następstwie działania różnych neuroprzekazników, które powodują wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP i Ca^{2+} [129], które to czynniki aktywują kinazę białkową.

VI. Inne białka mózgowia podlegające fosforylacji

Z licznej grupy białek mózgowia podlegających fosforylacji poprzez kinazy białkowe aktywowane przez cAMP przedstawiam tylko kilka z nich, których budowa i właściwości są dość dobrze poznane, a ich rola fizjologiczna w procesach zachodzących w mózgowiu uznana jest za szczególnie ważną.

VI-1. Kanał sodowy wrażliwy na różnicę potencjałów w mózgowiu

Analiza łańcuchów polipeptydowych występujących w kanałach sodowych mózgu szczura wykazała, że składa się on z 3 podjednostek; podjednostka alfa (masa cząsteczkowa 260 000), beta₁ (masa cząsteczkowa 39 000) i beta₂ (masa cząsteczkowa 37 000) występujące w stosunku molarnym 1:1:1 [130—132]. Stwierdzono, że podjednostka alfa, która odgrywa główną rolę w funkcjonowaniu kanału Na⁺⁺ ulega fosforylacji przez endo- jak i egzogenną kinazę białkową zależną od obecności cAMP. Kanał sodowy jest odpowiedzialny za bierne przemieszczanie Na⁺ i powstawanie potencjału czynnościowego. Przyjmuje się, że fosforylacja kanałów jonowych może wpływać na funkcję kanałów w dwojaki sposób; stanowić może jeden z pośrednich etapów (obligatoryjnych) całego ciągu „wydarzeń”, w wyniku których kanały otwierają się lub zamykają w odpowiedzi na działanie przekaźników 1-go stopnia, lub zachodzący proces fosforylacji może być czynnikiem modulującym „wrażliwość” kanałów na inne przekaźniki 1-go stopnia [133].

VI-2. Kanały potasowe

Jakkolwiek białka tworzące kanały K⁺ nie zostały dotąd wyizolowane i scharakteryzowane, wysunięto sugestię, że aktywność ich może być regulowana poprzez fosforylację zależną od cAMP [134]. Mikroinjekcja podjednostki C kinazy proteinowej wywołuje aktywację synaptyczną identyczną do uzyskanej przez serotoninę i cAMP. Stwierdzono, że wzrasta wówczas przewodzenie przez kanały K⁺ aktywowane przez Ca²⁺ [117—119]. Wyniki te wykazują, że aktywacja kinazy białkowej zależnej od cAMP stanowi niezbędny warunek regulacji czynności kanałów K⁺ wywołanej poprzez neuroprzekaźniki. Nie wiadomo narazie czy regulacja funkcji kanałów K⁺ poprzez cAMP i kinazy zachodzi na drodze fosforylacji białek wchodzących w skład kanałów, czy poprzez fosforylację białek modulatorowych, które następnie modyfikują działanie kanałów K⁺.

VI-3. Hydroksylaza tyrozyny

Jest to enzym o masie cząsteczkowej 60 000, który katalizując pierwszą reakcję ciągu biosyntezy katecholamin, limituje ich powstawanie. Aktywacja enzymu polega na jego fosforylacji przez kinazę białkową zależną od obecności cAMP. Reakcja fosforylacji enzymu w tkance nerwowej może być częścią mechanizmu przyspieszenia syntezy katecholamin, jaką obserwuje się np. w odpowiedzi na przewodzenie impulsu nerwowego lub stymulację przez neuroprzekaźniki [135, 136].

VI-4. GABA-modulina

Białko to (masa cząsteczkowa 16 500) obniża znacznie powinowactwo miejsc wiążących do kwasu gamma-aminomasłowego. Oczyszczona GABA-modulina z mózgu szczura jest fosforylowaną przez kinazę białkową aktywowaną przez cAMP. Proces fosforylacji GABA-moduliny przywracać ma powinowactwo do miejsc wiążących GABA w błonach synaptycznych [137].

VII. Regulacja aktywności kinazy białkowej

Regulacja aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP zależna jest w głównej mierze od sprawności układu cykazy adenylowej-fosfodiesterazy (CA/PDE) [138]. Wiadomo również, że różne hormony i neuroprzekaźniki jak dopamina, serotonina, histamina i inne regulują poziom cAMP w mózgu ssaków [139—142]. Aktywność cykazy adenylowej, enzymu związanego z błoną komórkową, jest pod stałą kontrolą czynników pobudzających lub hamujących proces biosyntezy cAMP, które działają za pośrednictwem odpowiednich receptorów. Hormony i neuroprzekaźniki „pobudzające” działają poprzez białko regulatorowe cykazy, stymulujące wiązania GTP zwane białkiem G_s , natomiast neuroprzekaźniki i hormony, które hamują aktywność cykazy łączą się z białkiem G_i odpowiedzialnym za inhibicję wiązania GTP. Oba białka G_s i G_i regulują zatem aktywność podjednostki katalitycznej cykazy adenylowej. Aktywność cykazy adenylowej w mózgowiu może być regulowana również poprzez kompleks Ca^{2+} kalmodulina [143].

Jak omówiono powyżej, aktywacja kinazy białkowej zależnej od obecności cAMP zachodzi wówczas, kiedy cAMP wiąże się z podjednostką R nieaktywnego holoenzymu powodując uwolnienie wolnej, aktywnej podjednostki C. Mechanizm inaktywacji kinazy białkowej polega na reasocjacji podjednostki R i C w następstwie hydrolizy cAMP spowodowanej nukleotydową fosfodiesterazą [114]. Proces autofosforylacji podjednostki R_{II} obniża stopień reasocjacji kinazy białkowej II

rodzaju, zależnej od cAMP [35]. Wykazano, że hormony sterydowe mogą zmieniać stopień fosforylacji podjednostki R_{11} . Tak uzyskany efekt może stanowić pewną formę działania hormonów sterydowych [144, 146].

Zawartość podjednostek R i C kinazy białkowej w tkankach prawidłowych jest jednakowa [50]. Natomiast w komórkach niektórych hodowli stwierdzono zwiększoną ilość podjednostek R [147, 148]. Nadmiar ten może wynikać z podawania cAMP lub jego pochodnych, do płynów hodowlanych. Rola „nadmiaru” podjednostki R jest narazie nieznana. Przypuszcza się, że wiążąc się z cAMP mogą one stanowić osłonę komórki przed ich nadmiarem, a w konsekwencji utrzymywać niską podstawową aktywność kinazy białkowej [147, 148].

Wiele tkanek zawiera również termostabilne białko będące inhibitorem kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP. Funkcja tego inhibitora jest przedmiotem intensywnych badań. Wydaje się, że jego działanie polega na hamowaniu wolnej podjednostki katalitycznej kinazy i stanowić może ważny czynnik regulacji aktywności kinazy białkowej zależnej od cAMP również w mózgowiu [149—153].

VIII. Uwagi końcowe

Zmiany w strukturze białek neuronalnych uzyskane w wyniku fosforylacji stanowią podstawę regulacji wielu różnych zjawisk komórkowych, takich jak biosynteza i uwalnianie neuroprzekaźników, transport aksoplazmatyczny, powstawanie potencjałów postsynaptycznych, przewodzenie kanałów jonowych, kształt i ruchliwość neuronalna. Fosforylacja niektórych białek neuronalnych prowadzi do powstania takich zjawisk biochemicznych, które stanowią podłoże procesów pamięci. Wysłunięto koncepcje, że fosforylacja białek presynaptycznych lub czy postsynaptycznych, która zachodzić może m.in. w wyniku przemijającego „ułatwienia” lub inhibicji transmisji synaptycznej stanowić może podstawę procesów pamięci krótkotrwałej (short-term). Natomiast podłożem biochemicznym pamięci długotrwałej (long-term) może być fosforylacja takich białek, które biorą udział w regulacji ekspresji genu, co może prowadzić do bardziej trwałych modyfikacji transmisji synaptycznej [133].

Wielka różnorodność zjawisk neurofizjologicznych powstających między innymi w wyniku fosforylacji białek mózgowia jest odbiciem dużej specyficzności działania złożonego układu kinaza białkowa/fosfataza. Na aktywność tego układu działają pośrednio lub bezpośrednio cyklaza, adenylowa, fosfodiesteraza nukleotydomowa, hormony, neurohormony oraz specyficzne inhibitory kinaz białkowych mózgowia aktywowanych przez cAMP [149—152]. Bliższe omawianie tych zagadnień wykraczałoby poza ramy tego artykułu.

Fizjologiczna rola i regulacja działania kinaz białkowych mózgowia podobnie jak identyfikacja i charakterystyka specyficznych dla nich substratów są przedmiotem aktywnych badań. Dostarczają bowiem interesujących informacji na temat modulacji wielu neurofizjologicznych procesów. Właściwości kinaz białkowych mózgowia i innych tkanek aktywowanych przez cAMP są podobne, ale występują też ważne różnice, dotyczące głównie ich stężenia i subkomórkowego rozmieszczenia. Ponadto mózgowie wydaje się zawierać znacznie większą różnorodność substratów dla kinaz w porównaniu z innymi tkankami. W związku z tym fosforylacja białek mózgowia stanowi szczególnie ważny mechanizm molekularny poprzez który większość sygnałów zewnątrzkomórkowych reguluje wewnątrzkomórkowe funkcje mózgowia.

Materiały opracowano w ramach realizowanego programu CPBP nr. 06.03 temat 3.14 koordynowanego przez Instytut Farmakologii PAN w Krakowie.

Zaakceptowano do druku dnia 31 stycznia 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Heald P. J., (1957) *Biochem. J.* **66**, 659—663.
2. Heald P. J., (1962) *Nature, (London)* **193**, 451—454.
3. Wiegant V. M., Zwierz H., Gispen W. H., (1981) *Pharmac. Ther.* **12**, 463—490.
4. Routtenberg A., Morgan D. G., Conway R. G., Schmidt M. J., Ghetti B., (1981) *Brain Res.* **222**, 323—333.
5. Roberts S., Ashy C. D., (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 288—296.
6. Lincoln T. M., Corbin J. D., (1978) *J. Cyclic Nucleot. Res.* **4**, 3—41.
7. Szoka F. C., Ettinger M. J., (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 6536—6543.
8. D'Callaghan J. P., Williams N., Clonet D. H., (1978) *J. Phar. Exper. Therap.* **208**, 96—105.
9. Nairn A. C., Hemmings H. C., Greengard P., (1985) *Ann. Rev. Miochem.* **54**, 831—976.
10. Oestreicher A. B., Zwierz H., Gispen W. H., (1982) *Progress in Brain Research* **55**, 349—367.
11. Jolles J., Zwierz H., Schotman P., Gispen W. H., (1980) w *Synaptic Constituents in Health and Disease*. Eds. Pergamon, London str. 269—270.
12. Nestler E. J., Greengard P., (1984) *Advances in Cyclic Nucleot. and Protein Phosphor. Res.* **17**, 483—488.
13. Liu A. Y. C., (1984) *TIPS* **0165**, 106—108.
14. Hathaway D. R., Adelstein R. S., Klee C. B., (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8183—8189.
15. Kennedy M. B., Greengard P., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1293—1297.
16. Kennedy M. B., McGuinness J., Greengard P., (1983) *J. Neurosci.* **3**, 818—831.
17. Nestler E. J., Greengard P., (1984) w *Catecholamines: Basic and Peripheral Mechanisms*, Eds. Liss A. R. N. York 9—22.

18. Takai Y., Kashimoto A., Inoue M., Nishizuka Y. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7603—7609.
19. Inoue M., Kashimoto A., Takai Y., Nishizuka Y., (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7610—7616.
20. Takai Y., Kshimoto A., Kawahara Y., Mori T., Nishizuka Y., (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3692—3695.
21. Takai Y., Kashimoto A., Kikkawa U., Mori T., Nishizuka Y., (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 1218—1224.
22. Kashimoto A., Takai Y., Mori T., Kikkawa U., Nishizuka Y., (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2273—2278.
23. Kaibuchi K., Takai Y., Nishizuka Y., (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 7146—7149.
24. Kikkawa U., Takai Y., Minskuchi R., Inohara S., Nishizuka Y., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13341—13348.
25. Wise B. C., Glass D. B., Chou C. H., Raynor R. L., Katon N., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 8448—8495.
26. LePeuch C. J., Ballester R., Rosen O. M., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6858—6862.
27. Schatzman R. C., Grifo J. A., Marrick W. C., Kuo J. F., (1983) *FEBS Lett.* **159**, 167—170.
28. Haganir R., L., Albert K. A., Greengard P., (1983) *Soc. Neurosci. Astr.* **9**, 578.
29. Glass D. E., Krebs E. G., (1980) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 363—388.
30. Takio K., Wade R. D., Smith S. B., Krebs E. G., Walsh K. A., Titani K., (1984) *Biochemistry* **23**, 4207—4218.
31. Walter U., Greengard P., (1981) *Curr. Top. Cell. Regul.* **19**, 219—255.
32. Ueda T. Rudolph S. A. and Greengard P., (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 492—503.
33. Nimmo H. G., Cohen P., (1977) *Adv. Cyclic Nucleo. Res.* **8**, 145—266.
34. Walsh D. A., Krebs E. G., (1973) *Enzymes* **7**, 555—581.
35. Rubin C. S., Rosen O. M., (1975) *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 831—837.
36. Erlichman J., Rosenfield R., Rosen O. M., (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 5000—5003.
37. Rosen O. M., Erlichman J., (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 7788—7794.
38. Maeno H., Reyes P. L., Ueda T., Rudolph S. A., Greengard P., (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **164**, 551—559.
39. Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G., (1975) *Adv. Cyclic Nucleo. Res.* **6**, 241—251.
40. Rosen O. M., Erlichman J., Rubin C. S., (1975) *Adv. Cyclic Nucleo. Res.* **5**, 253—263.
41. Corbin J. D., Sugden P. H., West L., Flockhard D. A., Lincoln T. M., McCarthy D., (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 3997—4003.
42. Hofmann F., (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1559—1564.
43. Builder S. E., Beavo J. A., Krebs E. G., (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2350—2354.
44. Hofman F., Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G., (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 7795—7801.
45. Corbin J. D., Rannels S. R., Flockhard D. A., Robinson-Steiner A. M., Tigani M. C., (1982) *Eur. J. Biochem.* **125**, 259—266.
46. Hartl F. T., Roskoski R., (1983) *Biochemistry* **21**, 5175—5183.

47. Robinson-Steiner A. M., Beebe S. J., Rannels S. R., Corbin J., D., (1984) *J. Biol. Chem.* **256**, 10596—10605.
48. Zoller M. J., Kerlavage A. R., Taylor S. S., (1970) *J. Biol. Chem.* **254**, 2408—2412.
49. Fleischer N., Rosen O. M., Reichlin M., (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 54—58.
50. Hofman F., Bechtel P. J., Krebs E. G., (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 1441—1447.
51. Rubin C. S., Fleischer N., Sarkar D., Erlichman J., (1981) *Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif.* **8**, 1333—1346.
52. Kapoor C., Beavo J. A., Steiner A., (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 12427—12432.
53. Gill G. N., McCune R. W., (1979) *Curr. Top. Cell. Regul.* **15**, 1—45.
54. Lohmann S. M., Walter U., Greengard P., (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 9985—9992.
55. Takio K., Smith S. B., Krebs E. G., Walsh K. A., Titani K., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2544—2548.
56. Hashimoto E., Takio K., Krebs E. G., (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 5604—5607.
57. Titani K., Sasagawa T., Ericsson L. H., Kumar S., Smith S. B., (1984) *Biochemistry* **23**, 4193—4199.
58. Takio K., Smith S. B., Krebs E. G., Walsh K. A., Titani K., (1984) *Biochemistry* **23**, 4200—4206.
59. Walter U., Uno I., Liu A. Y. C., Greengard P., (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6494—5000.
60. Corbin J. B., Kelly S. L., Park C. R., (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 218—225.
61. Rubin C. S., Rangel-Aldao R., Sarkar D., Erlichman J., Fleischer N., (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3797—3805.
62. Hartl F. T., Roskoski R., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3950—3955.
63. Greengard P., (1979) *Fed. Proc.* **38**, 2208—2217.
64. Klee C. B., Krinks M. H., Hathaway D. R., Flockhard D. A., (1982) *Calmodulin and Intracellular Ca⁺⁺ Receptors.* ed. Kikuchi N. York 303—311.
65. Eppler C. M., Palazzolo M. J., Schwartz J. H., (1982) *J. Neurosci.* **2**, 1692—1704.
66. Jennings K. R., Kaczmarek L. K., Hewick R. M., Dreyer W. J., Strumwasser F., (1982) *J. Neurosci.* **2**, 158—168.
67. Reichard L. F., Kelly R. B., (1983) *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 912—917.
68. Walter U., Kanof P., Schulman H., Greengard P., (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 6275—6280.
69. Walaas S. I., Nairn A. C., Greengard P., (1983) *J. Neurosci.* **3**, 291—301.
70. Walaas S. I., Nairn A. C., Greengard P., (1983) *J. Neurosci.* **3**, 302—311.
71. De Camilli P., (1984) *Adv. Cyclic Nucleot. Prot. Phosph. Res.* **17**, 489—499.
72. De Camilli P., Moretti M., Navone F., Lohmann S. M., Walter U., (1984) *Adv. Cyclic Nucleot. Prot. Phosphoryl. Res.* **17A**, 140.
73. Bradbury J. M., Thompson R. J., (1984) *Biochem. J.* **221**, 361—368.
74. Johnson E. M., (1982) *Handb. Exp. Pharmacol.* **58**, 507—533.

75. Jungmann R. A., Lakes M. S., Harrison J. J., Siter P., Jones C. E., (1981) *Cold Harbor Conf. Cell. Prolif.* 8, 1109—1125.
76. Jungmann R. A., Harrison J. J., Milkowski D., Lee S. K., Scheveppe J. S., Miles M. F., (1982) *Prog. Brain Res.* 56, 163—178.
77. Browning E. T., Niklas J., (1982) *J. Neurochem.* 39, 336—341.
78. Cho-Chung Y. S., Archibald D., Clair T., (1979) *Science* 205, 1390—1392.
79. Cho-Chung Y. S., (1980) *J. Cyclic Nucl. Res.* 6, 163—177.
80. Vallee R. B., DiBartolomeis M. J., Theurkauf W. E., (1981) *J. Cell. Biol.* 90, 568—576.
81. Theurkauf W. E., Vallee R. B., (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3284—3290.
82. Miller P., Walter U., Theurkauf W. E., Vallee R. B., De Camilli P., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5562—5566.
83. Hathaway D. R., Adelstein R. S., Klee C. B., (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8183—8189.
84. Sarkar D., Erlichman J., Rubin C. S., (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9840—9846.
85. Lohmann S. M., De Camilli P., Einig I., Walter U., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6723—6727.
86. Sloboda R. D., Rudolf S. A., Rosenbaum J. L., Greengard P., (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 177—181.
87. Vallee R., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3206—3210.
88. Theurkauf W. E., Vallee R. B., (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 7883—7886.
89. Yamauchi T., Fujisawa H., (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 975—981.
90. Nishida E., Kuwaki T., Sakai H., (1981) *J. Biochem.* 90, 575—578.
91. Selden S. C., Pollard T. D., (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 7064—7071.
92. Matus A., Bernhardt R., Hugh-Jones T., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3010—3014.
93. Wiche G., Briones E., Hirt H., Krepler R., Artlieb U., Denk H., (1983) *EMBOJ.* 2, 1915—1920.
94. De Camilli P., Miller P. E., Navone F., Theurkauf W. E., Vallee R. B., (1984) *Neuroscience* 11, 819—846.
95. Huber G., Matus A., (1984) *J. Neurosci.* 4, 151—160.
96. Caceres A., Binder L. J., Payne M. R., Bender P., Rebhun L., Steward O., (1984) *J. Neurosci.* 4, 394—410.
97. Gispen W. H., Routtenberg A., (1982) *Progress in Brain Res.* 56, 195—211.
98. Francis A. A., Roberts S., (1978) *Fed. Proc.* 37, 1406.
99. Francis T. A., Roberts S., (1980) *Fed. Proc.* 39, 1743.
100. Terao K., Ogata K., (1979) *J. Biochem* 86, 605—617.
101. Lastick S. M., McConkey E. H., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 583—585.
102. Traugh J. A., (1981) *Biochem. Actions of Hormones Ed. Acad. Press.* 8, 167—208.
103. Bogucki B., Roberts S., (1979) *Fed. Proc.* 38, 947.
104. Roberts S., Morelos B. S., (1976) *J. Neurochem.* 26, 387—400.
105. Möller W., Slobin L. I., Amons R., Richter D., (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)* 72, 4744—4748.
106. Berman R. F., Hullihan J. P., Kinnier W. J., Wilson J. E., (1984) *Neurosci.* 13, 965—971.
107. Greengard P., (1976) *Nature* 260, 101—108.

108. Sieghart W., Forn J., Schwarz R., Coyle J. T., Greengard P., (1978) *Brain Res.* **156**, 345—350.
109. De Camilli P., Ueda T., Bloom F. E., Battenberg E., Greengard P., (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5977—5981.
110. De Camilli P., Cameron R., Greengard P., (1983) *J. Cell. Biol.* **96**, 1337—1354.
111. Fried G., Nestler E. J., De Camilli P., Stjärne L., Olson L., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2717—2721.
112. Fried G., Nestler E. J., De Camilli P., Stjärne L., Olson L., Lunberg J. M., Hökfelt T., Quimet C. C., Greengard P., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2717—2721.
113. De Camilli P., Cameron R., Greengard P., (1983) *J. Cell. Biol.* **96**, 1337—1354.
114. Hultner W. B., Schiebler W., Greengard P., De Camilli P., (1983) *J. Cell. Biol.* **96**, 1374—1388.
115. Ueda T., Greengard P., Berzins K., Cohen R. S., Blomberg F., Grab D. J., Siekevitz P., (1979) *J. Cell. Biol.* **83**, 308—319.
116. De Camilli P., Harris S. H., Huttner W. B., Greengard P., (1983) **96**, 1355—1373.
117. Navone F., Greengard P., De Camilli P., (1984) *Science* **226**, 1209—1211.
118. Castellucci V. F., Kandel E. R., Schwartz J. H., Wilson F. D., Nairn A. C., Greengard P., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7492—7496.
119. Siegelbaum S. A., Camardo J. S., Kandel E. R., (1982) *Nature* **299**, 413—417.
120. dePeyer J. E., Cachelin A. B., Levitan I. B., Reuter H., (1982) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **79**, 4207—4211.
121. Dolphin A. C., Greengard P., (1981) *Nature* **289**, 76—78.
122. Dolphin A. C., Greengard P., (1981) *J. Neurosci.* **1**, 192—203.
123. Nestler E. J., Greengard P., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7479—7483.
124. Huttner W. B., DeGennaro L. J., Greengard P., (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1482—1488.
125. Hemmings H. C., Nairn A. C., Aswad D. W., Greengard P., (1984) *J. Neurosci.* **4**, 99—110.
126. Hemmings H. C., Nairn A. C., Greengard P., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 14491—14497.
127. Keibarian J. W., Calne D. B., (1979) *Nature* **277**, 93—96.
128. Nestler E. J., Greengard P., (1982) *Nature* **296**, 452—454.
129. Browning M. D., Huang C. K., Greengard P., (1982) *Soc. Neurosci. Abstr.* **8**, 794.
130. Hartshorne R. P., Messner D. J., Coppersmith J. C., Catterall W. A., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 388—391.
131. Hartshorne R. P., Catterall W. A., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4620—4624.
132. Hartshorne R. P., Catterall W. A., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1667—1675.
133. Nestler E. J., Greengard P., (1983) *Nature* **583**—588.
134. Kaczmarek L. K., Jennings K. R., Strumwasser F., Nairn A. C., Walter U., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7487—7491.

135. Weiner N., (1980) *Monogr. Natural Sci.* **7**, 146—160.
136. Haycock J. W., Meligeni J. A., Bennett W. F., Waymire J. C., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12641—12648.
137. Wise B. C., Guidotti A., Costa E., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 886—890.
138. Erneux Ch., Miot F., Dumont J. E., (1985) *Hormones and Cell. Regulation ed. Elsevier Science Publishers B. V.* **9**, 169—184.
139. Nestler E. J., Walaas S. I., Greengard P., (1984) *Science* **225**, 1357—1364.
140. Heagstrand L. R., Kanof P. D., Greengard P., (1976) *Nature* **260**, 163—165.
141. von Hungen K., Roberts S., Hill D. F., (1975) *Brain Res.* **84**, 257—267.
142. Janiszewska G., Lachowicz L., Wojtkowiak R., (1984) *Acta Physiol. Pol.* **35**, 199—206.
143. Cheung W. Y., Bradham L. S., Lynch T. J., Lin Y. M., Tallant E. A., (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 1055—1062.
144. Rangel-Aldas R., Rosen O. M., (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 3375—3380.
145. Liu A. Y. C., Greengard P., (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 568—572.
146. Liu A. Y. C., Walter U., Greengard P., (1981) *Eur. J. Biochem.* **114**, 539—548.
147. Walter U., Costa M. R. C., Breakefield Y. O., Greengard P., (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3251—3255.
148. Prashad N., Rosenberg R. N., Wischmeyer B., Ulrich C., Sparkman D., (1979) *Biochemistry* **18**, 2717—2725.
149. Costa M., (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 1311—1318.
150. Kuo W. N., Williams J. L., Floyd-Jones T., Duggans C. F., Boone D. L., (1979) *Experientia* **35**, 997—998.
151. Szmigielski A., (1981) *Arch. Int. Pharmacodyn.* **249**, 64—71.
152. Szmigielski A., Guidotti A., (1979) *Neurochem. Res.* **4**, 189—199.
153. Levitan I. B., Adams W. B., Lemos J. R., Novak-Hofer I., (1983) *Prog. Brain Res.* **58**, 71—76.

GRAŻYNA PALAMARCZYK *

Heterogenność struktury reszt cukrowych N-glikoprotein jako wynik procesów kotranslacyjnych

Cotranslational processing results in the heterogeneity of the oligosaccharide structure of N-glycoproteins

Spis treści

I. Obróbka N-glikoprotein

I. Czynniki decydujące o zajęciu glikozylacji i heterogenności struktur oligosacharydowych N-glikoprotein.

Contents

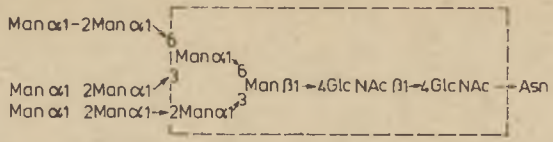
I. Processing of N-glycoproteins

II. Control of glycosylation and heterogeneity of the oligosaccharide structure of N-glycoproteins

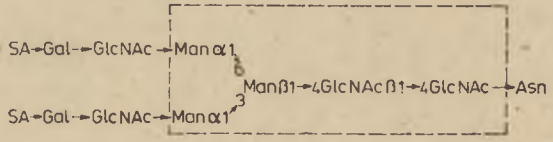
Wykaz stosowanych skrótów: Asn — asparagina, DolP — fosforan dolicholu, EndoH — endo- β -N-acetyloglukozoaminidaza, Fuc — fukoza, Gal — galaktoza, Glc — glukoza, GlcNac — N-acetyloglukozoamina, GlcNac-1-P — N-acetyloglukozaminylo-1-fosforan, Man — mannoza, Man-6-P — mannozylo-6-fosforan, RER — szorstkie endoplazmatyczne retikulum, RNaza — rybonukleaza, SA — kwas N-acetyloneuraminowy, Ser — seryna, UDPGlc — urydylodifosfoglukoza, UDPGlcNac — urydylodifosfo-N-acetyloglukozamina.

N-glikoproteiny, w których reszty cukrowe łączą się z białkiem wiązaniem N-glikozydowym, stanowią istotną ilościowo i funkcjonalnie grupę wśród glikoprotein błonowych i rozpuszczalnych komórek eukariontów. Struktura ich reszt oligosacharydowych, choć heterogenna, daje się zakwalifikować do trzech podstawowych rodzajów. Są to: glikoproteiny wielomannozowe (high mannose type), składające się w części oligosacharydowej jedynie z reszt mannozy (Man) i N-acetyloglukozoaminy (GlcNac). Glikoproteiny złożone (complex type), zawierają obok Man i GlcNac, reszty galaktozy (Gal), fukozy (Fuc) i kwasu N-acetyloneuraminowego (SA). Glikoproteiny hybrydowe (Hybrid type) zawierają w swojej części oligosacharydowej elementy obu poprzednich struktur (Ryc. 1).

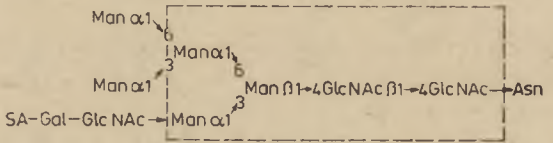
* Doc. dr hab., Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa



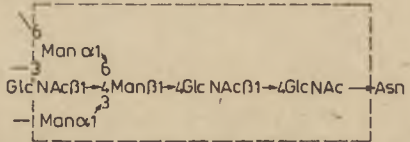
struktura wielomannozowa (High mannose type)



struktura złożona (Complex type)

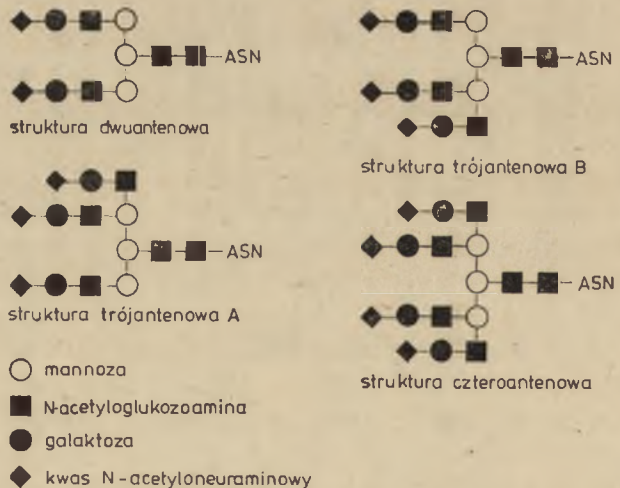


struktura hybrydowa (Hybrid type)



struktura złożona lub hybrydowa, przecięta (Complex or hybrid bisected type)

Ryc. 1 Typowe struktury reszt oligosacharydowych N-glikoprotein.



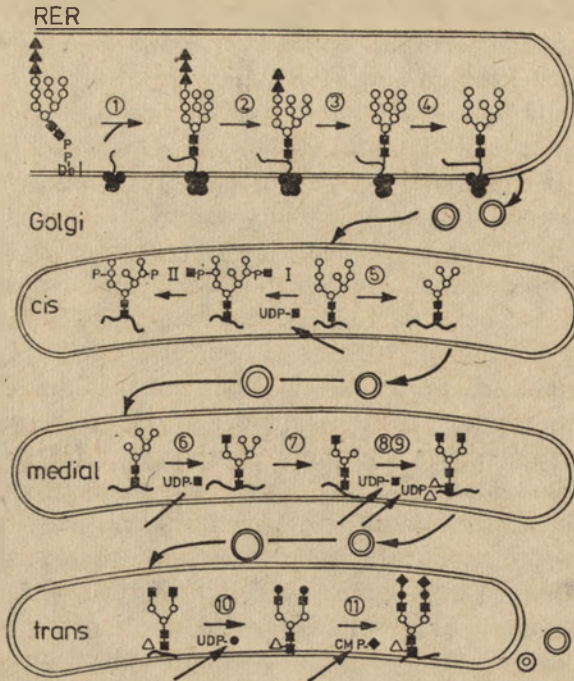
Ryc. 2 Rozgałęzione struktury oligosacharydów złożonych (complex type).

Struktury złożone mogą być mniej lub bardziej skomplikowane. Na rycinie 1 przedstawiono strukturę typu dwuantenowego (biantenary, complex type), oprócz których mogą występować struktury trzy- i czteruantenowe (tri- and tetra- antenary), por. rycinę 2, różniące się ilością rozgałęzień w łańcuchu oligosacharydowym. Obraz komplikuje występowanie struktur złożonych i hybrydowych przeciętych (bisected), zawierających cząsteczkę N-acetyloglukozoaminy połączoną wiązaniem β 1-4 glikozydowym z resztą mannozylową w części rdzeniowej oligosacharydu (Ryc. 1). Analiza około 50-ciu glikoprotein o znanej strukturze reszt cukrowych wykazała, że oligosacharydy typu złożonego znajdowały się zwykle w pobliżu N-końca glikozylowanego peptydu i były typowymi dla białek rozpuszczalnych. Natomiast oligosacharydy wielomannozowe występowały, obok złożonych, w glikoproteinach błonowych na ogół w pobliżu C końca akceptora peptydowego [1].

Wszystkie wymienione rodzaje glikoprotein posiadają pewien powtarzający się element struktury, jest nim struktura tzw. części rdzeniowej oligosacharydu (struktura znajdująca się wewnątrz zaznaczonego prostokąta na (Ryc. 1)): N-glikozylacja białek, prowadząca do powstawania różnorodnych struktur oligosacharydowych w cząsteczkach N-glikoprotein zachodzi wg tego samego schematu opisywanego wielokrotnie poprzednio, również w Postęпах Biochemii [2]. Jest to proces wielostopniowy, wymagający udziału tzw. przenośnika lipidowego, którym w komórkach eukariontów jest fosforan dolicholu. Reszty cukrowe przenoszone są kolejno z odpowiednich nukleozydo-dwufosfo-cukrów na fosforan dolicholu, co prowadzi do powstania dolichylo-dwufosfo-oligosacharydu ($\text{DolPPGlcNac}_2\text{Man}_6\text{Glc}_3$). Struktura części rdzeniowej oligosacharydu jest identyczną ze strukturą części rdzeniowej N-glikoprotein, przedstawioną na rycinie 1. Oligosacharyd $\text{GlcNac}_2\text{Man}_6\text{Glc}_3$ zostaje następnie przeniesiony w całości na resztę β -amidową asparaginy, glikozylowanego peptydu. Część oligosacharydowa glikopeptydu podlega teraz kolejnym obróbkom (processing) rezultatem których jest różnorodność struktur przedstawionych na rycinie 1. Glikozylacja fosforanu dolicholu, a następnie akceptora peptydowego jest katalizowana przez enzymy związane z błonami szorstkiego endoplazmatycznego retikulum (RER) i jest procesem kotranslacyjnym [2, 3]. Obróbka (processing) reszt cukrowych zachodzi częściowo wewnątrz RER częściowo wewnątrz aparatu Golgiego.

I. Obróbka (processing) N-glikoprotein

Kolejne etapy przebiegu obróbki reszt cukrowych doczekały się ostatnio szczegółowego opisu w znakomitym artykule przeglądowym opublikowanym w Annual Review of Biochemistry [3]. Dlatego też ogra-



Symbole przedstawiają:

- N-acetyloglukozoamina
- mannoza
- ▲ glukoza
- ◆ galaktoza
- ◆ kwas N-acetylneuraminowy
- △ fukoza

Ryc. 3. Przebieg obróbki (processing) reszt cukrowych N-glikoprotein. Kolejne reakcje są katalizowane przez następujące enzymy: 1 — oligosacharydo-transferaza, 2 — α -glukozydaza I, 3 — α -glukozydaza II, 4 — ER α -1,2 mannozydaza, I — N-acetyloglukozoamino-fosfo-transferaza, II — GlcNac-1-P-dwuester-1-GlcNac glikozydaza, 5 — Golgi α -mannozydaza, I, 6 — GlcNac-transferaza I, 7 — Golgi α -mannozydaza II, GlcNac-transferaza II, 9 — fukozylotransferaza, 10 — galaktozylotransferaza, 11 — sialylotransferaza.

Rysunek przedrukowano za zgodą Wydawnictwa Annual Review of Biochemistry.

Reproduced, with permission, from the Annual Review of Biochemistry, Vol. 54, 1985 by Annual Reviews Inc.

niczę się tutaj jedynie do skrótowego przedstawienia tego procesu. Obróbka (Ryc. 3) rozpoczyna się od kolejnego odcięcia trzech reszt glukozy, przez dwa różne enzymy, glukozydazę I i II, występujące w błonach RER. Glukozydaza I odcina końcową resztę glukozy związaną α 1,3 glukozydowo (Reakcja 2, Ryc. 3). Hydroliza dwóch pozostałych reszt glukozy, związanych α -1,2 glikozydowo, jest katalizowana przez glukozydazę II (Reakcja 3, ryc. 3). Po odcinięciu reszt glukozy następuje hydro-

liza reszt mannozylowych związany α -1,2 glukozydowo. Reakcja ta jest katalizowana przez co najmniej dwa enzymy. Mannozydaza RER odcina jedną resztę cukrową (Reakcja 4, Ryc. 3). Na tym etapie podlegający obróbce glikopeptyd zostaje przetransportowany do wnętrza aparatu Golgiego od strony jego części *cis* (*cis* cisternae). Wędrując poprzez cysterne środkową (*medial*) do *trans* podlega kolejnym obróbkom prowadzącym do ostatecznego ukształtowania struktury jego części oligosacharydowej i białkowej. Charakterystyczna grupa glikoprotein, enzymy lizosomalne, podlega reakcji fosforylacji reszt mannozylowych, prowadzącej do powstania tzw. „struktury markerowej” tj. Mannozylo-6-fosforanu (Man-6-P). Reakcja ta jest katalizowana przez dwa enzymy związane z najcięższą frakcją błon aparatu Golgiego tzw. cysterną *cis*. GlcNac-fosfo-transferaza przenosi GlcNac-1-P na fosforylowaną resztę mannozy, (Reakcja I, Ryc. 3), a następnie GlcNac-1-P-dwuester-1-GlcNac glikozydaza odcina resztę N-acetyloglukozaminy, odkrywając ufosforylowaną na 6-tym węglu resztę mannozylową (Reakcja II, Ryc. 3). Uważa się, że struktura Man-6-P jest sygnałem decydującym o prawidłowo ukierunkowanym transporcie cząsteczek do wnętrza lizosomów. Nielizosomalne glikoproteiny podlegają działaniu związanej z błonami aparatu Golgiego mannozydazy I, odcinającej kolejne reszty mannozy związane α -1,2 glikozydowo, co prowadzi do powstania struktury Man₃GlcNac₂ (Reakcja 5, Ryc. 3). Kolejne reakcje obróbki będą dotyczyły już tylko tych glikoprotein, których ostateczna struktura oligosacharydowa będzie typu złożonego. Transferaza GlcNac przenosi resztę N-acetyloglukozaminy na Man₃GlcNac₂ oligosacharyd co stanowi sygnał dla innego enzymu mannozydazy II do odcięcia dwóch kolejnych reszt mannozy związanych 1,3 i 1,6 α -glikozydowo (Reakcja 7, Ryc. 3) i przeniesienia na podlegający obróbce glikopeptyd następnej reszty GlcNac przez GlcNac-transferazę II. Najlżejsza frakcja błon aparatu Golgiego (*trans* cisternae) zawiera enzymy przenoszące takie cukry jak galaktozę (Gal) i kwas N-acetylneuraminowy (SA), (Reakcje 10 i 11, Ryc. 3). Tak uformowana cząsteczka opuszcza aparat Golgiego i jest transportowana do swego miejsca przeznaczenia tj. do błony plazmatycznej i błon bądź struktur wewnątrzkomórkowych. Przypuszcza się, że wewnątrzkomórkowy mechanizm transportu glikoprotein jest podobny jak białek sekrecyjnych tzn. odbywa się systemem pęcherzyków wędrujących od błon szorstkiego endoplazmatycznego retikulum do aparatu Golgiego. Pęcherzyki te zawierają glikoproteiny podlegające obróbce. Natomiast już całkowicie uformowane glikoproteiny zostają zamknięte w innego typu pęcherzykach, które opuszczają aparat Golgiego i wędrują do błony plazmatycznej lub struktur wewnątrzkomórkowych. Proces „zamykania” glikoprotein w transportujących je pęcherzykach jest regulowany przez receptory rozpoznające określone struktury białkowe lub cukrowe [4].

II. Czynniki decydujące o zajściu glikozylacji i heterogenności struktur oligosacharydowych N-glikoprotein.

Analiza struktury 1-szo rzędowej glikozyłowanych białek wykazała, że glikozylacji ulegają jedynie te reszty asparaginy, które znajdują się wewnątrz tzw. „sekwencji markerowej” Asn-X-Ser, gdzie X może oznaczać dowolny aminokwas. Istnienie takiej sekwencji jest warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym do zajścia glikozylacji. Jedynie ok. 1/3 „sekwencji markerowych” białek eukariontów posiada glikozyłowane reszty asparaginy. Badania wykonane na modelowych układach, w których stosowano liniowe i cykliczne syntetyczne peptydy jako akceptory reszt cukrowych, wykazały, że do przeniesienia oligosacharydu na taki akceptor konieczne jest wytworzenie wiązania wodorowego wewnątrz sekwencji markerowej. Powstaje ono pomiędzy atomem tlenu grupy hydroksylowej seryny lub treoniny z jednej strony a atomem wodoru grupy β -amidowej asparaginy z drugiej. Tworzenie tego rodzaju wiązań jest najbardziej prawdopodobne jeśli peptydowy akceptor przybiera strukturę β -skrętu lub inną strukturę pętli. Analiza modeli przestrzennych stosowanych akceptorów peptydowych wykazała ponadto, że wytworzenie wiązania wodorowego jest szczególnie faworyzowane jeśli asparagina zajmuje 1-szą lub 3-cią pozycję wewnątrz sekwencji markerowej [5]. Powyższe badania były wykonane w układach modelowych, w których jako donora reszt cukrowych używano dolichylo-dwufosfo-GlcNac₂, a reakcja była katalizowana przez frakcję mikrosomów z wątroby cielęcej. Zajście takiej reakcji jest możliwe jedynie *in vitro*, w układzie bezkomórkowym. W hodowlach komórkowych i w skrawkach tkankowych zachodzi bowiem synteza dolichylo-dwufosfo-oligosacharydu (DolPPGlcNac₂Man₉Glc₃), który w całości jest przenoszony na akceptor peptydowy. Tym niemniej, wnioski wyciągnięte na podstawie rezultatów eksperymentów wykonanych w układach *in vitro*, dają się rozszerzyć na występujące w komórkach eukariontów glikoproteiny. Ich analiza strukturalna wykazała bowiem, że glikozyłowane są przede wszystkim te sekwencje markerowe, które w cząsteczce akceptorowego białka znajdują się w strukturze β -skrętu.

Heterogenność struktur oligosacharydowych, związanych z poszczególnymi resztami asparaginy jest rezultatem ich obróbki opisanej w rozdziale poprzednim. Poszukiwanie przyczyn heterogenności jest więc poszukiwaniem czynników regulujących przebieg procesów zachodzących podczas wędrówki glikopeptydu od szorstkiego endoplazmatycznego retikulum, poprzez kolejne frakcje aparatu Golgiego. Badania nad glikozylacją białek wirusowych wykazały, że przebieg obróbki glikopeptydów jest zależny od aktywności poszczególnych enzymów w komórce gospodarza. I tak cząsteczka wirusa grypy (typ A/WSN) zawiera glikozyłowane białko hemaglutyninę, dające się rozdzielić po trawieniu pronazą na

dwa glikopeptydy HA₁ i HA₂. Jeśli cząsteczki wirusa są namnażane w komórkach nerki wołu (MDBK cells) w cząsteczce HA₁, znajduje się pięć reszt oligosacharydowych typu złożonego, jedna wielomannozowa i jedna o strukturze hybrydowej. Natomiast glikopeptydy HA₂ zawiera jedną glikozylowaną resztę asparaginy a struktura połączonego z nią oligosacharydu jest typu złożonego [6]. Ten sam szczep wirusa namnażany w fibroblastach zarodków kurczęcia (primary chick embryo fibroblast) zawiera hemagglutyninę, która w podjednostce HA₂ jest glikozylowana wielomannozową strukturą oligosacharydową [7]. Jednakże układ enzymatyczny komórek gospodarza nie jest najpewniej jedynym czynnikiem decydującym o strukturze reszt oligosacharydowych glikoprotein wirusa. Przypuszcza się, że pewna ilość informacji determinujących przebieg obróbki reszt cukrowych jest zakodowana w strukturze glikozylowanego białka. Przemawiają za tym wyniki następujących eksperymentów: różne szczepy wirusa grypy tego samego typu (A/WSN), namnażane w komórkach tego samego gospodarza tj. w komórkach nerki psa (MDCK cells), zawierały różne ilości glikopetydów typu HA₁ i HA₂ [7]. Sugeruje to zdaniem autorów, występowanie dyskretnych różnic strukturalnych cząsteczek hemagglutyniny w wirusach pokrewnych szczepów. Podobny wniosek wynika z badań nad glikozylacją białka płaszcza (gp70) wirusa białaczki (murine leukemia virus (Akv) i jego rekombinantów zdolnych do wzrostu w komórkach więcej niż jednego gospodarza (wirus MCF). Gp 70, syntetyzowane w cząsteczce Akv, zdolnego do wzrostu jedynie w komórkach mysich, zawiera reszty oligosacharydowe typu złożonego. Podczas gdy gp70 wirusa MCF obok struktur złożonych zawiera również wiele mannozowe reszty oligosacharydowe. W obu przypadkach wirusy były namnażane w komórkach tego samego gospodarza tj. w fibroblastach embrionów mysich (mouse embryo fibroblast) [8]. Przypuszcza się również, że informacja zakodowana w cząsteczce glikozylowanego białka zostaje zachowana także i wtedy jeśli wirus jest namnażany w odległych filogenetycznie rodzajach komórek. Badania przebiegu glikozylacji białka wirusa Sindbis, rosnącego w komórkach owadziech niezdolnych do syntezy oligosacharydów złożonych, pozwoliło wykazać, że te reszty cukrowe, które jeśli wirus jest namnażany w komórkach zawierających pełny komplet enzymów „processingu” są typu złożonego, ulegały gwałtownej obróbce aż do powstania struktury rdzeniowej Man₃-GlcNac₂-peptyd. Struktura glikozylowanego białka musi zatem zawierać informację decydującą o przebiegu obróbki reszt cukrowych. Ulegają one gwałtownej hydrolizie, uzasadnionej jedynie w przypadku syntezy struktur złożonych niezależnie od tego, że komórka gospodarza nie zawiera enzymów syntetyzujących takie struktury [9]. Fyzykochemiczne badania struktury przestrzennej znanych N-glikoprotein oraz badania dostępności reszt cukrowych przy pomocy tzw. „sondy EndoH” pozwalają przypuszczać, że występowanie struktur oligosacharydowych typu

wielomannozowego jest wynikiem niekompletnej obróbki wewnątrz aparatu Golgiego, spowodowanej niedostępnością przestrzenną reszt glikozyłowych dla poszczególnych enzymów. Krystalograficzne badania struktury hemaglutyniny wykazują, że oligosacharydowe struktury typu złożonego znajdują się na powierzchni cząsteczki podczas gdy wielomannozowe są ukryte wewnątrz struktury białkowej [10]. Analiza struktur oligosacharydowych metodą magnetycznego rezonansu jądrowego pozwoliła stwierdzić, że istotna różnica pomiędzy strukturą wielomannanową i hybrydu z jednej strony a strukturą złożoną z drugiej polega na ruchliwości ramienia oligosacharydowego z 1-6- α podstawioną mannozą (por. Ryc. 1). Struktury wielomannozowe i hybrydu z 1-3 α podstawioną mannozą na ramieniu 1-6, mają stabilną konformację, przechyloną w stronę części białkowej glikoproteiny. W oligosacharydowych strukturach złożonych ramię 1-6 jest bardziej ruchome i może przybierać co najmniej dwie pozycje przestrzenne [11]. Ułożenie reszt oligosacharydowych w cząsteczce glikoproteiny badano również w sposób pośredni przy pomocy tzw. sondy EndoH. Endo- β -N-acetyloglukozaminidaza (EndoH) jest endoglukozydazą hydrolizującą wiązanie glikozydowe pomiędzy dwiema resztami N-acetyloglukozaminy w części rdzeniowej N-glikoproteiny. Jest to enzym specyficzny dla struktur wielomannozowych i hybrydowych, a struktury złożone są całkowicie niewrażliwe na działanie EndoH. Sondy EndoH użyto poraz pierwszy do badania dostępności ufosforylowanych reszt mannozy w cząsteczkach karboksypeptydazy Y i inwertazy drożdżowej. Oba te enzymy są glikoproteinami typu wielomannozowego z częściowo ufosforylowanymi resztami cukrowymi. Stwierdzono, że 3 z 4-rech reszt oligosacharydowych karboksypeptydazy i 7 z 9-ciu inwertazy są hydrolizowane przez EndoH jeśli część białkowa glikoproteiny znajduje się w swojej natywnej konformacji. Pozostałe reszty oligosacharydowe stawały się wrażliwe na działanie EndoH po denaturacji struktury białkowej. Łatwo dostępne dla EndoH reszty oligosacharydowe w obu enzymach były ufosforylowane, natomiast ulegające hydrolizie po denaturacji cząsteczki nie zawierały reszt fosforanowych. Na tej podstawie wnioskowano, że podczas formowania się ostatecznej konformacji karboksypeptydazy Y i inwertazy część reszt glikozyłowych zostaje „ukryta” wewnątrz cząsteczki białka i staje się niedostępna dla enzymów fosforylujących [12]. Podobny schemat eksperymentalny i sposób rozumowania przyjęto w doświadczeniach, których celem było wykazanie, że struktury wielomannozowe w przeciwieństwie do struktur złożonych, zostają „ukryte” wewnątrz cząsteczki glikozylowanego białka i stają się niedostępne dla enzymów katalizujących obróbkę prowadzącą do powstania struktur złożonych. EndoH użyto do wykazania dostępności oligosacharydów glikoprotein E₁ i E₂ wirusa Syndbis. Wirus był namnażany w komórkach jajowodów chomika (Chinese hamster ovary cells), które nie zawierają GlcNac-transferazy I, enzymu ka-

talizującego reakcję 6 (por. Ryc. 3), co w konsekwencji prowadzi do zahamowania kompletnej obróbki reszt cukrowych i powstawania złożonych struktur oligosacharydowych. Glikoproteiny wirusa, namnażanego w takich komórkach, nie zawierają oligosacharydów typu złożonego a więc ich wszystkie reszty glikozyłowe powinny być wrażliwe na działanie EndoH. Analiza glikoprotein E_1 i E_2 wykazała, że w natywnej cząsteczce wirusa trawieniu ulegają jedynie te struktury cukrowe, które normalnie, jeśli wirus jest namnażany w komórkach posiadających pełny komplet enzymów obróbki są typu złożonego. Denaturacja białka wirusowego umożliwiała hydrolizę pozostałych reszt glikozyłowych [13]. Namnażanie wirusa grypy (Influenza A/WSN strain) w komórkach nerki psa (MDCK cells) w obecności inhibitorów niektórych enzymów odpowiedzialnych za obróbkę reszt glikozyłowych, prowadziło do syntezy hemaglutyniny zawierającej prawie wyłącznie wielomannozowe struktury. Procedura ta jednocześnie zwiększała 3-5-cio krotnie ilość struktur wrażliwych na działanie EndoH, dostępnych dla enzymu w natywnej cząsteczce wirusa. Denaturacja białka wirusowego umożliwiała hydrolizę pozostałych struktur oligosacharydowych. Wynik ten, podobnie jak poprzedni, pozwala na wyciągnięcie wniosku, że łatwo dostępne dla sondy EndoH struktury oligosacharydowe, są w analogicznych hodowlach, prowadzonych bez inhibitorów, strukturami złożonymi, łatwo dostępnymi dla enzymów odpowiedzialnych za ich obróbkę [14]. Zastosowanie modelowego układu do badania obróbki reszt oligosacharydowych *in vitro* przyniosło nowe, interesujące informacje na temat możliwości regulowania tego procesu. Substratem była jodowana rybonukleaza B, źródłem enzymów frakcja błon aparatu Golgiego z wątroby szczura lub trzustki wołu. RNA-za B, jedna z 4-rech RNA-z syntetyzowanych i wydzielanych przez trzustkę wołu jest glikoproteina zawierająca jedną resztę glikozyłową typu wielomannozowego o strukturze $Man_5GlcNac_2$, wrażliwej na działanie EndoH. Inkubacja RNA-zy B z frakcją błon aparatu Golgiego z wątroby i w obecności UDPGlcNac, prowadzi do przekształcenia wielomannozowej reszty oligosacharydowej w złożoną, niewrażliwą na działanie EndoH. Wyniku tego nie udawało się powtórzyć w obecności analogicznej frakcji błon z trzustki. W tym przypadku przekształcenie struktury wielomannozowej w złożoną można było osiągnąć dopiero po zdenaturowaniu natywnej konformacji RNA-zy. Można więc przypuszczać, że struktura cząsteczki stanowi zawadę przestrzenną utrudniającą dostępność reszt cukrowych dla enzymów trzustki odpowiedzialnych za ich obróbkę oraz, że analogiczny komplet enzymów z wątroby posiada wyższą specyficzność substratową [15]. Specyficzność substratowa poszczególnych enzymów biorących udział w obróbce reszt cukrowych jest najpewniej różna w różnych tkankach. Schachter i wsp. [16] zwracają uwagę na szczególną rolę jaką odgrywa specyficzność substratowa GlcNac-transferazy I, katalizującej przeniesienie GlcNac na

Man₅GlcNac₂. Reakcja ta decyduje bowiem o dalszej obróbce prowadzącej do powstawania struktur złożonych. Parodi i wsp. opisują reakcję tzw. przejściowej glikozylacji glikopeptydu, katalizowanej przez enzymy występujące w błonach RER. Donorem glukozy jest tutaj UDP-Glukoza. Proces ten jest niezależny od wcześniejszej glikozylacji oligosacharydu, zachodzącej na fosforanie dolicholu, gdyż w tym przypadku donorem glukozy jest glukozylo-fosfo-dolichol. Tzw. przejściowa glikozylacja występuje w takich tkankach jak tarczyca wołu [17], wątroba szczura i komórki roślinne [18], nie stwierdzano jej natomiast w komórkach drożdży [18]. Substratami w tej reakcji były Man₇₋₉GlcNac₂-Asn-peptydy. Zdaniem autorów „przejściowa” glikozylacja glikopeptydu, już po jego częściowej obróbce, może być sygnałem blokującym dalszą hydrolizę oligosacharydu przez α -mannozydazy.

Podsumowując można przyjąć, że heterogenność struktur glikozylowych N-glikoprotein jest rezultatem ich skomplikowanej, wieloetapowej biosyntezy. O efekcie końcowym decyduje przebieg ich obróbki zależny od takich czynników jak 1-szo rzędowa struktura glikozylowanego białka, dostępność reszt glikozylowych dla odpowiednich enzymów oraz powinowactwo tych enzymów do glikozylowanego substratu. Przedstawione wnioski są jednak rezultatem pewnych uogólnień myślowych i wymagają dalszego sprawdzenia w odpowiednich doświadczeniach. Zdając sobie w pełni sprawę z dyskusyjności opisywanych wyników, podjęłam próbę ich interpretacji ze względu na niewątpliwe znaczenie biologiczne glikoprotein. Ostatni rok przyniósł nieliczne próby badania aktywności poszczególnych enzymów odpowiedzialnych za obróbkę reszt cukrowych [19]. Ich rezultaty, nie zawsze jednoznaczne, nie podważają jednak trafności wyboru metod eksperymentalnych oraz sposobu interpretacji otrzymanych wyników, opisanych w niniejszym artykule.

Zaakceptowano do druku dnia 22 stycznia 1987.

PIŚMIENNICTWO

1. Pollack L., Atkinson P., (1983) *J. Cell. Biol.* 97, 293—300.
2. Palamarczyk G., (1978) *Post. Biochem.* 24, 443—460.
3. Kornfeld R. and Kornfeld S., (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631—664.
4. Palamarczyk G., (1986) Eighth School on Biophysics of Membrane Transport, School Proceeding, Poland, May 4—13, w druku.
5. Bause E., Hettkamp M. and Legler G., (1982) *Biochem. J.* 203, 761—768.
6. Nakamura K., Brown A. S., Compans R. W., (1980) *Virology* 107, 208—221.
7. Nakamura K., Compans R. W., (1979) *Virology* 95, 8—23.
8. Rosner M. R., Grinna S. L., Robbins P. W., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 77, 67—71.

9. Hsieh P., Robbins P. W., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 2375—2382.
10. Wilson J. A., Skehel J. J. and Wiley D. C., (1981) *Nature* **289**, 366—373.
11. Brison J. R., Carver J. P., (1983) *Biochemistry* **22**, 3680—3686.
12. Trimble R. B., Maley F., Chu K. F., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 2562—2567.
13. Hsieh P., Rosner M. R. and Robbins P. W., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 2555—2561.
14. Palamarczyk G., Elbein A. D., (1984) dane niepublikowane.
15. Williams D. B., Lennarz W. J., (1984) *J. Biol. Chem.* **258**, 5105—5114.
16. Schachter H., Narasimhan S., Gleeson P., Vella G., (1983) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 1049—1066.
17. Parodi A., Mendelzon D. H., and Lederkremer G. Z., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8260—8265.
18. Parodi A., Mendelzon D. H., Lederkremer G. Z. and Martin-Barrientos J., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6351—6357.
19. Brown P. H., Hickman S., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2575—2582.

EWA ZDEBSKA *

Struktura, właściwości immunologiczne i biosynteza złożonych glikosfingolipidów i glikoprotein (polilaktozoaminoglikanów) błony krwinek człowieka

Structure, immunological specificity and biosynthesis of human blood cell complex glycosphingolipids and glycoproteins (polylactosaminoglycans)

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Występowanie polilaktozoaminoglikanów
- III. Metody izolowania
 - III-1. Poliglikozyloceramidy
 - III-2. Poliglikozylopeptydy
- IV. Struktura poliglikozyloceramidów i poliglikozylopeptydów krwinek czerwonych człowieka
 - IV-1. Struktura poliglikozyloceramidów
 - IV-2. Struktura poliglikozylopeptydów
- V. Aktywności grupowe ABH oraz I, i polilaktozoaminoglikanów krwinek czerwonych
 - V-1. Determinanty ABH
 - V-2. Determinanty I, i
- VI. Struktura polilaktozoaminoglikanów granulocytów człowieka
- VII. Zmiany w ekspresji antygenów I, i oraz ABH związane z rozwojem i różnicowaniem komórek
 - VII-1. Erytropoeza człowieka
 - VII-2. Embriogeneza myszy
- VIII. Zmiany w strukturze polilaktozoaminoglikanów krwinek czerwonych człowieka we wrodzonej dyserytropoetycznej anemii CDA-II (HEMPAS)
- IX. Synteza sekwencji polilaktozoaminowych
- X. Rola biologiczna polilaktozoaminoglikanów

Contents

- I. Introduction
- II. Distribution of polylactosaminoglycans
- III. Methods of isolation
 - III-1. Polyglycosylceramides
 - III-2. Polyglycosylpeptides

* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Hematologii, ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa

- IV. Structure of human erythrocyte polyglycosylceramides and polyglycosylpeptides
 - IV-1. Structure of polyglycosylceramides
 - IV-2. Structure of polyglycosylpeptides
- V. ABH blood group activity and I,i activity of polylectosaminoglycans of erythrocytes
 - V-1. ABH determinants
 - V-2. I,i determinants
- VI. Structure of human granulocyte polylectosaminoglycans
- VII. Changes in expression of ABH and I,i antigens associated with growth and differentiation of cells
 - VII-1. Erythropoiesis in human
 - VII-2. Embryogenesis in mouse
- VIII. Changes in structure of human erythrocyte polylectosaminoglycans in congenital dyserythropoietic anemia type II (HEMPAS)
- IX. Biosynthesis of polylectosaminyl sequences
- X. Biological role of polylectosaminoglycans

Wykaz stosowanych skrótów: GSLs — glikosfingolipidy, PGC — poliglikozyloceramidy, PGP — poliglikozylopeptydy, Gal — galaktoza, Glc — glukoza, Fuk — fukoza, GlcNac — N-acetyloglucozaminy, GalNac — N-acetylogalaktozaminy, Cer — ceramid, NeuNac — kwas N-acetylneuraminowy, polyIacNac — poli-laktozaminoglikany

I. Wstęp

Do początku lat siedemdziesiątych uważano, że glikosfingolipidy (GSLs) są związkami, które nie zawierają więcej niż 10 reszt cukrowych w cząsteczce. Gardas i Kościelak wyodrębnili z ekstraktów wodnych błon krwinek czerwonych frakcję GSLs o niespotykanej dotąd złożoności około czterdziestu reszt cukrowych na mol ceramidu [1]. Związki te wstępnie określone mianem megaloglikolipidów [1], otrzymały później bardziej systematyczną nazwę poliglikozyloceramidów (PGC) [2]. Początkowo zdefiniowano je jako GSLs o złożoności większej niż 20 reszt cukrowych. Przez analogię do terminologii oligo- i polisacharydów, słuszniej byłoby używać terminu PGC do GSLs zawierających więcej niż 10 reszt cukrowych na mol ceramidu, natomiast mniej złożone GSLs określać mianem oligoglikozyloceramidów.

Oligo- i poliglikozyloceramidy krwinek czerwonych człowieka wykazują aktywności immunologiczne antygenów grupowych A, B, H oraz I, i [1].

W r. 1976 Finne i wsp. [3] oraz Järnefelt i wsp. [4] wyizolowali z trawionych pronazą błon krwinek czerwonych człowieka frakcję glikopeptydową zawierającą 50—60 reszt cukrowych na 3 mole mannozy. Ze względu na podobieństwo budowy glikanów tych związków do glikanów PGC, zostały one nazwane poliglikozylopeptydami (PGP) [3]. PGP są również znane w literaturze pod nazwą erytroglikanów [4].

Z uwagi na to, że zasadniczym elementem budowy PGC i PGP są powtarzające się sekwencje N-acetylolaktozoaminy (Gal β 1-4 GlcNac), obie grupy związków łącznie nazywa się coraz częściej polilaktozoaminoglikanami [5]. Budzą one ostatnio duże zainteresowanie badaczy ze względu na zmiany ich struktury w dojrzewaniu i różnicowaniu się komórek oraz w rozwoju zarodka [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

II. Występowanie polilaktozoaminoglikanów

PGC i PGP występują w błonie krwinek czerwonych człowieka w ilości odpowiednio: 1 mg i 3.5 mg/100 ml upakowanych krwinek [13]. Stanowią one zatem 3% i 10.5% całkowitej ilości cukrów błony krwinek czerwonych.

Miller-Podraza poszukiwała PGC w różnych tkankach i narządach ludzi i zwierząt [14]. Niewielkie ilości PGC o złożoności większej niż 20 reszt cukrowych, znaleziono w płucach i wątrobie człowieka, natomiast nie wykryto ich w wątrobie wołu. Śluzówka jelita świni nie zawiera PGC [14], choć związki te są obecne w błonie śluzowej żołądka, jakkolwiek mają one nieco inną budowę części rdzeniowej cząsteczki [15]. Krwinki czerwone wołu, świni, owcy nie zawierają PGC [14, 16]. Znaleziono je natomiast w krwinkach królika. Mają one podobny stopień złożoności co wyizolowane PGC z krwinek człowieka [17]. GSLs zbudowane z powtarzających się jednostek N-acetylolaktozoaminy występują również w krwinkach białych człowieka, jednak w odróżnieniu od PGC są związkami o prostej, nierozgałęzionej na reszcie galaktozy budowie łańcucha i nie zawierają determinant antygenowych ABH oraz I [18, 19, 20]. Obecne w ludzkich granulocytach PGP odbiegają swoją budową od związków tego typu występujących w krwinkach czerwonych człowieka [21]. Nie wykazują one również aktywności ABH oraz I [21, 22].

W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudzają polilaktozoaminoglikany zarodka myszy i komórek karcinoembrionalnych [7, 10, 11, 12]. Jak się wydaje związki te są nośnikami determinant antygenowych SSEA -1 (stage specific embryonic antigen 1 [12]). Podobne determinanty antygenowe są charakterystyczne dla granulocytów człowieka [23, 24, 25, 26, 27].

III. Metody izolowania

III-1. Poliglikozyloceramidy

Wszystkie stosowane metody izolowania PGC są wariantami pierwszej opisaną metody otrzymywania tych związków [1]. Jej zasadą jest

ekstrakcja materiału biologicznego dwufazowym, niemieszającym się układem: woda — rozpuszczalnik organiczny. W tych warunkach większość lipidów błon komórkowych przechodzi do fazy organicznej, natomiast białka, część kwaśnych glikolipidów i PGC pozostają w fazie wodnej.

W metodzie Gardasa i Kościelaka stosuje się mieszaninę *n*-butanolu i wody [1], natomiast w metodzie Dejtera-Juszyńskiego i wsp. mieszaninę chloroformu, metanolu i wody [28]. Białka i gangliozydy z ekstraktów wodnych usuwa się potem na drodze chromatografii jono-wymiennej [2], względnie stosując ponowną ekstrakcję w dwufazowym układzie rozpuszczalników materiału, który był przedtem poddany acetylacji [14]. Acetylowane PGC są nierozpuszczalne w wodzie, co powoduje, że przechodzą one tym razem do fazy organicznej. Rozpuszczalne w wodzie zanieczyszczenia usuwa się przez wielokrotne płukanie faz organicznych fazą wodną. Ostateczne oczyszczenie PGC osiąga się metodą chromatografii cienkowarstwowej acetylowanego materiału. Tą samą metodą można rozdzielić PGC na frakcje o różnym stopniu złożoności.

III-2. Poliglikozylopeptydy

Związki te otrzymuje się z delipidowanych i następnie trawionych pronażą błon komórkowych. Hydrolizaty poddaje się potem chromatografii w żelach, a uzyskany materiał — degradacji przy pomocy łagodnej hydrolizy alkalicznej, celem zniszczenia glikopeptydów zawierających 0-glikozydowo związane łańcuchy cukrowe. Końcowym etapem preparatyki jest chromatografia powinowactwa na kolumnach wypełnionych Con-A Sefarozą [3, 4], lub dodatkowo lektynami o aktywności skierowanej przeciw determinantom grupowym A lub B [29].

IV. Struktura poliglikozylceramidów i poliglikozyllopeptydów krwinek czerwonych człowieka

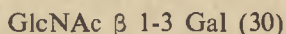
IV-1. Struktura poliglikozylceramidów

Jak już wspomniano, acetylowane PGC można podzielić metodą chromatografii cienkowarstwowej na frakcje, które różnią się stopniem złożoności i zawierają od 20 ~ 60 reszt cukrowych [2]. Wzór ogólny dla PGC przedstawia się następująco:

Glukoza₁, Fukoza_{3,4}, Galaktoza_{9,13}, N-acetyloglukozoamina_{9,14}, Kw. N-acetylneuraminowy₁, Ceramid₁.

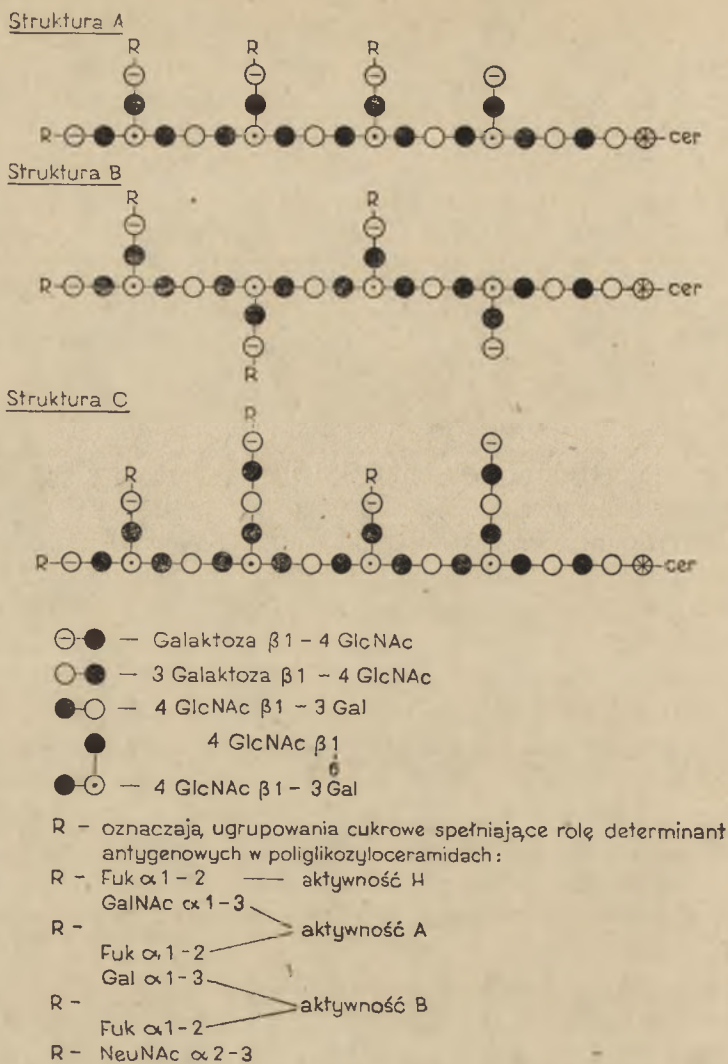
W składzie PGC otrzymanych z krwinek grupy A mieści się również N-acetylogalaktozoamina w ilości 1—2.5 moli na resztę ceramidu [2].

Metodą analizy metylacji stwierdzono, że fuKOza i N-acetylogalaktozamina występują jako nieredukujące reszty końcowe, natomiast N-acetyloglukozoamina podstawiona w pozycji 4- jest obecna tylko wewnątrz cząsteczki. Reszty galaktozy są podstawione w pozycji 3- ($\sim 40\%$), w pozycji 3,6- ($\sim 30\%$), w pozycji 2- ($\sim 20\%$). Pozostałe reszty galaktozy występują jako grupy końcowe. Zawartość 3,6 podstawionych reszt galaktozy, które są punktem rozgałęzień, rośnie w miarę wzrostu złożoności cząsteczki PGC i wynosi średnio 1 mol na 8 moli reszt cukrowych [30]. Głównym oligosacharydem uwalnianym w trakcie łagodnej hydrolizy kwaśnej natywnych PGC jest N-acetylolaktozamina, w przypadku de N-acetylowanych PGC-dwucukier o wzorze:



Zbadano również struktury siedmiu GSLs uwalnianych z PGC grupy 0 o 35 resztach cukrowych, w czasie łagodnej hydrolizy kwaśnej [31]. Były one związkami nierozgałęzionymi o naprzemiennie ułożonych resztach 3-O-galaktozy i 4-O-N-acetyloglukozoaminy. Sekwencje dwucukrowe: Gal β 1-4 GlcNAc odpowiadające strukturalnie N-acetylolaktozaminie połączone były wiązaniem glikozydowym β 1-3-. Wymienione sekwencje cukrowe były w każdym przypadku przyłączone do laktozyloceramidu (Gal β 1-4 Glc β 1-1 Cer). Glikolipidami o najprostszej budowie były: glukozylceramid, laktozyloceramid i laktotriaozyloceramid. Wyższe GSLs zbudowane były z naprzemiennie ułożonych reszt galaktozy i N-acetyloglukozoaminy. Elementy rozgałęzień pojawiły się dopiero we frakcji glikolipidowej zawierającej 8 reszt cukrowych. Rozgałęzienia rozpoczynała zawsze reszta N-acetyloglukozoaminy przyłączona do pozycji 6 galaktozy, ponieważ te N-acetylowane i degradowane kwasem azotawym PGC grupy 0 ulegają całkowitemu rozłożeniu do 2,5 anhydromannozy, dwucukru o budowie: Gal β 1-4 2,5 anhydromannoza i trójcukru o budowie: Fuk α 1-2 Gal β 1-4 2,5 anhydromannoza (w trakcie degradacji kwasem azotawym reszty glukozoaminy ulegają dezaminacji z jednoczesnym przekształceniem się w 2,5 anhydromannozę i zerwaniem wiązania glikozydowego glukozoaminy). Wszystkie te dane wskazują, iż część rdzeniowa PGC jest zbudowana z naprzemiennie ułożonych reszt 3-O podstawionej galaktozy i 4-O podstawionej N-acetyloglukozoaminy, jednak nie pozwalają na określenie długości rozmieszczenia łańcuchów bocznych. Teoretycznie możliwe struktury cząsteczki PGC przedstawiono na rycinie 1. Problem ten usiłowano rozstrzygnąć na drodze sekwencyjnej degradacji PGC przy pomocy nadjodanu [30] oraz hydrolizy enzymatycznej (dane nieopublikowane).

Dwa cykle utleniania nadjodanem PGC eliminują jedynie częściowo łańcuchy boczne (usuwając kolejno reszty galaktozy i N-acetyloglukozoaminy), z czego można wnosić, że niektóre z nich zbudowane są z pojedynczej jednostki N-acetylolaktozaminy [30]. Jednakże nawet cztery

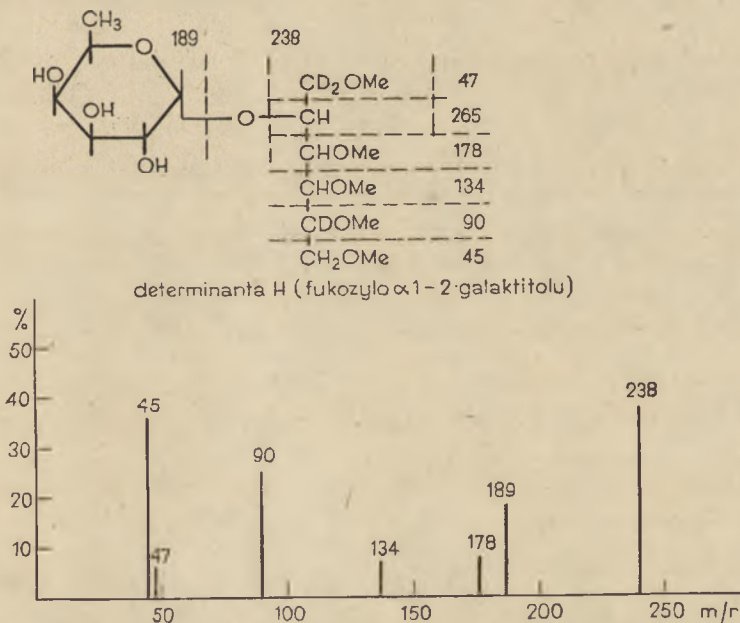


Ryc. 1. Teoretycznie możliwe struktury poliglikozyloceramidów. Kółka oznaczają reszty cukrowe.

kolejne cykle degradacji nie niszczą całkowicie łańcuchów bocznych, z czego wyciągnięto wniosek, iż PGC mają strukturę C (Ryc. 1). W roku 1984 Fukuda i wsp. stwierdzili, że degradacja poliglikozylopeptydów przy pomocy nadjodanu jest niekompletna [5]. Na podstawie hydrolizy enzymatycznej PGP kolejno przy pomocy neuraminidazy, α fukozydazy, β galaktozydazy i β N-acetyloheksozoaminidazy — autorzy doszli do wniosku, iż łańcuchy boczne są krótkie i składają się z pojedynczej jednostki N-acetylolaktozoaminy jak w strukturze A (Ryc. 1). Jednakże hydroliza przy pomocy β N-acetyloheksozoaminidazy PGC, z których usunięto wszystkie uprzednio terminalne reszty fukozy, kwasu

sjalowego i galaktozy, tzn. preparatu zawierającego tylko reszty N-acetyloglukozoaminy jako grupy terminalne, usuwa tylko część rozgałęzień (dane nieopublikowane). Problem rozmieszczenia i długości łańcuchów bocznych w PGC nie jest zatem ostatecznie rozstrzygnięty. Uzyskane wyniki badań sugerują obecność łańcuchów zbudowanych z jednej tylko sekwencji N-acetylolaktozoaminowej oraz łańcuchów dłuższych, zbudowanych z kilku sekwencji N-acetylolaktozoaminowych. Najbardziej prawdopodobna wydaje się zatem budowa mieszana wg schematu C (Ryc. 1). Na podstawie aktywności grupowej PGC w zakresie układów grupowych AB0 i Hh jak również wyników analizy metylacyjnej można wnosić, że znaczna część łańcuchów bocznych tych glikolipidów jest zakończona strukturami grupowymi A, B, i H. Podstawienie reszty galaktozy należącej do terminalnej jednostki N-acetylolaktozoaminy-fukozą poprzez wiązanie α -1-2 prowadzi do powstania determinanty H. Jest ona prekursorem determinanty A (GalNAc α 1-3 (Fuk α 1-2)Gal-) lub determinanty B (Gal α 1-3) (Fuk α 1-2/Gal-).

Struktury grupowe A, B i H wyznaczono również bezpośrednio posługując się metodą degradacji PGC przy pomocy trójtlenku chromu. Metoda ta pozwala na utlenienie reszt cukrowych biorących udział w wiązaniach glikozydowych β do kwasów cukrowych. Reszty cukrowe związane α glikozydowo pozostają nienaruszone. Redukcja i metylacja produktów degradacji umożliwia uzyskanie oligosacharydów zakończonych resztą alditolu, których strukturę określono metodą GC-MS (chromato-



Ryc. 2. Widmo masowe determinanty H (fukozyl α 1-2 galaktitolu).

grafii gazowej zespolonej ze spektrometrią masową). Widmo masowe determinanty H przedstawiono na rycinie 2. Niewielka część łańcuchów bocznych PGC nie jest podstawiona determinantami A, B i H i zawiera jako grupę końcową terminalną resztę β galaktozy. Liczba tych niepodstawionych łańcuchów bocznych rośnie w bardziej złożonych frakcjach PGC [2]. Kwas sjałowy, który występuje w PGC w ilościach niewielkich (ok. 0.5-1.0 mola na resztę ceramidu) jest przyłączony do subterminalnej galaktozy wiązaniem α 2-3 [2, 30]. Uwarunkowania konformacyjne sugerują, że wszystkie łańcuchy boczne PGC ułożone są w tym samym kierunku. Związki te prawdopodobnie przylegają całą długością łańcucha do powierzchni krwinki, łańcuchy boczne zakończone aktywnymi immunologicznie grupami sterczą na zewnątrz. Model ten wydaje się być wysoce efektywny dla wiązania specyficznych przeciwciał [2, 30].

IV-2. Struktura poliglikozylopeptydów

Poliglikozylopeptydy są mieszaniną glikopeptydów pochodzących przede wszystkim z białek błonowych znanych pod nazwą band 3 (transporter anionów) i band 4.5 [3, 4]. Wyniki badania struktury komponenty cukrowej wykazały daleko idącą zależność z danymi uzyskanymi dla PGC. Część rdzeniowa łańcucha cukrowego charakteryzuje się występowaniem rozgałęzionego układu sekwencji dwucukrowych: Gal β 1-4 GlcNAc, połączonych wiązaniami β 1-3. Ilość punktów rozgałęzień jest proporcjonalna do stężenia molekularnej złożoności glikoprotein. W przeciwieństwie do PGC—PGP zawierają w części cukrowej mannozę przy nieobecności glukozy. Łańcuch cukrowy połączony jest z peptydem wiązaniem N-glikozydowym utworzonym między redukującą grupą N-acetyloglukozoaminy a amidową grupą asparaginy. Ogólny schemat budowy tych związków został niedawno zaproponowany przez Fukudę i w.s.p. na podstawie badania strukturalnego fragmentów cukrowych tych związków uwolnionych działaniem β endogalaktozydazy z Σ . freundi [5]. Długość łańcuchów bocznych wyznaczono, jak już wspomniano wyżej, przy pomocy sekwencyjnego trawienia PGP neuraminidazą, α fukozydazą, β galaktozydazą i β N-acetyloheksozoaminidazą. Ogólny schemat struktury PGP przedstawiono na rycinie 3 (str. 321).

V. Aktywności grupowe ABH oraz I, i polilaktozoaminoglikanów krwinek czerwonych

V-1. Determinanty ABH

PGC i PGP odpowiadają odpowiednio za ok. 10—15% i około 75—80% aktywności grupowej ABH błony krwinek czerwonych, co wyznaczono metodą znakowania błon krwinek grupy 0 radioaktywną N-ace-

tylogalaktozoaminą przy pomocy radioaktywnej transferazy grupowej A czyli α N-acetylogalaktozaminylotransferazy UDP-acetylogalaktozoamina-fukozylo α 1-2 galaktoza (FC 2.4.2.92) [33, 34]. Do oligoglikozyloceramidów włącza się tylko 5% radioaktywnej N-acetylogalaktozoaminy. W preparatach PGC otrzymanych z krwinek grupy A_1 znaleziono trzykrotnie więcej struktur A (mierzonych zawartością N-acetylogalaktozoaminy) niż w analogicznych preparatach z krwinek grupy A_2 [2]. Podobne wyniki otrzymano w przypadku PGP [35]. Z doświadczeń tych wysnuto wniosek, iż różnica między krwinkami A_1 i A_2 jest wyłącznie ilościowa. Wcześniej do tych samych wniosków doszli Schachter i w s.p. na podstawie pomiarów Km i swoistości substratowej transferaz grupowych A z surowicy grupy A_1 i A_2 [36].

Ostatnio wykazano, że glikolipidy krwinek grupy A_1 zawierają niezwykłą determinantę A stanowiącą zdwojenie sekwencji grupowej A: GalNAc α 1-3 (Fuk α 1-2 (Gal β 1-3 GalNAc α 1-3) Fuk α 1-2) Gal β 1-4 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc [37, 38]. Wymienione glikolipidy reagowały swoiście z przeciwciałem monoklonalnym anty A_1 [37]. Wydaje się więc, że różnica pomiędzy krwinkami A_1 i A_2 jest zarówno ilościowa jak i jakościowa.

Nieoczekiwane wyniki przyniosła analiza PGC i PGP wyizolowanych z krwinek o fenotypie "Bombay" (Oh) [40]. Nosiciele tego bardzo rzadkiego fenotypu krwi są homozygotami recesywnymi $h h$ pozbawionymi genu H kodującego α 1-2 fukozylotransferazę (FC 2.4.1.89). Spodziewano się znaleźć w tych krwinkach PGC i PGP zawierające w nadmiarze reszty galaktozy, ewentualnie podstawione kwasem sjałowym. W rzeczywistości PGC i PGP były znacznie mniej złożone i w konsekwencji miały tyle samo terminalnych reszt galaktozy co PGC i PGP wyizolowane z krwinek prawidłowych. Wydaje się więc, że istnieje bliżej nieokreślony mechanizm wyrównawczy, który nie dopuszcza do gromadzenia się na powierzchni krwinek czerwonych nadmiaru terminalnych reszt galaktozy. Stanowią one punkt uchwytu dla lektyn z hepatocytów i makrofagów wiążących β galaktozę [39].

V-2. Determinanty I, i

Antygeny I oraz i są zdefiniowane przez rodziny przeciwciał anty I i anty i, które są aglutyninami typu zimnego. Antygeny I, i występują w krwinkach czerwonych w zależności odwrotnie proporcjonalnej. U noworodków i dzieci do końca pierwszego roku życia w krwinkach przeważa antygen i, który jest stopniowo zastępowany przez antygen I, charakterystyczny dla krwinek osób dorosłych. Większość przeciwciał anty I oraz anty i ma charakter autoprzeciwciał. Są to monoklonalne przeciwciała typu IgM. Wyróżnia się autoprzeciwciała fizjologiczne, posiadające bardzo niskie miana i aktywność *in vitro* jedynie w niskiej tempe-

VI. Struktura polilaktozoaminoglikanów granulocytów człowieka

Brak determinant cukrowych odpowiedzialnych za aktywność ABH jest cechą charakterystyczną struktury zarówno glikosfingolipidów [9, 20], jak i poliglikozylopeptydów granulocytów człowieka [21, 22]. Wykazują one natomiast swoistość antygenową SSEA-1 charakterystyczną dla komórek teratokarcinomalnych linii embrionalnej F-9 oraz mysich, preinplantacyjnych komórek embrionalnych na etapie moruli [12]. Ich łańcuchy cukrowe o budowie nierozgałęzionego laktozoaminoglikanu podstawione są fukozą w jednej lub kilku resztach N-acetyloglukozaminy wiązaniem α 1-3. Brak struktur: Gal β 1-4 GlcNAc β 1-6 odpowiedzialnych za rozgałęzienia, jest przyczyną braku ekspresji antygeny I w granulocytach człowieka.

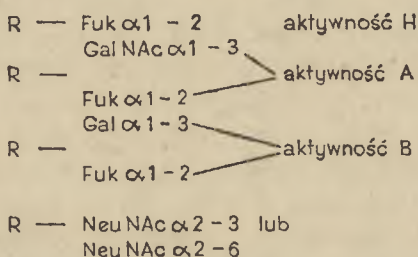
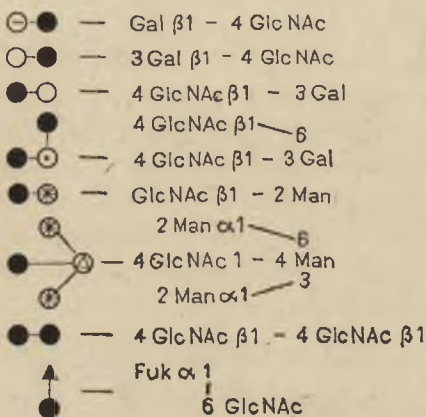
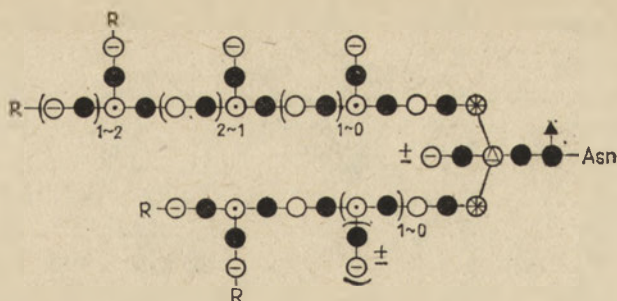
VII. Zmiany w ekspresji antygenów I, i oraz ABH związane z rozwojem i różnicowaniem komórek.

VII-1. Erythropoeza człowieka

W czasie zmiany płodowych (fetal) erytrocytów w dojrzałe (adult) krwinki czerwone — liniowe łańcuchy polilaktozoaminoglikanów są stopniowo zamieniane w struktury rozgałęziane (Ryc. 3). Zjawisku temu towarzyszy konwersja antygeny i w antygen I. W tym samym czasie ma miejsce zmniejszenie stopnia sjałylacji łańcuchów cukrowych, a zwłaszcza zmniejszenie ilości sekwencji dwusjałowych. Terminalne reszty galaktozy są fukozylowane przy udziale α 1-2 transferazy. Powstają wtedy H aktywne łańcuchy oligosacharydowe, które mogą być następnie zamieniane w A lub B aktywne struktury, przez dodanie odpowiednich monocukrów [6, 7, 8].

VII-2. Embriogeneza myszy

Antygen I pojawia się w pierwszych etapach rozwoju embrionalnego myszy [9, 10, 11, 12]. Metodą immunofluorescencji wykazano ekspresję tego antygeny już w stadium pojedynczej komórki. Dopiero znacznie później, na etapie różnicowania się pierwotnej endodermy obserwowano ekspresję antygeny i. W ektodermie sześciodniowego embrionu następuje wyraźne obniżenie ekspresji antygeny I. W późniejszych stadiach embriogenezy pojawia się antygen H a znika antygen I. Obecność determinanty grupowej H maskuje determinantę I.



Ryc. 3. Schemat struktury poliglikozylopeptydów wyizolowanych z błon erytrocytów osób dorosłych [5, 6, 32].

Kółka oznaczają reszty cukrowe.

VIII. Zmiany w strukturze polilaktozaminoglikanów erytrocytów człowieka we wrodzonej, dyserytrocytycznej anemii CDA-II (HEMPAS)

Wrodzona, dyserytrocytyczna anemia CDA-II (HEMPAS) związana jest z genetycznym defektem krwinek czerwonych, charakteryzuje się nieefektywną erytropoezą i obecnością wielojądrzastych erytroblastów w szpiku. Erytrocyty wykazują zwiększoną zdolność do wiązania zarówno przeciwciał anty I jak i anty i [61, 62], ulegają lizie w kwaśnym pH,

wywołanej obecnością alloprzeciwciał obecnych w około 30% normalnych surowic [63]. Swoistość tych przeciwciał jest nieznaną. Poziom PGC w błonach erytrocytów HEMPAS jest wyższy pięciokrotnie w porównaniu z kontrolą poziom PGP jest znacznie obniżony [64]. Akumulacji PGC towarzyszy defektywna glikozylacja białek błony erytrocytów, takich jak: band 3, glikoforyna A, band 4.5 [65, 66]. PGC i PGP w krwinkach czerwonych HEMPAS przypominają strukturalnie glikokoniugaty wyizolowane z błon krwinek płodowych oraz z krwinek osób dorosłych o fenotypie i [64]. Związki te są mniej złożone, posiadają mniejszą ilość punktów rozgałęzień i wykazują wzmożoną aktywność i.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Zdebska i wsp. sugerują, że upośledzenie podziałów komórek szeregu erytroblastycznego i związane z tym zahamowanie normalnego cyklu syntezy i resyntezy glikokoniugatorów jest przyczyną, że błona krążących erytrocytów zawiera glikokoniugaty charakterystyczne dla różnych form pośrednich komórek [64]. Znaczny wzrost glikolipidów w erytrocytach HEMPAS można tłumaczyć zaburzeniem cyklu komórkowego w czasie erytropoezy. Charakteryzuje się on dwukrotnie wydłużoną fazą G1 [67], w której biosynteza glikolipidów jest podwyższona [68, 69].

IX. Biosynteza sekwencji polilaktozoaminowych

Teoretycznie w biosyntezie sekwencji polilaktozoaminowych biorą udział tylko trzy enzymy: β 4 transferaza galaktozy i dwie transferazy N-acetyloglukozaminy. Pierwszy z tych enzymów przenosi resztę galaktozy w wiązaniu β 1-4 na wolną N-acetyloglukozoaminę i terminalną N-acetyloglukozoaminę glikokoniugatów (EC 2.4.1.90). Wbrew wcześniejszym doniesieniom, że istnieje odrębna β 4 transferaza galaktozy aktywna tylko wobec substratów o charakterze glikosfingolipidów [70] ostatnio uznano, że enzym ten jest również aktywny wobec substratów o charakterze oligosacharydów i glikoprotein [71]. W obecnej α laktoalbuminy β 4 galaktozylotransferaza przenosi galaktozę na glukozę lub glukozyloceramid [71]. Drugi enzym: β -3transferaza UDP glukozamina-galaktoza został wstępnie scharakteryzowany niedawno [27]; znaleziono go w surowicy krwi człowieka. Substratami dla enzymu są oligosacharydy, glikoproteiny i glikolipidy zawierające terminalne reszty galaktozy. "Branching enzyme", czyli β 6 transferaza N-acetyloglukozoaminy wykryto w komórkach nowotworowych Novikowa [73], surowicy krwi człowieka [72, 74, 75] i śluzówce żołądka świni [76]. Aktywność enzymu w surowicy nie ma związku z fenotypem I, i krwinek czerwonych [74]. Piller i Cartron [75, 76] posługujący się preparatami trzech wymienionych transferaz cukrowych dokonali pełnej syntezy enzymatycznej determinanty I. Ustalili również kolejność działania transferazy

kach płodu myszy (przyp. rozdz. VII-2). Struktury: Gal β 1-4 (Fuk α 1-3) GlcNAc obecne są także w granulocytach obojętnochłonnych (przyp. rozdz. VI). Wydaje się więc, że obecność antygenu SSEA-1 ma wyraźny związek z procesem adhezji międzykomórkowej.

Rozgałęzione łańcuchy cukrowe polilaktozoaminoglikanów są receptorami pewnych lektyn zwierzęcych. Wykazano, że izolowane z mięśnia sercowego wołu lektyny reagują silniej z I, i aktywnymi glikoproteinami, niż z glikoproteinami, w których obecność ABH determinant grupowych wpłynęła na obniżenie aktywności I, i [85]. Proces biosyntezy ceramidu jest energetycznie tani (20 kcal/mol) w porównaniu do procesu biosyntezy białka (29,2 kcal/pojedyncze wiązanie peptydowe) — dlatego zdaniem Kościelaka, to przede wszystkim glikosfingolipidy dostarczają błonie komórkowej cukry, które tworzą płaszcz chroniący jej powierzchnię przed proteolizą, denaturacją, patogennymi mikroorganizmami i wirusami [84]. Cukry związane α glikozydowo: galaktoza, fukoza, N-acetylogalaktozamina — spełniające rolę determinant antygenowych i kwas sjałowy, zasłaniają reszty β galaktozy. Chronią w ten sposób powierzchnię erytrocytów przed wiążącymi β galaktozę lektynami hepatocytów, makrofagami i autoprzeciwciałami.

Autorka wyraża podziękowania Prof. dr hab. Jerzemu Kościelakowi za wnikliwe uwagi dotyczące tekstu niniejszego artykułu.

Zaakceptowano do druku 26 lutego 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Gardas A., Kościelak J., (1974), *Febs Lett.*, **42**, 101—104.
2. Kościelak J., Miller-Podraza H., Krauze R., Piasek A., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 9—18.
3. Finne J., Krusius T., Rauvala H., Kakemaki R., Myllyla G., (1978), *Febs Lett.*, **89**, 111—115.
4. Järnefelt J., Rush J., Li Y. T., Laine R. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8006—8009.
5. Fukuda M., Dell A., Oates J. E., Fukuda M. N., (1984), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8260—8275.
6. Fukuda M., Fukuda M. N., Hakomori S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5456—5465.
7. Fukuda M., (1985), *Biochimica et Biophysica Acta*, **780**, 119—150.
8. Fukuda M., Fukuda M. N., Papayannopoulou T., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3474—3478.
9. Hakomori S., Nudelman E., Levery S., Solter D., Knowles B. B., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1578—1586.
10. Gooi H. C., Feizi T., Kapadia A., Knowles B. B., Solter D., Evans J. M., (1981), *Nature*, **292**, 156—158.
11. Kapadia A., Feizi T., Evans M. J., (1981), *Exp. Cell Res.*, **131**, 185—195.

12. Solter D., Konwles B. B., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5565—5569.
13. Zdebska E., Krauze R., Kościelak J., (1983), *Carbohydrate Research*, **120**, 113—130.
14. Miller-Podraza H., (praca doktorska, 1979 r.).
15. Slomiany B. L., Slomiany A., (1977), *Febs Lett.*, **73**, 175—180.
16. Momoi M., Yamakawa Y., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 317—325.
17. Hanfland P., Egge H., Dąbrowski U., Kuhn S., Roelcke D., Dąbrowski J., (1981), *Biochemistry*, **20**, 5310—5319.
18. Kannagi R., Nudelman E., Steven B. L., Hakomori S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 14865—14874.
19. Zdebska E., Chelstowska A., Kościelak J., (1980), *Glycoconjugates*, **2**, 31—43.
20. Fukuda M. N., Dell A., Oates J. E., Wu P., Klock J. C., Fukuda M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1067—1082.
21. Spooncer E., Fukuda M., Klock J. C., Oates J. E., Dell A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4792—4801.
22. Fukuda M., Spooncer E., Oates J. E., Dell A. Klock J. C., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 10925—10935.
23. Huang L. C., Civin C. I., Magnani J. L., Shaper J. H., Ginsburg V., (1983), *Blood*, **61**, 1021—1023.
24. Gooi H., Thorpe S. J., Hounsell E. F., Rumpold M., Kraft D., Foster O., Feizi T., (1983), *Eur. J. Immunol.*, **13**, 306—312.
25. Skubitz K. N., Pessano S., Bottero L., Ferro D., Rovera G., August J. T., (1983), *J. Immunol.*, **131**, 1882—1888.
26. Urdal D. L., Brentwall T. A., Bernstein I. D., Hakomori S., (1983), *Blood*, **62**, 1022—1026.
27. Magnani J. L., Ball E. D., Fanger M. W., Hakomori S., Ginsburg V., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**, 501—506.
28. Dejter-Juszyński M., Harpaz N., Flowers H. M., Sharon N., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **83**, 363—373.
29. Vitala J., Karhi K. K., Gahmberg C. G., Finne J., Järnefelt J., Myllyla G., Krusius T., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **113**, 259—264.
30. Zdebska E., Kościelak J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 517—525.
31. Zdebska E., Krauze R., Kościelak J., (1983), *Carbohydrate Research*, **120**, 113—130.
32. Krusius T., Finne J., Rauvala H., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 289—300.
33. Shenkel-Brunner H., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 529—534.
34. Wilczyńska Z., Miller-Podraza H., Kościelak J., (1980), *Febs Lett.*, **112**, 277—279.
35. Vitala J., Finne J., Krusius T., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **126**, 401—406.
36. Schachter H., Michaels M. A., Tilley Ch. A., Crookston M. C., Crookston H. J., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70**, 220—224.
37. Clausen H., Lavery S. B., Nudelman E., Tsuchiga S., Hakomori S. I., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1199—1203.
38. Clausen H., Watanabe K., Kannagi R., Lavery S. B., Nudelman E., Arao Tomono Y., Hakomori S. I., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 523—529.
39. Shauer R., (1985), *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 357—360.
40. Zdebska E., Chelstowska A., Zieleński J., Lenkiewicz B., Kościelak J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **717**, 1—5.
41. Feizi T., (1967), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **143**, 801—812.

42. Pruzański W., (1982), w Recent advances in the investigation of cold agglutinis and related antigens. I Congr. ISH/ISBT Educational Manual Budapest, 89.
43. Weiner W., Schinton N. K., Gray I. R., (1960), *J. Clin. Pathol.* **13**, 232.
44. Race R. R., Sanger R., (1975), w Blood groups in man, wyd. 6, str. 447—462, Blackwell Scientific Publication, London.
45. Dzierżkowa-Borodej W., (1971), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **25**, 789—810.
46. Gardas A., Kościelak J., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **32**, 178—187.
47. Gardas A., Kościelak J., (1974), *Vox Sang*, **26**, 227—237.
48. Watanabe K., Hakomori S. I., Childs R. A., Feizi T., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3221—3228.
49. Niemann H., Watanabe K., Hakomori S., Childs R. A., Feizi T., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1286—1293.
50. Okada Y., Kannagi R., Levery S. B., Hakomori S. I., (1984), *The Journal of Immunology*, **133**, 835—842.
51. Zdebska E., Magnuska A., Kuśnierz G., Seyfried H., Kościelak J., (1980), *Febs Lett.*, **120**, 33—36.
52. Kościelak J., Zdebska E., Wilczyńska Z., Miller-Podraza H., Dzierżkowa-Borodej, (1979), *Eur. J. Biochem.*, **96**, 331—337.
53. Fukuda M., Dell A., Fukuda M. N., (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 4782—4791.
54. Feizi T., (1981), *Immunological Communications*, **81**, 1286—1293.
55. Gardas A., (1982), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **216**, 440—448.
56. Feizi T., Childs R. A., Watanabe K., Hakomori S., (1979), *J. Exp. Med.*, **149**, 975—980.
57. Feizi T., (1980), *Medical Biology*, **58**, 123—127.
58. Feizi T., w New Vistas in Glycolipid Research, Advances in Experimental Medicine and Biology, Eds. Akira Makita, Shizuo Handa, Tamotsu Taketomi, Yoshitaka Nagai, Plenum Press, New York and London (1982), t. 152, str. 167—177.
59. Feizi T., Childs R. A., Hakomori S., (1978), *Biochem. J.*, **173**, 245—254.
60. Loomes L. N., Uemura K., Childs R. A., Paulson J. C., Rogers G. N., Scudder P. R., Michalski J. C., Hounsell E. T., (1984), *Nature* (London), **307**, 560—563.
61. Lewis S. M., Grammaticos J. P., Dacie J. V., (1970), *British Journal of Haematology*, **18**, 465—474.
62. Enguist R. V., Gockerman J. P., Jenis E. H., Warkeri R. W., Dillon E., (1972), *Annals of Internal Medicine*, **77**, 371—376.
63. Crookston J. H., Crookston M. C., Burnie K. L., Francombe W. H., Dacie J. V., Davis J. A., Lewis S. M., (1968), *British Journal of Haematology*, **17**, 11—26.
64. Zdebska E., Anselstetter V., Chelstowska A., Krauze R., Pacuszką T., Kościelak J., (1985), w Abstracts VIII th Meeting of the International Society of Hematology European and African Division, Warsaw-Poland, str. 275.
65. Fukuda M. N., Papayannopoulou T., Gordon-Smith E. C., Rochant H., Testa U., (1984), *Br. J. Haemat.*, **56**, 55—68.
66. Mawby W. J., Tanner M. J. A., Anstee D. J., Clamp J. R., (1983), *British Journal of Haematology*, **55**, 357—368.
67. Queisser W., Spiertz E., Jost E., Heimpel H., (1971), *Acta Haematol.* (Basel), **45**, 65—76.
68. Joseph K. C., Gockerman J. P., (1975), *Biochem. Biophys. Res., Commun.*, **65**, 146—152.

69. Zdebska E., Anselstetter V., Chelstowska A., Pacuszka T., Kościelak J., (1985), w Proc. 8th Int. Symp. Glyconjugates, Eds. Davidson E. A., Williams J. C., Di Ferrante N. M., Praeger New York, str. 607.
70. Basu M., Basu S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1489—1495.
71. Zieleński J., Kościelak J., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **125**, 323—329.
72. Zieleński J., Kościelak J., (1983), *Febs Lett.*, **158**, 164—168.
73. Van den Eijnden D. H., Winterwerp H., Sweeman P., Schiphorst W. E. C. M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2435—3437.
74. Zieleński J., Kościelak J., (1983), *Febs Lett.*, **163**, 114—118.
75. Piller F., Cartron J. P., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12293—12299.
76. Piller F., Cartron J. P., Maranduba A., Yeyerieres A., Leroy Y., Fournet B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13385—13390.
77. Blanken W. M., Hoogwinkel G. J. M., Van den Eijnden D. H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **127**, 547—552.
78. Pacuszka T., Kościelak J., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **64**, 499—506.
79. Basu S., Basu M., Chien J. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2956—2962.
80. Basu M., Moscal J. R., Gardner D. A., Basu S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1380—1388.
81. Presper K. A., Basu M., Basu S., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 289—293.
82. Yang H., Hakomori S., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1192—1200.
83. Stellner C., Saito H., Hakomori S., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 464—472.
84. Kościelak J., (1986), *Glycoconjugate*, **3**, 95—108.

ZOFIA SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA *

JACEK AUGUSTYNIAK **

Geny transferowych RNA: ich organizacja i ekspresja

Transfer RNA genes: their organization and expression

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Liczba genów kodujących tRNA
- III. Organizacja genów tRNA w różnych genomach
 - III-1. Organizacja genów tRNA w genomach prokariotycznych
 - III-2. Organizacja genów tRNA w genomach plastydowych
 - III-3. Organizacja genów tRNA w genomach mitochondrialnych
 - III-4. Organizacja genów tRNA w jądrowych genomach eukariotycznych
- IV. Transkrypcja genów tRNA
 - IV-1. Transkrypcja genów tRNA u Prokaryota
 - IV-2. Transkrypcja genów tRNA w plastydach
 - IV-3. Transkrypcja genów tRNA w mitochondriach
 - IV-4. Transkrypcja jądrowych genów tRNA
- V. Uwagi końcowe

Contents

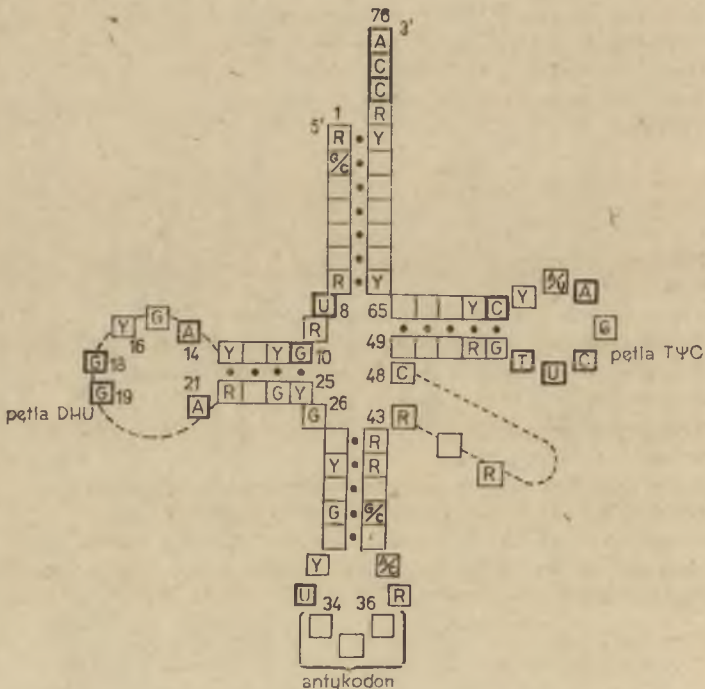
- I. Introduction
- II. Number of tRNA genes
- III. Organization of tRNA genes in different genomes
 - III-1. Organization of tRNA genes in prokaryotic genomes
 - III-2. Organization of tRNA genes in genomes of plastids
 - III-3. Organization of tRNA genes in genomes of mitochondria
 - III-4. Organization of tRNA genes in eukaryotic nuclear genomes
- IV. Transcription of tRNA genes
 - IV-1. Transcription of tRNA genes in prokaryotic genomes
 - IV-2. Transcription of tRNA genes in plastid genomes
 - IV-3. Transcription of tRNA genes in mitochondrial genomes
 - IV-3. Transcription of tRNA genes in nuclear eukaryotic genomes
- V. Concluding remarks

* mgr, ** prof. dr hab., Zakład Biochemii Biopolimerów, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

Wykaz stosowanych skrótów: pt tRNA — plastydowy tRNA, mt tRNA — mitochondrialny tRNA, tDNA — odcinek DNA kodujący gen tRNA bez sekwencji oskrzydających gen, kpz — tysiące par zasad.

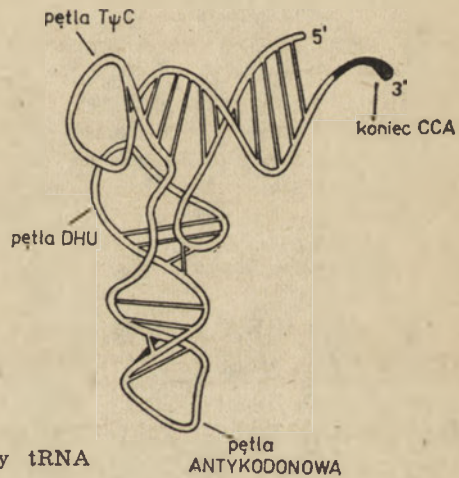
I. Wstęp

Transferowe RNA spełniają w komórce szereg bardzo istotnych funkcji [1]. Najważniejsze z nich to kierowanie aminokwasów do syntetyzowanego na rybosomie polipeptydu, w takiej kolejności w jakiej w informacyjnym RNA występują odpowiednie kodony, rozpoznawane przez antykodonowe sekwencje cząsteczek tRNA [2]. Struktura tRNA jest doskonale przystosowana do takiej ich funkcji: są to cząsteczki na tyle różne, że odczytują tylko właściwe sobie kodony i są precyzyjnie rozpoznawane przez swoiste syntetazy aminoacylo-tRNA, oraz na tyle podobne, że uczestniczą w powtarzających się etapach rybosomowego procesu biosyntezy polipeptydów niezależnie od rodzaju związanego z nimi aminokwasu. Zróżnicowanie poszczególnych tRNA wynika z odmienności sekwencji nukleotydowej i nie zawsze jednakowej długości łańcuchów, a podobieństwo stąd, że łańcuchy polinukleotydowe różnych tRNA układają się w prawie jednakowe struktury II i III-rzędowe [3—5].



Ryc. 1 II-rzędowa struktura tRNA. Stałe nukleotydy są wyrysowane w ramkach. R oznacza nukleozyd purynowy, Y — nukleozyd pirymidynowy, T — rybotymidynę, Ψ — pseudourydynę.

II-rzędowa struktura różnych tRNA układa się w „liść koniczyny” (Ryc. 1) o stałych elementach: każdy tRNA ma ramię aminokwasowe, dihydrourydyłowe, antykodonowe, dodatkowe i ramię rybotymidylowe. Charakterystyczną cechą tych cząsteczek jest także występowanie w tych samych miejscach w większości różnych tRNA jednakowych nukleotydów, określanych jako stałe lub niezmiennie (patrz Ryc. 1). Koniec 5' wszystkich tRNA jest fosforylowany, a na końcu 3' znajduje się charakterystyczna sekwencja CCA z wolną grupą 3', poprzez którą tRNA wiążą aminokwasy. Przedstawiona na rycinie 1 numeracja nukleotydów dotyczy tRNA^{Phe} z drożdży, ale przyjęto ją jako ogólny wzór dla różnych tRNA. Jeśli inne tRNA mają łańcuch nukleotydowy dłuższy niż tRNA^{Phe}, to dodatkowe nukleotydy nie są rozmieszczone w sposób przypadkowy, ale rozbudowują ramię dodatkowe lub pętlę D; jeśli są krótsze, to redukcji ulega ramię dodatkowe i ograniczeniu pętla D. Niezależnie jednak od pewnych wahań w długości łańcuchów, różne tRNA tworzą bardzo podobną strukturę III-rzędową [4, 5], przedstawioną schematycznie na rycinie 2.



Ryc. 2 Schemat trzeciorzędowej struktury tRNA

II. Liczba genów kodujących tRNA

Komórki prokariotyczne zawierają około 60 różnych rodzajów tRNA. W komórkach eukariontów występuje podobna liczba rodzajów tRNA cytoplazmatycznych, ale dochodzą tu dodatkowo tRNA mitochondrialne oraz u organizmów fotosyntetyzujących — tRNA plastydowe. Ponieważ każdy rodzaj cząsteczek tRNA jest kodowany przez odrębny gen (lub geny), łatwo stwierdzić, że każda z komórek musi mieć minimum tyle genów tRNA, ile rodzajów tRNA w niej występuje. Eksperymentalnie

ustalona liczba genów tRNA u różnych organizmów jest przedstawiona w tabeli 1.

Liczba genów tRNA u bakterii zgadza się z wartością oszacowaną na podstawie liczby rodzajów tRNA występujących w tych komórkach (ok. 60 genów). U eukariontów odbiega od niej bardzo znacznie i nie licząc genów organelowych waha się w zależności od organizmu, od około 300 (*Caenorhabditis elegans*) do około 7000 (*Xenopus*) (Tab. 1).

Tabela 1

Ogólna liczba genów tRNA w genomach niektórych organizmów (w przypadku eukariontów pominięto geny plastydowe i mitochondrialne)

Organizm	Liczba genów
Prokarioty	
<i>Escherichia coli</i>	60 (105)
<i>Bacillus subtilis</i>	60 (105)
Eukarioty	
<i>Physarum polycephalum</i>	1050 (106)
<i>Neurospora crassa</i>	2640 (106)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	360 (45)
<i>Euglena gracilis</i>	740 (107)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	800—1450 (107)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	300 (107)
<i>Drosophila melanogaster</i>	590—900 (50)
<i>Xenopus laevis</i>	6500—7800 (52)
<i>Rattus norvegicus</i>	6500 (59)
<i>Homo sapiens</i>	1310 (58)

Niektóre tRNA bakteryjne są kodowane przez pojedyncze geny tRNA (np. tRNA_{Cys} u *E. coli*) [7], inne są kodowane przez geny wielokrotnie występujące, np. u *Escherichia coli* gen tRNA_{3^{G17}} występuje czterokrotnie [6], gen tRNA_{2^{G1u}} -dwukrotnie, gen tRNA_{2^{ASP}} dwukrotnie [8]. Stężenia indywidualnych tRNA są u bakterii w przybliżeniu proporcjonalne do liczby kopii ich genów [7], a zestaw tRNA odpowiada częstości występowania określonych kodonów w mRNA, kodujących u *E. coli* ilościowo dominujące białka [9].

U eukariontów sytuacja jest znacznie bardziej skomplikowana. Wszystkie organizmy dotychczas zbadane zawierają wielokrotne kopie genów kodujących indywidualne tRNA, a jedynym znanym przypadkiem pojedynczego genu tRNA w genomie jądrowym jest gen tRNA_{UCG^{Ser}} u drożdży [10]. W genomie jądrowym żaby szponiastej znajduje się około 7000 genów tRNA, któremu pod tym względem prawie dorównuje genom jądrowy szczura; jądrowy genom człowieka ma prawie tyle samo genów tRNA co jądrowy genom *Tetrahymena*, a muchy owocowej tyle co

Euglena. Pomiedzy ogólną liczbą genów tRNA u eukariontów a fiologeniczną pozycją organizmu nie zaobserwowano zbieżności. Przyczyny występowania dużych różnic w liczbie genów tRNA u różnych organizmów nie są jasne, podobnie zresztą jak nie jest w pełni wyjaśniona sprawa występowania wielokrotnych genów w ogóle. Wiąże się to z faktem, że niektóre geny tRNA funkcjonują jako geny konstytutywne, a inne podlegają regulacji ekspresji [115]. Wiadomo, że w komórkach wyspecjalizowanych w produkcji określonych białek — np. w retikulocytach — populacja tRNA jest dobrze „dopasowana” do zestawu odczytywanych kodonów [11]. Wiadomo też, że w zależności od fazy rozwoju komórek, populacja tRNA ulega zmianom. Typowym tego przykładem są zmiany zestawu tRNA w gruczołach przednich jedwabnika, w których w piątym okresie rozwoju larwalnego następuje bardzo silny wzrost tRNA^{Gly}, tRNA^{Ser} i tRNA^{Ala} [12], związany z produkcją bogatej w glicynę, serynę i alaninę fibroiny. Zmianę populacji tRNA w zależności od syntetyzowanych białek obserwowano także w roślinach (np. w kukurydzy [13] i w łubinie [14]).

W komórkach wyspecjalizowanych w produkcji określonych białek nie następuje jednak amplifikacja genów tRNA. Wydaje się dlatego, że wielokrotność genów tRNA jest tylko jednym z elementów kontroli ich ekspresji, możliwej np. przez blokadę tych kopii genów, które występują w nadmiarze w stosunku do aktualnych potrzeb komórki.

Tabela 2

Liczba genów tRNA w genomach mitochondrialnych i plastydowych niektórych organizmów

Organizm	Mitochondria	Plastydy
<i>Homo sapiens</i>	22 (15)	—
<i>Mus musculus</i>	22 (15)	—
<i>Bos taurus</i>	22 (15)	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26 (108)	—
<i>Aspergillus nidulans</i>	26 (108)	—
<i>Zea mays</i>	?	30* (17)
<i>Spinacia oleracea</i>	?	30-45° (109)
<i>Euglena gracilis</i>	?	27* (17)
<i>Pisum sativum</i>	?	25* (110)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	?	27* (17)

* — obliczone z map restrykcyjnych, ° — obliczone na podstawie hybrydyzacji z całkowitym tRNA plastydowym

U eukariontów geny tRNA występują także w genomach organelowych. Jak przedstawiono w tabeli 2, genom mitochondrialny u ssaków ma 22 geny tRNA [15], u prostych eukariontów liczba ta jest nieco większa.

W mitochondriach ssaków każdy gen występuje tylko w jednej kopii, a genom mitochondrialny koduje po jednym izoakceptorowym tRNA dla każdego z aminokwasów, z wyjątkiem leucyny i seryny, dla których mitochondria kodują po dwa izoakceptorowe tRNA. Mitochondrialny genom drożdży jest bogatszy i koduje po dwa izoakceptorowe tRNA dla cysteiny, fenyloalaniny, metioniny, waliny i tyrozyny [16] (dla tych ostatnich po 3—4 zależnie od szczepu drożdży). Liczba tRNA kodowanych przez mitochondria nie wystarczyłaby do odczytania wszystkich kodonów, ale — jak wiadomo i o czym nieco później — w mitochondriach obowiązują trochę inne reguły kodu genetycznego niż w kodzie uniwersalnym i 22 tRNA zapewniają mitochondriom funkcjonowanie „własnego” aparatu translacji bez konieczności importu tRNA z cytoplazmy.

Genom plastydowy różnych roślin zawiera około 35 genów tRNA. Pojemność kodująca plastydowego DNA jest więc większa niż mitochondrialnego DNA. Plastydowy DNA koduje 2 lub 3 izoakceptorowe tRNA dla szeregu aminokwasów. Np. w plastydowym DNA kukurydzy stwierdzono występowanie 2 różnych genów tRNA metioninowych, izoleucynowych, glicynowych oraz asparaginowych [17] i 3 różnych genów tRNA serynowych i leucynowych, a niezależnie od tego, niektóre geny występują w 2 kopiach (np. alanina, arginina) [17].

III. Organizacja genów tRNA w różnych genomach

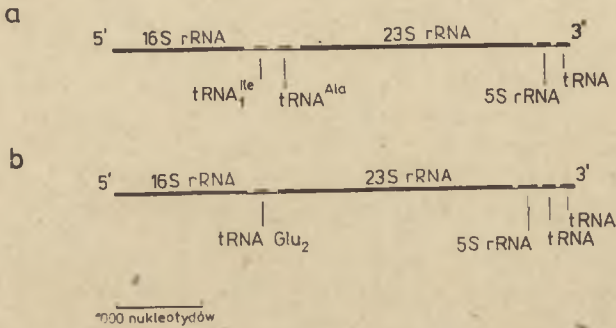
III-1. Organizacja genów tRNA w genomach prokariotycznych

Ostatnie lata przyniosły bardzo wiele nowych informacji na temat organizacji genów tRNA w genomach różnych organizmów i w przypadku niektórych organizmów organizacja genów tRNA jest poznana bardzo dokładnie. Stwierdzono, że charakterystyczną cechą organizacji genów tRNA w genomie bakteryjnym jest:

- A. występowanie genów tRNA w operonach rybosomalnych RNA
- B. tworzenie przez kilka genów tRNA zespołów stanowiących jeden operon
- C. tworzenie przez geny tRNA jednostek transkrypcyjnych wspólnych z genami kodującymi białka.

Ad. A. W chromosomie *E. coli* istnieje 7 operonów rRNA [18], oznaczonych jako *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* i *rrnH*. Są one dokładnie zlokalizowane na genetycznej mapie chromosomu *E. coli* [120]. W operonach tych geny tRNA zajmują pozycję na odcinku pomiędzy genami 16S i 23S rRNA, a dalej po stronie 3' 5S rRNA. U *E. coli* można rozróżnić dwie klasy operonów (Ryc. 3): jedna to takie operony, które w odcinku międzygenowym zawierają tylko jeden gen (tRNA^{Glu}) oraz

druga klasa, w której w tym rejonie znajdują się geny $tRNA^{Ile}$ i $tRNA^{Ala}$. Operony klasy pierwszej to *rrnB*, *rrnC*, *rrnE* oraz *rrnH*, klasy drugiej: *rrnA*, *rrnD*, *rrnG* [18]. Mapę obu klas operonów rRNA przedstawia (Ryc. 3).

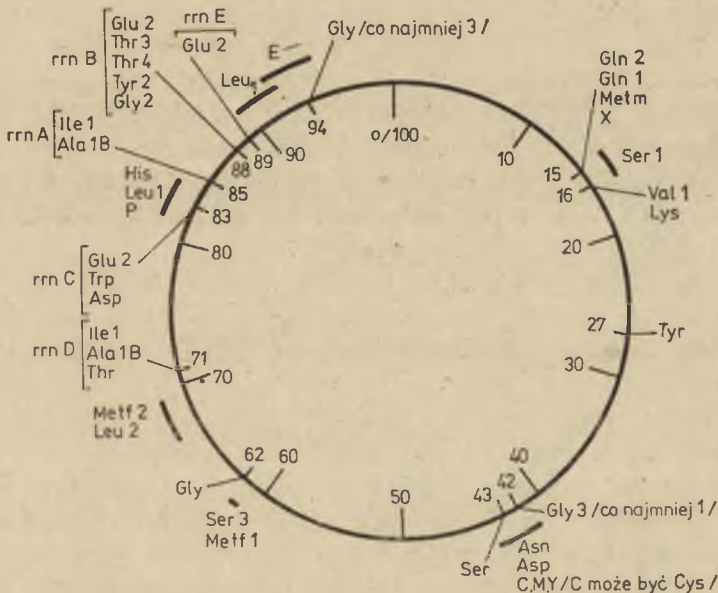


Ryc. 3 Schemat organizacji dwóch klas operonów rRNA u *E. coli*.

a — klasa druga operonów rRNA

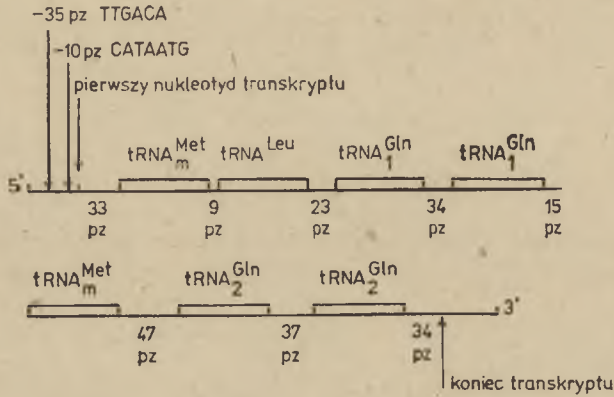
b — klasa pierwsza operonów rRNA

Ad. B. Oprócz rejonów rRNA geny tRNA są zgrupowane w chromosomie *E. coli* w 11 innych rejonach (Ryc. 4). Niektóre z nich zostały sklonowane i zsekwencjonowane. Np. dobrze poznano budowę tzw. rejonu



Ryc. 4 Lokalizacja genów tRNA na mapie genetycznej *E. coli* (111). Litera C, E, K, M, P, X, Y oznaczają niezidentyfikowane dotąd geny tRNA. Cyfry wewnątrz koła odpowiadają minutom na kolistej mapie genomu *E. coli*.

supB-e (Ryc. 5). Rejon ten zawiera zespół 7 genów tRNA podzielanych stosunkowo krótkimi odcinkami niekodującymi. Transkrypt tego zespołu genów zawiera sekwencję „liderową” (tzn. poprzedzającą koniec 5' pierwszego genu tRNA) o długości 33 pz oraz 37-mio nukleotydowy odcinek 3'



Ryc. 5 Zespół genów tRNA w rejonie *supB-E* (15 min na mapie *E. coli*). Operon zawiera zespół siedmiu genów tRNA (prostokąty) pooddzielanych krótkimi odcinkami niekodującymi. Zawiera również charakterystyczne sekwencje promotorowe (tzw. rejon -35 i -10).

końcowy. Zespół *supB-E* w położeniu -10 i -35 zawiera sygnały inicjacji typowe dla bakteryjnej polimerazy RNA. W położeniu +45 w sekwencji 3' końcowej zawarte są sygnały terminacji. Wszystkie geny tRNA tego operonu kodują końce akceptorowe (CCA) transferowych RNA [19]. Geny tRNA u bakterii nie zawsze kodują końce CCA. Np. u *Bacillus subtilis* w zespole 6 genów tRNA oddzielającym operony rRNA, 4 geny tRNA kodują końce CCA, a w pozostałych dwóch genach końcówka CCA jest dodawana do tRNA potranskrypcyjnie [20] (Ryc. 6).

Ad. C. Niektóre geny tRNA bakterii mogą być kontraskrybowane z genami kodującymi białko. U *E. coli* np. zespół 4 genów tRNA (dwa geny tRNA_{Thr} + dwa niezidentyfikowane) tworzy jednostkę transkrypcyjną wspólną z genem *tufB*, kodującym białkowy czynnik elongacyjny EF-Tu [21, 22].

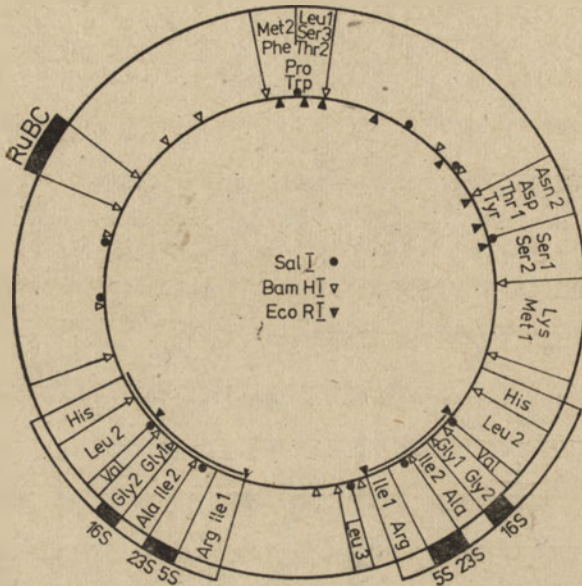
Do niedawna uważano, że geny tRNA u prokariotów nie zawierają intronów. Dużym zaskoczeniem był więc fakt wykrycia tych sekwencji w genach *Archebacteria* (w genomach *Eubacteria* nie stwierdzono obecności sekwencji intronowych). I tak u *Sulfolobus solfataricus* w genie tRNA_{Ser} i tRNA_{Leu} stwierdzono obecność odpowiednio 25-cio i 15-to nukleotydowych intronów. Umieszczone są one w pętli antykodonowej między pierwszym a drugim nukleotydem po stronie 3' antykodonu (umieszczenie to jest typowe dla intronów genów tRNA u eukariotów) [23].

23 S
 ACTAATC GATCGAGGACTTAACCATAT TTTTGAATGATGTCACATCTGTTATCTAGTTTT
 GAGAGAACACTCTCAATTTGTTGGTGGCGA TAGCGAAGAGGTCACACCCGTCCCATAC
5 S
 CGAACACC GAAGTTAAGCTCTTCAGCGCCGATGGTAGTCGGGGTTTCCCCCTGTGAGAG
 TAGGACGCCGCCAAGCAGATTTATTAATTCTACCATGTTTATGAAGCTTTATATCTCATT
 CGCAGTAGCTCAGTGGTAGAGCTATCGGCTGTTAACGGATCGGTCGTAGGTTTGAATCC
Asn
 TACCTGCGGAGCATTGCTTCCATAGCTCAGCAGGTAGAGCAC TCCATGGTAA GGAAGAG
Thr
 GT CAGCGGTTTCGAGCCCGC TTGGAAGCTTAAATGATTTATACCAAGGTTTCATAAAG
 AGAAAGCTTTTTTATTGCGATATGCGGAAGTAGTTCAGTGGTAGAACACCACCTTGCCA
Gly
 AAGTGGGGTTCGCGGGTTCGAATCCCGTCTTCCGCTCCATTACCTAACGGGATATTGTA
Arg
 AATGGAATTGGCCCCGTAGCTCAATTGGATAGAGCTTTGACTACGGATCAAAGGTTAG
 GGGTTCGACTCCTCTCGGGCGGCCA TATCTTTTAATAGAATAGATAGGAAATCGGCAAG
Pro
 TAGCTCAGCTTGGTAGAGCACATGGTTTGGGACCATGGGGTCGACGTTTGAATCCTGTC
Ala
 TTCCCGACCA TTTTTTATGGGGCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCTGCTTTGCACGCAG
 GAGGTACGCGGTTTCGATCCCGTAGGCTCCACCAAAAGTTTTTAAAAAAGGTTATTGACT
 TTGAAGAAGTGACATTGTATACTAATAAAGTTGCTTTAACAAACCGACAAACAAAATGA
 TCTTTGAAAAC TAAACAAGACAAAACGTACCTGTTAATTCAGTTTTTAAAAATCGCACAG
16 S
 CGATGTCCGTAGTCAGTCAAAC TACTTTATCGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAC
 GCTGGCGGCGTGCCATAATACATGCAAGTCG

Ryc. 6 Sekwencja nukleotydów DNA *Bacillus subtilis*, obejmująca zespół sześciu genów tRNA. Sekwencje tRNA są zaznaczone linią ciągłą, strzałki wskazują geny tRNA nie kodujące końców CCA, dodatkowo podkreślono sekwencje CCA kodowane przez niektóre geny tRNA.

III-2. Organizacja genów tRNA w genomach plastydowych

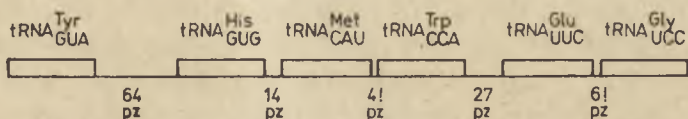
Organizację genów tRNA podobną do bakteryjnej wykazują genomy plastydowe (Ryc. 7). DNA plastydów jest stosunkowo mały, jego wielkość waha się w granicach od 119 kpz [24] do około 182 kpz [25]. Pla-



Ryc. 7 Lokalizacja genów tRNA na mapie restrykcyjnej plastydowego DNA kuku-rydzy. Linia pogrubioną zaznaczono geny rRNA [17].

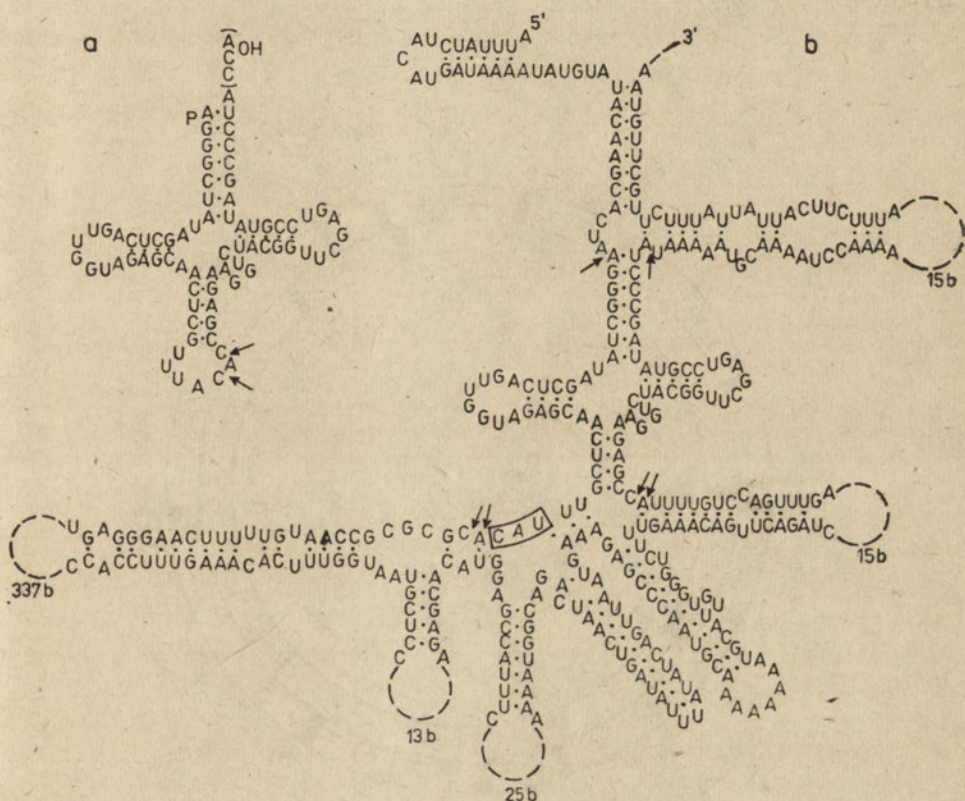
stydowe DNA z różnych organizmów wykazują znaczną homologię sekwencji i duże ogólne podobieństwo organizacji całego genomu. Charakterystyczną cechą plastydowego genomu jest lokalizacja dwóch zespołów genów rRNA, ułożonych w odwrotnej orientacji. Zespoły te są w kolistym ptDNA oddzielone od siebie tzw. krótkim i długim rejonem o unikalnej sekwencji [24, 26]. Niektóre rośliny zawierają ptDNA pozbawiony jednego z operonów rRNA (np. groch, wyka) [27], a u *Euglena* w plastydowym DNA znajdują się trzy operony rRNA ułożone kolejno w tej samej orientacji [28]. Organizacja operonów rRNA jest typowa dla prokariotów: geny rRNA są ułożone w kolejności 16S- 23S- 5S. W plastydowych operonach rRNA geny tRNA są zlokalizowane pomiędzy genami rRNA, a także występują po obu stronach operonów. W różnych roślinach pomiędzy 16S a 23S rRNA są ulokowane geny różnych tRNA, najczęściej jednak są to tRNA^{Ala} i tRNA^{Ile}, a więc te same, jakie spotykamy w klasie drugiej operonów u *E. coli*. Gen 16S jest często poprzedzany przez geny tRNA^{Leu}₂, tRNA^{Val}, tRNA^{Ile}, a za genem 5S występują geny tRNA^{Ile}₁, tRNA^{Arg}. Inne geny tRNA są zlokalizowane w różnych miejscach plastydowego genomu, często w formie zespołów genów (Ryc.

8). Zespoły takie są w różnych roślinach zlokalizowane różnie: w plastydowym genomie kukurydzy są np. dwa rejony w których są ulokowane „zespoły genów tRNA” [17]. Podobną organizację genów tRNA stwierdzono w genomie pt *Euglena* [28].



Ryc. 8 Zespół genów tRNA w plastydowym DNA *Euglena gracilis*. Żaden z tych genów nie koduje końców -CCA. Zwraca uwagę podobieństwo do zespołu genów u *E. coli* [112].

Geny tRNA plastydów nie kodują końców CCA, czym w istotny sposób różnią się od większości genów tRNA prokariotów, a ponadto geny niektórych tRNA zawierają sekwencje intronowe. Stwierdzono, że se-



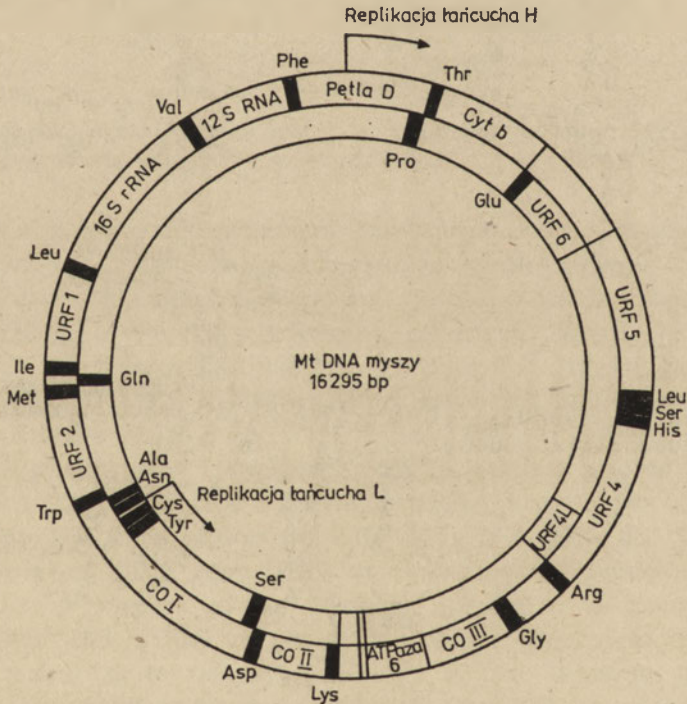
Ryc. 9 a — Struktura II-rzędowa chloroplastowego tRNA^{val} z tytoniu b — struktura prekursora tRNA^{val} zawierająca sekwencję intronową o długości 571 pz. Strzałkami zaznaczono miejsca rozcięcia prekursora, sekwencja antykodonu jest ujęta w ramce [32].

kwencje intronowe występują w genach $tRNA^{Ile}$, $tRNA^{Ala}$, $tRNA^{Val}$, $tRNA^{Leu}$ w kukurydzy [29] oraz w $tRNA^{Val}$ w tytoniu [30]. Introny w plastydowych tRNA są bardzo długie — najdłuższy dotąd opisany intron znaleziono w pt genie $tRNA^{Lys}$ tytoniu. Długość jego wynosi 2526 pz [31]. Mimo tak długich intronów geny te ulegają ekspresji. Np. gen $tRNA^{Val}$ z plastydów tytoniu (Ryc. 9) koduje transkrypt o długości 750 nukleotydów. Transkrypt zawiera intron o długości 571 nukleotydów. Na nici kodującej ten tRNA stwierdzono obecność tzw. „otwartej ramki odczytu” (ang. ORF-open reading frame) w intronie i nachodzącej na połówkę 5' tRNA [32]. Znaczenie długich sekwencji intronowych w genach tRNA plastydów nie jest wyjaśnione, nie wiadomo także, czy ORF w nich zawarte kodują jakieś białka.

III-3. Organizacja genów tRNA w genomach mitochondrialnych.

Geny tRNA mitochondriów są u różnych organizmów zorganizowane niejednolicie (różnie).

Na podstawie dotychczasowych obserwacji można wyróżnić w zasadzie trzy typy organizacji mt genów tRNA:

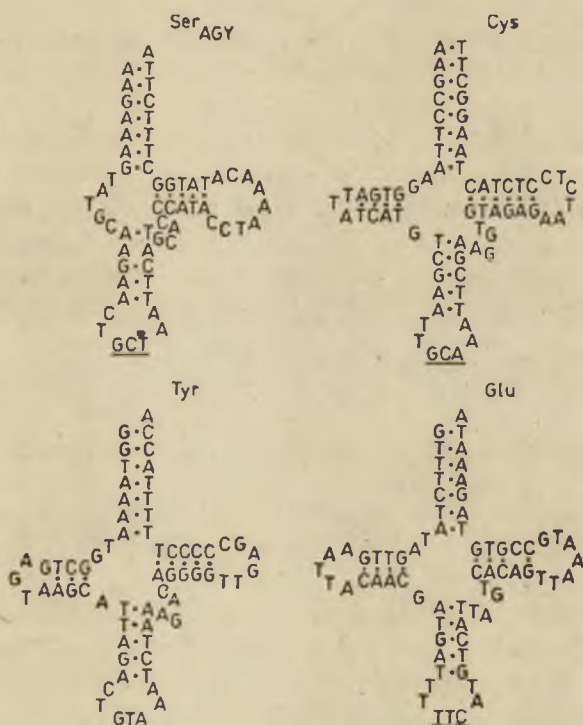


Ryc. 10 Lokalizacja genów tRNA w mitochondrialnym genomie myszy [37]. URF — „otwarta ramka odczytu”, COI, COII, COIII — podjednostki oksydazy cytochromowej I, II i III, *cyt b* — cytochrom b, *ATPaza 6* — podjednostka F6 ATP-syntetazy.

A. Geny 21S rRNA i 15S rRNA są oddzielone sekwencją o długości około 5 kpz. Gen dużego rRNA (21S) zawiera intron, po obu stronach genu rRNA są zlokalizowane geny tRNA, zgrupowane w dwóch zasadniczych zespołach. U *Aspergillus* 9 genów (940 pz) występuje po stronie 5' rRNA, a 11 genów po stronie przeciwnej (978 pz). Sekwencje rejonów kodujących tRNA są znane. Żaden z genów tRNA nie koduje końca CCA, odcinki intergenowe charakteryzują się dużą zawartością AT. Odcinki te są bardzo krótkie, a niektóre geny są od siebie pooddzielane tylko pojedynczym nukleotydem [33]. Podobną organizację genów tRNA spotykamy u *Neurospora crassa* [34].

B. W drożdżach piekarskich geny dużego i małego rRNA zajmują na kolistej mapie mt DNA położenie prawie przeciwległe, a większość genów tRNA jest zgrupowana w pobliżu dużego rRNA, jednak odcinki międzygenowe, zawierające również dużo AT, są znacznie dłuższe [35].

C. Trzeci typ organizacji genów tRNA w mt DNA jest reprezentowany przez mt genomy ssaków. Obecnie znana jest już sekwencja całego genomu mt człowieka [36], myszy [37], wołu [38] oraz duże fragmenty mt DNA szczura [39]. W genomie mitochondrialnym myszy (Ryc. 10) 14 genów jest zlokalizowanych na łańcuchu H (ciężkim), 8 na



Ryc. 11 Struktura II-rzędowa niektórych genów tRNA z mitochondriów wątroby szczura [113].

łańcuchu L (lekkim). Większość genów występuje oddzielnie, a największy zespół genów tRNA, ulokowanych na tym samym łańcuchu DNA, obejmuje 4 geny. Charakterystyczną cechą mt genów tRNA u ssaków jest bardzo ścisły ich kontakt z innymi genami — pomiędzy poszczególnymi genami brak sekwencji niekodujących. Żaden z genów nie koduje CCA, żaden nie koduje sekwencji intronowych.

Obydwa łańcuchy mt DNA ulegają transkrypcji jako pojedyncze operony, tworząc po jednym dużym transkrypcie. W transkrypcie tym sygnałami dyktującymi właściwe jego rozcięcie są sekwencje tRNA [39]. Miejsce inicjacji transkrypcji jest zlokalizowane w pobliżu miejsca inicjacji replikacji [40].

Transferowe RNA kodowane przez mt DNA ssaków i niektórych owadów różnią się od tRNA cytoplazmatycznych (Ryc. 11): pętla D często nie zawiera stałych nukleotydów G18 i G19, brak sekwencji TΨCPuA, a najbardziej niezwykłym tRNA jest tRNA^{ser}, który u ssaków zawiera tylko 59 nukleotydów i w ogóle nie ma ramienia D [36, 41, 42].

Transferowe RNA mitochondriów ssaków, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* różnią się od innych, „standardowych” tRNA także i tym, że podlegają nieco innym regułom odczytywania kodonów niż w kodzie uniwersalnym. Główne różnice polegają na tym, że kodon UAG koduje tryptofan, a nie jest kodonem terminacyjnym, AUA koduje metioninę zamiast izoleucyny, a kodony AGG i AGA nie są używane (choć niedawno wykazano [41], że w mitochondriach muchy owocowej kodon AGA jest wykorzystywany).

Interesujące są spostrzeżenia dotyczące występowania identycznych sekwencji w DNA plastydów i mitochondriów. Dotyczy to także niektórych genów tRNA, np. Stern i Lonsdale [43] donieśli, że w pt i mt DNA kukurydzy znajdują się homologiczne sekwencje o długości około 12 kpz. Sekwencje te zawierają geny tRNA^{ile} i tRNA^{val}, oraz 16S rRNA. Spostrzeżenia te sugerują „przemieszczanie się” w toku ewolucji fragmentów DNA między poszczególnymi przedziałami komórkowymi u eukariontów.

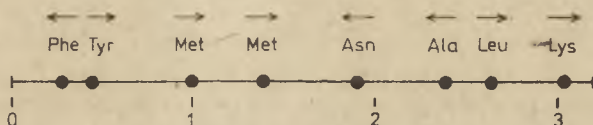
III-4. Organizacja genów tRNA w jądrowych genomach eukariotycznych

Większość genów tRNA u drożdży jest rozproszona w całym genomie [44]. Np. 8 genów tRNA^{tyr}, występujących w tym genomie, jest zlokalizowanych na 6 różnych chromosomach [45]. Każdy z tych genów występuje w innym fragmencie restrykcyjnym, spośród których siedem sklonowano i badano bardzo szczegółowo. Tylko jeden fragment oprócz genu tRNA^{tyr} zawierał jeszcze inny gen tRNA. Geny tRNA^{phe} były zlokalizowane w 10 różnych fragmentach restrykcyjnych, geny tRNA^{leu} w 14 [46, 47]. Obserwacje te sugerowały całkowicie przypadkowe rozmieszczenie genów tRNA w jądrowym genomie drożdży. Oprócz genów

rozproszonych, sporadycznie występują niewielkie zespoły genów. Np. pojedyncze kopie genów $tRNA_3^{Arg}$ i $tRNA^{Asp}$ są oddzielone odcinkiem międzygenowym o długości zaledwie 10 pz. Zespół tych dwóch genów jest wspólnie transkrybowany, dając jeden dimeryczny prekursor tRNA. Jest to jednak sytuacja u drożdży wyjątkowa, potwierdzająca przypadkowe rozmieszczenie genów tRNA w tym genomie [48].

U *Drosophila melanogaster* organizacja genów tRNA jest odmienna: stosując technikę hybrydyzacji *in situ* stwierdzono, że ponad 15% wszystkich genów tRNA jest zlokalizowanych na jednym chromosomie. Ogółem wykryto około 60 loci, w których występują zespoły genów, zazwyczaj różnych tRNA [49] ale są loci także i takie, które zawierają geny tylko jednego rodzaju tRNA [50]. Zespoły genów tRNA u *Drosophila* są jednak zorganizowane znacznie „luźniej” niż zespoły genów u prokariotów. Np. w stosunkowo dobrze poznanym rejonie o długości 46 kpz znajduje się 8 genów $tRNA^{Asn}$, 4 $tRNA^{Arg}$, 5 $tRNA_2^{Lys}$, 1 gen $tRNA^{Ile}$, łącznie tylko 18 genów [53].

U *Xenopus laevis* geny tRNA również są zgrupowane [52], ale skala wielkości tych zgrupowań jest proporcjonalna do bardzo dużej liczby kopii genów tRNA w tym organizmie. Typowy dla genomu *Xenopus* jest zespół genów tRNA położony w pobliżu telomeru na jednym z krótkich chromosomów. Zespół ten składa się z około 150 kopii fragmentów o długości około 3,18 kpz (Ryc. 12) [53]. Przeciętnie fragment taki za-



Ryc. 12 Fragment DNA *Xenopus laevis* wielkości 3,18 kpz zawierający zespół 8 genów tRNA. Fragment taki jest w tandemowym ułożeniu powtórzony około 150 razy w jednym rejonie chromosomu. Polarność genów tRNA zaznaczono strzałkami [114].

wiera dwa geny $tRNA_1^{Met}$ i pojedyncze geny dla 6 innych tRNA. Odcinki międzygenowe są bardzo nieregularne, geny rozmieszczone są na obu łańcuchach DNA, a jeden z genów tRNA ($tRNA^{Tyr}$) zawiera intron długości 13 pz [54].

Wielokrotne geny tRNA u ssaków są w większości rozproszone w genomie, ale niektóre z nich tworzą grupy. Np. u myszy zespół tworzą trzy geny $tRNA^{His}$, hybrydujące z tym samym fragmentem restrykcyjnym o długości 15 kpz. Geny te mają jednakowe sekwencje oskrzydlające [55]. W genomie człowieka stwierdzono [56] obecność segmentu o długości 1,65 kpz, zawierającego geny $tRNA_3^{Lys}$, $tRNA^{Gln}$ i $tRNA^{Leu}$. Odcinki międzygenowe miały długość około 500 pz, a sekwencje oskrzydlające geny nie wykazywały istotnych homologii z sekwencjami oskrzydlającymi in-

ne jądrowe geny tRNA. Ciekawej obserwacji w świetle tych doniesień dokonali Han i Harding [57], którzy stwierdzili wysoki procent homologii sekwencji oskrzydających geny tRNA ze strony 5' u genów tRNA^{Met} myszy i tRNA^{Met} człowieka [58].

Podobną organizację genów tRNA jak u myszy i człowieka wykazuje zespół trzech genów (Asp, Gly, Gln) [59] zlokalizowany we fragmencie o długości 2,1 kbp oraz zespół 6 genów (3 tRNA^{Pro}, 3 tRNA^{Lys}) we fragmencie o długości 11,9 kbp [60] u szczura.

Genomy roślin naczyniowych są pod względem organizacji genów tRNA prawie zupełnie nieznanymi. Jedyne dotychczas poznane geny tRNA u roślin to tRNA^{Asp} petunii [61] i geny tRNA^{Asp}, tRNA^{Met} soi [62].

W genie tRNA^{Met} soi, między pierwszą a drugą zasadą po stronie 3' antykodonu stwierdzono obecność intronu wielkości 11 pz. Jest to najkrótszy z dotąd poznanych intronów jądrowych genów tRNA. Oba geny tRNA soi znajdują się na różnych bardzo dużych fragmentach jądrowego DNA (10 kbp, 12 kbp), w których nie stwierdza się obecności innych genów tRNA. To samo dotyczy genu tRNA^{Asp} petunii. Sugeruje to, iż opisane geny tRNA nie wchodzi w skład żadnego zespołu genów tRNA.

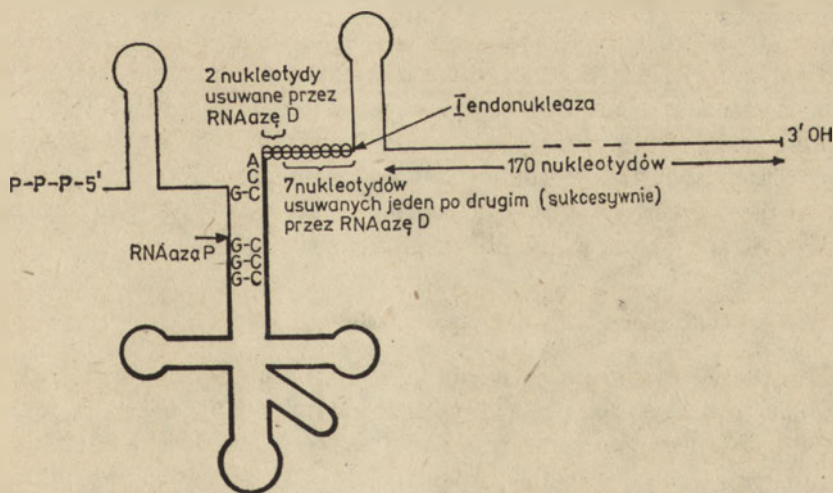
IV. Transkrypcja genów tRNA

IV-1. Transkrypcja genów tRNA u Prokaryota

Operony prokaryotów, w tym także operony zawierające geny tRNA, wykazują charakterystyczne sekwencje promotorowe. Są to tzw. rejon -10 (Pribnow box) (TATAAT) i -35 (TTGACA) [63]. Sekwencje te są rozpoznawane przez bakteryjną polimerazę RNA, a ściślej biorąc przez jej podjednostkę sigma. W operonach tRNA i rRNA oprócz tych sekwencji, stwierdzono w rejonie 5' transkryptów sekwencje bogate w GC, które w pewnym oddaleniu od końca 5' są powtórzone w odwrotnej orientacji, dzięki czemu mogą tworzyć strukturę helikalną, często palindromową. Np. u *Bacillus subtilis* występuje sekwencja GCAACGC na końcu 5' transkryptu i sekwencja ta jest powtórzona w odwrotnej orientacji za drugim genem tRNA w tym operonie [64, 65]. Ich obecność wiąże się z większą aktywnością genów kodujących tRNA (i inne stabilne RNA np. rRNA) niż genów kodujących białka. Interesujące obserwacje dotyczące aktywności transkrypcyjnej genów tRNA uzyskano w pracowni Holmes'a [66]: do operonu tRNA^{Leu} (z *E coli*) wklonowanego w plazmid pBR 322 „podłączono” gen kodujący galaktokinazę. Stwierdzono, że pod kontrolą promotora operonu tRNA^{Leu}, transkrypcja tego genu przebiega co najmniej trzy razy szybciej niż w warunkach kontrolnych, gdy gen galaktokinazy zawierał swój „własny” promotor. Sugeruje się, że sekwencje bogate w GC znajdujące się w pewnym od-

niu od końca 5' genu, mogą przeciwdziałać przedwczesnej terminacji, a także, że mogą brać udział w regulacji transkrypcji operonów stabilnych RNA w odpowiedzi na sygnał głodu przekazywany przez cztery i pięćofosforany guanozyny [67] (wiadomo, że transkrypcja genów tRNA i rRNA jest ściśle skoordynowana z szybkością wzrostu komórek- tzw. "growth rate-dependent control" i dostępnością aminoacylo-tRNA- tzw. "stringent control", a transkrypcja genów kodujących mRNA, nie [68]. L a m o n d i T r a v e r s [69]) przedstawili ostatnio ciekawą pracę związaną z zahamowaniem syntezy rRNA i tRNA przy pojawieniu się cztery i pięćofosforanów guanozyny. Wykazali oni, że substytucje czterech par zasad w rejonie przylegającym do miejsca inicjacji transkrypcji genu tRNA^{Tyr} z *E. coli* rozprzegają zależność pomiędzy ppGpp(p), a poziomem stałych RNA w komórce. Tak więc kontrola ta zachodzi na poziomie inicjacji transkrypcji. Wykazano również, że wydajna transkrypcja stabilnych RNA zależy od sekwencji oddalonych o kilkadziesiąt nukleotydów od końca 5' tych genów. T r a v e r s i w s p. [116] stwierdzili, że delekcja nukleotydów w rejonie poprzedzającym gen tRNA^{Tyr} (*tyr T*) z *E. coli* (w pozycjach -40 do -98 pz) powodowała 10—12-krotny spadek wydajności transkrypcji. Podobne wyniki uzyskano dla rejonu promotorowego operonu *rrnB* u *E. coli* [117]. Porównanie sekwencji nukleotydowej tych rejonów w przypadku różnych genów stabilnych RNA nie wykazało żadnej homologii tych sekwencji. Uważa się, że rejonny te dzięki zdolności do przyjmowania odpowiedniej struktury przestrzennej, mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji tych genów [118].

Znane są sygnały terminacji transkrypcji prokariotycznych genów tRNA. Terminacja może być zależna od tzw. czynnika *ro* (grecka lite-



Ryc. 13 Schemat dojrzewania tRNA^{Tyr}. Linią pogrubioną oznaczono dojrzałą cząsteczkę tRNA.

ra ρ), jak i niezależna. I tak w operonie $tRNA^{Tyr}$ u *E. coli*, czynnik *ro* rozpoznaje sekwencję kończącą transkrypcję CAATCAAATAT [70] zlokalizowaną w pozycji + 48 od końca 3' ostatniego nukleotydu kodującego $tRNA$ w tej jednostce transkrypcyjnej. Z kolei operon *supB-E* u *E. coli* (w pozycji + 32 do + 35 za ostatnim kodowanym genem $tRNA$) zawiera rejon trzech nukleotydów CTT, w którym następuje terminacja transkrypcji. Rejon ten jest poprzedzony odcinkiem 26 nukleotydów, który może tworzyć strukturę helikalną typową dla terminacji transkrypcji niezależnej od czynnika *ro* (Ryc. 13) [71]. Policistronowe RNA, zawierające cząsteczki $tRNA$, ulegają dalszej obróbce, prowadzącej do powstania funkcjonalnych cząsteczek $tRNA$. Najlepiej poznanym $tRNA$ z tego punktu widzenia jest $tRNA_1^{Tyr}$ z *E. coli*. Istnieją dwie kopie odcinka DNA, z którego $tRNA_1^{Tyr}$ jest transkrybowany. Kopie te przylegają do siebie. Każda z tych kopii składa się z 350-ciu pz. W badaniach nad dojrzewaniem pierwotnego transkryptu użyto jednostkę 350-ciu pz. Transkrypcja zaczyna się w pozycji -41 przed końcem 5' tDNA, a kończy się (terminacja zależna od czynnika *ro*) 224 nukleotydy za końcem 3' genu $tRNA$. Proces dojrzewania tego prekursorowego $tRNA$ rozpoczyna się wstępnym formowaniem końca 3' $tRNA$. Endonukleaza przecina prekursorowy $tRNA$ od strony 3' rozpoznając charakterystyczną, helikalną sekwencję występującą w pre- $tRNA$ (Ryc. 13). Powstały fragment pre- $tRNA$ zawiera jeszcze za końcem 3', dziewięć nukleotydów, z których siedem jest usuwanych przez egzonukleazę D (lub inaczej RNazę Q). Egzonukleaza kończy trawienie zostawiając dwa nukleotydy po stronie 3' $tRNA$. Są one usuwane później, gdy utworzony zostanie koniec 5' $tRNA$. Pre- $tRNA$ na tym etapie wygląda następująco: P-5'-(41 nukleotydów)- $tRNA$ -(2 nukleotydy)-3' OH. Tworzenie końców 5' dojrzałych $tRNA$ katalizuje endonukleaza P. RNaza P rozpoznaje II i III-rzędową strukturę $tRNA$ zawartego w transkrypcie [72, 73]. Po uformowaniu końca 5' RNaza D usuwa dwa nukleotydy z końca 3' $tRNA$ i w ten sposób cząsteczka $tRNA$ uzyskuje swoją ostateczną długość [74].

Transferowe RNA zawierają szereg modyfikowanych nukleotydów. Odpowiednie modyfikacje zachodzą w trybie zmian potranskrypcyjnych, niektóre na wczesnych etapach „obróbki” transkryptu. Zagadnienie to jednak wykracza poza ramy obecnego tematu.

IV-2. Transkrypcja genów $tRNA$ w plastydach

Chloroplasty zawierają co najmniej dwie różne polimerazy RNA. Jedną z nich transkrybuje plastydowe geny rRNA [75], druga z nich jest specyficzna dla transkrypcji pt genów $tRNA$. Grupa Hallicka [77] wykazała, że polimeraza ta, izolowana z chloroplastów szpinaku była aktywna w stosunku do pt genów $tRNA$ *Euglena*. Uzyskane transkrypty podlegały również poprawnej obróbce potranskrypcyjnej w ekstrak-

cie chloroplastowym szpinaku. Badając sekwencje oskrzydłające w pt genach tRNA *Euglena* i w niektórych pt genach szpinaku, grochu i tytoniu, autorzy ci zaproponowali 9-cio nukleotydową sekwencję, powtarzającą się w tych wszystkich przypadkach, jako promotorową dla tej polimerazy. Sekwencja ta wygląda następująco: 5'GT_T NTA_{TT} 3' i w przypadku zbadanych genów tRNA^{Val} szpinaku, grochu, jęczmienia i kukurydzy znajduje się w odległości 14pz „w lewo” od pierwszego, kodującego tRNA nukleotydu. Sugestia, iż sekwencja ta pełni rolę promotora nie została jak dotąd ostatecznie udowodniona. Np. wykazano brak takiej sekwencji w rejonie poprzedzającym pt gen tRNA^{Arg} pelargonii [76]. Z drugiej strony, rejony poprzedzające wiele pt genów tRNA, zawierają sekwencje promotorowe typowe dla *Prokaryota* (tzn. rejony -10 i -35) [77, 78]. Nie ma jednak bezpośredniego dowodu, że sekwencje te funkcjonują jako sekwencje promotorowe w chloroplastach.

Mechanizm terminacji transkrypcji pt genów tRNA jest nieznanym. W niektórych przypadkach [79] w pewnej odległości za końcem 3' tDNA znajduje się struktura helikalna, za którą występuje ciąg reszt T. Przypuszcza się, iż struktura ta może odgrywać pewną rolę w zakończeniu transkrypcji.

IV-3. Transkrypcja genów tRNA w mitochondriach

Transkrypcja genów tRNA w mt genomach ssaków została już pokrótce przedstawiona przy omawianiu ich organizacji w mitochondriach.

Dość dużo wiadomo na temat transkrypcji mt genów u grzybów (konkretnie u drożdży). Christianson i Rabinowitz [82] stwierdzili, że w mitochondriach drożdży transkrypcja wielu genów rozpoczyna się w obrębie dziewięcionukleotydowej sekwencji, która jest częścią promotorowego rejonu dla mitochondrialnej polimerazy RNA. Sekwencja ta wygląda następująco: NTATANGTA^x (x przy ostatniej adeninie oznacza pierwszy transkrybowany nukleotyd). 9-cio nukleotydowe rejony promotorowe znaleziono w rejonach poprzedzających ze strony 5' sekwencje kodujące dla tRNA^{Tyr}, tRNA^{Met} i tRNA^{Phe} drożdży [81].

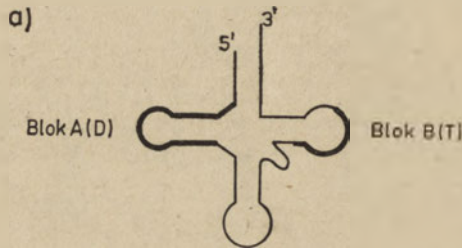
Niektóre geny tRNA mitochondriów drożdży piekarskich są transkrybowane wspólnie z genami kodującymi białko (np. gen dla trzeciej podjednostki oksydazy cytochromowej *oxi 2* jest wspólnie transkrybowany z tRNA^{Val} [82]).

IV-4. Transkrypcja jądrowych genów tRNA

W organizmach eukariotycznych transkrypcję genów tRNA (a także genów 5S rRNA, niektórych wirusowych RNA i pewnych sekwencji „średnio powtarzających się”) prowadzi polimeraza RNA III. Jest to du-

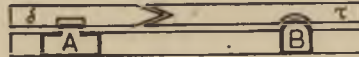
ży kompleks enzymatyczny o masie około 700 kD, zbudowany z co najmniej 10 podjednostek [83]. W doświadczeniach *in vitro* oczyszczony enzym nie jest zdolny do prowadzenia wiernej transkrypcji genów tRNA lecz wymagane są do tego dodatkowe czynniki białkowe.

Badania nad genami tRNA wykazały obecność dwóch nieciągłych rejonów wewnętrznych pełniących funkcje promotorów. Pierwszy z nich zwany jest blokiem A lub D (gdyż w dojrzałej cząsteczce tRNA obejmuje część nasady i ramienia D), drugi z nich określa się mianem B lub T (gdyż obejmuje ramię T^ψC) (Ryc. 14a) [84]. Substytucje w rejo-



Ryc. 14 a. Lokalizacja wewnętrznych promotorów (blok A i B) w cząsteczce tDNA^{A7E} *Drosophila*. Linia pogrubioną oznaczono rejony promotorowe [87].

b)



b. Schemat przedstawiający udział czynników białkowych σ i τ w procesie transkrypcji genu tRNA.

nach A lub B wyraźnie obniżają wydajność transkrypcji zmienionych genów, a delecje kilku zasad zupełnie ją hamują [85]. Wykazano, że odcinek genu między blokami A i B nie jest istotny dla transkrypcji, jednak wydłużanie tego rejonu w hybrydowych genach tRNA prowadziło do obniżenia wydajności transkrypcji, a w skrajnym przypadku do jej zahamowania [86].

Oprócz bloków A i B do pełnej aktywności matrycowej genu tRNA niezbędne są sekwencje oskrzydłające owe bloki, a zlokalizowane w kierunku 3' ze strony bloku B i 5' ze strony bloku A. Sekwencje te, jak i sekwencje promotorowe, są rozpoznawane przez dodatkowe czynniki białkowe warunkujące aktywność transkrypcyjną polimerazy III [87, 88]. W pracowni D. Sölla [87] częściowo oczyszczono i scharakteryzowano czynniki białkowe niezbędne dla specyficznej transkrypcji genów tRNA. Nazwano je TFIIIB i TFIIIC. Dinger mann i wsp. [86] za-

proponowali hipotezę oddziaływania czynników białkowych z matrycą DNA. Zamiast terminów TFIIIA i TFIIIB wprowadzili odpowiednio oznaczenia τ i σ . Czynniki σ wiąże się z blokiem A — jednak nietrwale. Z chwilą, gdy do bloku B przyłączy się czynnik τ (tworzący z matrycą stabilny kompleks), czynnik σ zostaje przyłączony trwale i następuje utworzenie kompleksu inicjującego transkrypcję. Dodatkowo czynnik τ i σ miałyby ze sobą oddziaływać (Ryc. 14 b).

Szereg prac wykazało znaczenie sekwencji poprzedzających geny tRNA ze strony 5' dla wydajności transkrypcji. Niektóre z genów tRNA drożdży i owadów mają trzeci rejon kontrolujący transkrypcję. W niektórych genach tRNA u drożdży stwierdzono silnie konserwatywną sekwencję między pozycjami -12 do -2 (w stosunku do tDNA) [89]. Johnson i Raymond uważają, że sekwencja ta, wraz z blokami A i B, prowadzi do powstania specyficznego kompleksu inicjującego transkrypcję. Obecność trzeciego bloku promotorowego u drożdży i owadów autorzy wiążą ze specyficznością polimerazy III charakterystyczną ich zdaniem dla bezkręgowców. Geny tRNA kręgowców nie mają trzeciego bloku promotorowego (komórki HeLa, *Xenopus laevis*). Ostatnie doświadczenia Drabkina [90] potwierdziły wyniki uzyskane w pracowni Raymonda [89]: wprowadzony do ekstraktu drożdżowego gen tRNA^{Met} człowieka nie podlegał transkrypcji, podczas gdy równolegle wprowadzone geny tRNA drożdży były transkrybowane bardzo wydajnie.

Obserwacja, że rejony A i B pełnią funkcję nieciągłych promotorów w genach tRNA, stawia w zupełnie nowym świetle znaną od dawna ewolucyjną zachowawczość tych rejonów w cytoplazmatycznych tRNA. Wydaje się, że wynika ona nie tyle z funkcji tych rejonów cząsteczki tRNA, ile z wymogów transkrypcji ich genów (np. sugerowano, że podczas translacji sekwencja TΨC tRNA wiąże się z 5S rRNA [91]).

Pierwotne transkrypty genów tRNA są znacznie większe niż dojrzałe cząsteczki tRNA i zawierają po obu stronach tRNA sekwencje dodatkowe. Niektóre geny tRNA zawierają ponadto sekwencje intronowe, które również ulegają transkrypcji. Wszystkie sekwencje dodatkowe są w procesie dojrzewania tRNA usuwane z transkryptów. Dodatkowe sekwencje 5' końcowe z transkryptu usuwa endorybonukleaza bardzo podobna do prokariotycznej RNazy P. Np. u jedwabnika stwierdzono występowanie RNazy podobnej do RNazy P, która odcina z końców 5' dodatkowe sekwencje jednakowo skutecznie z pre-tRNA eukariotycznych jak i bakteryjnych. Dodatkowe sekwencje 3' końcowe, z eukariotycznych pre-tRNA, usuwa nukleaza 3'—5'. Nukleaza ta działa jednak jedynie na takie pre-tRNA, z których już poprzednio zostały usunięte dodatkowe sekwencje 5' końcowe [92], co wyraźnie dowodzi określonej, a nie dowolnej kolejności zdarzeń związanych z dojrzewaniem tRNA. Badania te zostały obecnie potwierdzone na pre-tRNA *Drosophila* z uściśleniem, że nukleaza usuwająca dodatkowe sekwencje ze strony 3' pre-tRNA

jest endonukleazą tnącą dokładnie przy końcu 3' przyszłej cząsteczki tRNA [93].

Intronowe sekwencje w genach tRNA wykryto najpierw w genach tRNA^{I^{Tr}} i tRNA^{Phe} drożdży [94]. Gen tRNA^{I^{Tr}} koduje supresorowy tRNA, bez którego użyty w badaniach szczep drożdży nie może się normalnie rozwijać. Dowiodło to, że geny tRNA zawierające introny ulegają ekspresji oraz że ich transkrypty podlegają obróbce prowadzącej do normalnych dojrzałych cząsteczek tRNA. Ostatnio stwierdzono, że cały szereg genów tRNA zawiera sekwencje intronowe [95—97]. Długość intronów w eukariotycznych genach tRNA wynosi od 11 do 60 pz. Introny w obrębie rodzin tRNA mają podobną sekwencję, ale pomiędzy różnymi rodzinami tRNA brak jest homologii sekwencji intronowych. Niezmienną cechą sekwencji intronowych jest natomiast ich pozycja: we wszystkich dotychczas zbadanych przypadkach introny w pre-tRNA są wbudowane pomiędzy pierwszym a drugim nukleotydem po stronie 3' antykodonu dojrzałego tRNA*. Wszystkie introny zawierają ponadto sekwencje komplementarne do antykodonu i tworzą z nim helikalny odcinek w przestrzennej strukturze pre-tRNA. Znaczenie istnienia intronów w genach niektórych tRNA przez długi czas stanowiło zagadkę. Porównanie aktywności matrycowej genów zawierających introny, z aktywnością tych samych genów, ale z których intron usunięto, dowiodło, że sekwencje te nie odgrywają roli w procesie transkrypcji [98]. Częściowe wyjaśnienie funkcji intronów przyniosły dopiero ostatnie lata. Jedną z ich funkcji polega na zapewnieniu transkryptom struktury umożliwiającej prawidłową modyfikację określonych nukleozydów lub przeciwdziałanie modyfikacjom nieprawidłowym [99, 100].

Duże zainteresowanie wzbudzał mechanizm usuwania intronów z prekursorowych tRNA. Mechanizm ten został wyjaśniony w dużej mierze dzięki pracom Filipowicza, Konarskiej i Tycy [101—103]. W naszym artykule mechanizm wycinania intronów z pre-tRNA nie został omówiony. Zainteresowanych odsyłamy do artykułu W. Filipowicza pt. „Geny podzielone i składanie RNA”, który ukazał się w „Kosmosie” [104].

V. Uwagi końcowe

Przedstawiony przegląd informacji o genach tRNA wskazuje, że w tej dziedzinie w ciągu niewielu ostatnich lat dokonano bardzo znacznego postępu. Dotychczas poznane fakty pozwalają zarysować ogólny schemat organizacji i ekspresji genów tRNA, ale niezbędne są oczywiście dalsze

* Wyjątek stanowi pre-tRNA^{Gly} z chloroplastów tytoniu, którego intron znajduje się w ramieniu dwuhydrourydylowym [119].

badania dla wyjaśnienia wielu kwestii szczegółowych, a co ważniejsze — licznych zagadnień o znaczeniu podstawowym. Czego zatem nie wiemy?

- a) nie znamy sensu biologicznego takiej a nie innej organizacji genów tRNA,
- b) organizację genów tRNA u eukariontów znamy tylko pobieżnie,
- c) nie jest wyjaśniony mechanizm współdziałania i koordynacji aktywności genów jądrowych, kodujących białka niezbędne do obróbki i dojrzewania organellowych pre-tRNA, z organelowymi genami tRNA.

PIŚMIENNICTWO

1. Ofengand J., (1977) w *Molecular mechanisms of protein biosynthesis*, Weissbach H., Pestka S., str. 66—69, Academic Press, London.
2. Crick F. H. C., (1966), *J. Mol. Biol.* **19**, 548—555.
3. Kearns D. R., Shulman R. G., (1974) *Acc. Chem. Res.* **7**, 33—39.
4. Robertus J. D., Ladner J. E., Finch J. T., Rhodes D., Brown R. S., Clark B. F. C., Klug A., (1974a) *Nature* **250**, 546—551.
5. Kim S. H., Suddath F. L., Quigley G. J., McPherson A., Sussman J. L., Wang A. H. J., Seemaman N. C., Rich A., (1974b) *Science* **185**, 435—440.
6. Ozeki H., (1981) w *Genetics and evolution of RNA polymerase, tRNA and ribosome*, Osawa S., Ozeki H., Uchida H., Yura T. str. 173—183. Elsevier/North Holland, Biomedical Press.
7. Morgan S., Korner A., Low K. B., Söll D., (1977) *J. Mol. Biol.* **117**, 1013—1020.
8. Ikemura T., (1981) *J. Mol. Biol.* **146**, 1—21.
9. Ikemura T., (1981) *J. Mol. Biol.* **151**, 389—409.
10. Etcheverry T., Colby D., Guthrie C., (1979) *Cell* **18**, 11—26.
11. Hatfield D., Varricchio F., Rice M. B. G., Forget., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3183—3188.
12. Sprague K. U., Hagenbüchle, Zunige M. C., (1977) *Cell* **11**, 561—570.
13. Viotti A., Balducci C., Weil J. H., (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **517**, 125—131.
14. Kędzierski W., (1981) *Plant Science Letters* **21**, 15—21.
15. O'Clary D., Wahleiter J. A., Wolstenholme D., (1983) *Nucl. Acid Res.* **11**, 2411—2424.
16. Morimoto R., Rabinowitz M., (1979) *Mol. Gen. Genet.* **170**, 25—48.
17. Weil J. H., Mubumbila M., Kuntz M., Keller M., Steinmetz A., Bogorad L., Löffelhardt W., Mucke H., Bohnert H. J., (1983) *Molekularnaja Biologija* **17**, 1147—1153.
18. Daniel V., (1981) *Critical Rev. Biochem.* **9**, 253—291.
19. Nakajimo N., Ozeki H., Shimura Y., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11113—11120.
20. Wawrousek E. F., Hansen J. N., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 291—298.
21. Hudson L., Rossi J., Landay A., (1981) *Nature* **294**, 422—427.
22. Lee J. S., An G., Friesen J. D., Fill N. P., (1981) *Cell* **25**, 251—258.

23. Kaine B. P., Gupta R., Woese C. R., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3309—3312.
24. Chu N. M., Tewari K. K., (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186, 23—32.
25. Groot G. S. P., Harten-Loosbroek, (1981) *Curr. Genet.* 4, 187—190.
26. Bogorad L., (1981) *J. Cell. Biol.* 91, 256—270.
27. Palmer J. D., Thompson W. F., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5537—5544.
28. Kuntz M., Keller M., Crouse E. J., Burkard G., Weil J. H., (1982) *Curr. Genet.* 6, 63—69.
29. Koch W., Edwards K., Kössel H., (1981) *Cell* 25, 203—213.
30. Takaiwa F., Sugiura M., (1982) *Nucl. Acid. Res.* 10, 2665—2676.
31. Sugita M., Shinozaki K., Sugiura M., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3557—3561.
32. Denc H., Kato A., Shinozaki K., Sugiura M., (1982) *Nucl. Acid. Res.* 10, 7511—7520.
33. Köchel H. G., Lazarus C. M., Basak N., Küntzel H., (1981) *Cell* 23, 625—633.
34. Heckman J. E., Yin S., Alzner-DeWeerd B., RajBhandary U. L., (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12694—12700.
35. Borst P., Grivell L. A., (1978) *Cell* 15, 705—723.
36. Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., deBruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperson I. C., Nierlich D. C., Roe B. A., Sanger F., Shreier P. H., Smith A. J. H., Staden R., Young I. G., (1981) *Nature* 290, 457—464.
37. Bibb M. J., van Etten R. A., Wright C. T., Walberg M. W., Clayton D. A., (1981) *Cell* 26, 167—180.
38. Sekiya T., Kobayashi M., Seki T., Koike K. (1980), *Gene* 11, 53—62.
39. Ojala D., Merkel Ch., Gelfand R., Attardi G., (1980) *Cell* 22, 393—403.
40. Chang D. D., Clayton D. A., (1984) *Cell* 36, 635—643.
41. O'Clary D., Wolstenholme D. R., (1984) *Nucl. Acid Res.* 12, 2367—2379.
42. Hsu Chen Ch. Ch., Dubin D. T., (1984) *Bioch. Internat.* 8, 385—391.
43. Stern D. B., Lonsdale D. M., (1982) *Nature* 299, 698—702.
44. Feldmann H., (1976) *Nucl. Acid Res.* 3, 2379—2386.
45. Olson M. V., Hall B. D., Cameron J. R., Davis R. D., (1979) *J. Mol. Biol.* 127, 285—295.
46. Valenzuela P., Venegas A., Weinberg F., Bishop R., Rutter W. J., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 190—194.
47. Venegas A., Oiroga M., Zaldivar J., Rutter W. J., Valenzuela P., (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12306—12309.
48. Schmidt O., Mao J., Ogden R., Beckmann J., Sakano H., Abelsson J., Söll D., (1980) *Nature* 287, 750—752.
49. Kubli E., Schmidt T., (1978) *Nucl. Acid. Res.* 5, 1465—1478.
50. Gergen J. P., Loewenberg I. Y., Wensink P. C., (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 475—499.
51. Yen P. H., Davidson N., (1980) *Cell* 22, 137—148.
52. Clarkson S. G., Kurer V., (1976) *Cell* 8, 183—195.
53. Clarkson S. G., Kurer V., Smith H. O., (1978) *Cell* 14, 713—724.
54. Müller F., Clarkson S. G., (1980) *Cell* 19, 345—353.
55. Han J. H., Harding J. D., (1982) *Nucl. Acid Res.* 10, 4891—4900.
56. Buckland R. A., Cooke H. J., Roy K. L., Dahlberg J. E., Lund E., (1983) *Gene* 22, 211—217.

57. Han J. H., Rooney R. J., Harding J. D., (1984) *Gene* **28**, 249—255.
58. Santos T., Zasloff M., (1981) *Cell* **23**, 699—710.
59. Sekiya T., Kuchino Y., Nishimura S., (1981) *Nucl. Acid Res.* **9**, 2239—2250.
60. Sekiya T., Nishizawa R., Matsuda K., Taya Y., Nishimura S., (1982) *Nucl. Acid Res.* **10**, 6411—6419.
61. Bawnik N., Backmann J. S., Sarid S., Daniel V., (1983) *Nucl. Acid Res.* **11**, 1117—1123.
62. Waldorn C., Wills N., Gesteland R. F., (1985) *J. Mol. and Appl. Genet.* **3**, 7—17.
63. Hawley D. K., McClure W. R., (1983) *Nucl. Acid Res.* **11**, 2237—2254.
64. Duester G., Campen R. K., Holmes W. M., (1981) *Nucl. Acid Res.* **9**, 2121—2139.
65. Wawrousek E. F., Hansen J. N., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 291—298.
66. Duester G., Elford R. M., Holmes W. M., (1982) *Cell* **30**, 855—864.
67. Nierlich D. P., (1978) *Ann. Rev. Microbiol.* **32**, 343—347.
68. Gallant J. A., (1979) *Ann. Rev. Genet.* **13**, 393—415.
69. Lamond A. J., Travers A. A., (1985) *Cell* **40**, 319—326.
70. Küpper H., Sekiya T., Rosenberg M., Egan J., Landay A., (1978) *Nature* **272**, 423—426.
71. Nakajima N., Ozeki H., Shimura Y., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11113—11120.
72. Altman S., Bowman E. J., Carber R. L., Kole R., Koski R. A., Stark B. C., (1980), w Transfer RNA: Biological aspects, Söll D., Abelson J. N., Schimmel P. P., str. 71—82, CSH Lab.
73. Robertson H. D., Pelle E. G., McCain W. H., (1980) w Transfer RNA: Biological Aspects, Söll D., Abalson J. N., Schimmel P. P. CSH Lab.
74. Gegenheimer P., Apirion D., (1981) *Microbiol. Rev.* 503—539.
75. Gruissem W., Greenberg B. M., Zurawski G., Prescott D. M., Hallick R. B., (1983) *Cell* **35**, 815—828.
76. Hellmund D., Metzloff M., Serfing E., (1984) *Nucl. Acid Res.* **12**, 8253—8268.
77. Steinmetz A. A., Krebbers E. T., Schwarz Z., Gubbins E. J., Bogorad L., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 5503—5511.
78. Kuntz M., Weil J. H., Steinmetz A., (1984) *Nucl. Acid Res.* **12**, 5037—5047.
79. Keus R. J. A., Stam N. J., Zwiers T., de Heij H. T., Groot C. S. P., (1984) *Nucl. Acid Res.* **12**, 5639—5646.
80. Christianson T., Rabinowitz M., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14025—14033.
81. Palleschi C., Francisci S., Bianchi M. M., Frontalli L., (1984) *Nucl. Acid Res.* **12**, 7317—7326.
82. Thalenfeld B. E., Hill J., Tzagoff A., (1984) *J. Biol. Chem.* **258**, 610—615.
83. Roeder R. G., (1976) w RNA polymerase, Losick R., Chamberlin M. str. 285—329, CSH Lab.
84. Galli G., Hofstetter H., Birnstiel M. L., (1981) *Nature* **294**, 626—631.
85. Koski R. A., Clarkson S. G., (1980) *Cell* **22**, 415—425.

86. Dingermann T., Sharp S., Schaack J., Söll D., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 10395—10402.
87. Sharp S., Dingermann T., Schaack J., DeFranco D., Söll D., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 240—246.
88. Schaack J., Sharp S., Dingermann T., Söll D., (1983) *J. Biol. Chem.* **258** 15224—15231.
89. Johnson J. D., Raymond G. J., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 5990—5994.
90. Drabkin H., Rajbhandary U. L., (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5596—5602.
91. Cramer F., (1971) w *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Davidson J. N., Cohn W. E., tom 11, str. 391—417, Academic Press, London.
92. Graber R. L., Altmen S., (1979) *Cell* **17**, 389—397.
93. Friendewey D., Dingermann T., Cooley L., Söll D., (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 449—454.
94. Goodman H. M., Olson M. V., Hall B. D., (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5453—5457.
95. Robinson R. R., Davidson N., (1981) *Cell* **23**, 251—259.
96. Müller F., Clarkson S. G., (1980) *Cell* **19**, 345—353.
97. Selker E., Yanofsky C., (1980) *Nucl. Acid Res.* **8**, 1033—1042.
98. Wallace B. R., Johnson P. F., Tanaka S., Schold M., Itakura K., Abelson J., (1980) *Science* **209**, 1396—1400.
99. Nishikura K., de Robertis E. M., (1981) w *Developmental biology using purified genes*, Brown B. B., t. XXIII, str. 483—492.
100. Johnson T., Abelson J., (1983) *Nature* **302**, 681—687.
101. Filipowicz W., Konarska M., Gross H. J., Shatkin A. J., (1983) *Nucl. Acid Res.* **11**, 1405—1418.
102. Tyc K., Kikuchi Y., Konarska M., Filipowicz W., Gross H. J., (1983) *EMBO J.* **2**, 605—610.
103. Filipowicz W., Shatkin A. J., (1983) *Cell* **32**, 547—557.
104. Filipowicz W., (1985) *Kosmos*, **34**, 41—66.
105. Wenkstern T. W., (1985) *Molekularnaja Biologija* **19**, 36—54.
106. Peffley D. M., Sogin M. L., (1981) *Biochemistry* **20**, 4015—4021.
107. Page G. S., Hall B. D., (1981) *Nucl. Acid Res.* **9**, 921—934.
108. Bartnik E., de Robertis E. M., (1983) *J. Mol. Biol.* **108**, 439—444.
109. Holschuh H., Bottomley W., Whitfeld P. R., (1983) *Nucl. Acid Res.* **11**, 8547—8554.
110. Rasmussen O. F., Stummann B. M., Henningsen K. W., (1984) *Nucl. Acid Res.* **12** (23), 9113—9153.
111. Cheung A. Y. P., (1980) w *Transfer RNA: Biological Aspects* Söll D., Abelson J. N., Schimmel P. P., str. 563—564, CSH Lab.
112. Hollingsworth M. J., Hallick R. B., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12795—12799.
113. Grosskopf R. J., Feldmann M., (1981) *Curr. Genet.* **4**, 191—196.
114. Clarkson S. G., (1983) w *Eucaryotic genes: their structure, activity and regulation* MacLean N., Gregor S. P., Flavell R. A., str. 2—30, Butterworth Press, London.
115. Young L. S., Takahashi N., Sprague K. U., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 374—378.
116. Lamond A. J., Trowers A. A., (1983) *Nature* **305**, 248—250.

117. Lamond A. J., (1985) w *Trends in Biochemical Sciences* 10, 271—274.
118. Travers A. A., Lamond A. J., Mace H. A. F., Berman M. L., (1983) *Cell* 35, 265—273.
119. Deno H., Sugiura M., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 405—408.
120. Nomura M., Gourse R., Baughman G., (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 75—117.

SŁOWNICTWO

Przedstawianie danych termodynamicznych i pokrewnych w biologii, zalecenia, 1985.

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji Biotermodynamiki IUPAC-IUPABIUB: "Recommendations for the presentation of thermodynamic and related data in biology (1985)", opublikowanego w *Eur. J. Biochem.* 153, 429—434 (1985).

Tłumaczył W. Hendrich.

Fizyko-chemiczne dane mają duże znaczenie w opisie i rozwoju zrozumienia układów biologicznych. W literaturze biologicznej stosuje się obecnie różnorodną terminologię i symbole na określenie wielkości fizyko-chemicznych i ich jednostek miar. Ta sytuacja prowadzi do mieszania pojęć i wielu trudności przy porównywaniu i uzgadnianiu wyników pochodzących z różnych laboratoriów. Zalecenia dotyczące jednostek, symboli i terminologii były opracowane przez międzynarodowe zespoły standaryzujące celem ułatwienia porozumienia się i usunięcia dwuznaczności. Zalecenia te kładą szczególny nacisk na stosowanie nowoczesnego systemu metrycznego jednostek, zwanego Systeme International (SI) d'Unités (Międzynarodowy Układ Jednostek Miar) [1], który różni się w kilku ważnych aspektach od układów stosowanych poprzednio w nauce.

Nie można oczekiwać, że takie zalecenia zostaną natychmiast zaakceptowane i stosowane we wszystkich dziedzinach. Należy ufać, że obecny okres przejściowy będzie możliwie krótki i, że przyszłe pokolenia uczonych nie będą niepotrzebnie obciążane różnorodnością jednostek i symboli spotykanych w podręcznikach, pracach badawczych i zbiorach danych. Z tego powodu zachęcamy uczonych badających układy biologiczne do zaakceptowania i używania układu SI wszędzie, gdzie to stosowne.

W tym dokumencie zebrano jednostki układu SI oraz symbole szczególnie ważne w naukach biologicznych, jak również ich zastosowanie do konkretnych wielkości. Obszerniejszą dyskusję układu SI, wraz z zaleceniami stosowania symboli i terminologii w opisie wielkości ważnych w chemii fizycznej podano w wydanym przez IUPAC "Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units" (Symbole i terminologia wielkości i jednostek stosowanych w chemii fizycznej), [2] oraz [3]. Godne uwagi są również opracowania, przygotowane

przez CODATA [4] i IUPAC [5], w których omówiono przedstawienie numerycznych i termodynamicznych danych.

Jakkolwiek wierzymy, że unikanie różnic terminologii i symboli w chemii fizycznej i naukach biologicznych jest bardzo ważne, to jednak jesteśmy świadomi tego, że pewne zalecenia IUPAC mogą wymagać dalszego dopracowania lub rozwinięcia aby mogły zaspokoić praktyczne potrzeby nauk biologicznych. Niektóre zalecenia niniejszego dokumentu podano właśnie z tą intencją.

Wspólna Komisja Biotermodynamiki opublikowała poprzednio zalecenia dotyczące terminologii dwóch szczególnie ważnych dziedzin biotermodynamiki: "Recommendations for presentation of biochemical equilibrium data" (Zalecenia dotyczące przedstawienia danych równowagi biochemicznej) [6] oraz "Calorimetric measurements on cellular systems. Recommendation for measurements and presentation of results" (Kalorymetryczne pomiary układów komórkowych. Zalecenia dotyczące pomiarów i przedstawienia wyników) [7]. Celem ułatwienia ich praktycznego stosowania zalecenia te opracowano wyczerpująco. Z tego względu nie do uniknięcia jest pewne nałożenie obecnego i poprzednich dokumentów.

Wielkości fizyczne, jednostki układu SI i ich symbole

Wielkość fizyczna jest iloczynem wartości liczbowej (będącej liczbą) i jednostki miary. Na podstawie międzynarodowego porozumienia zespół siedmiu wymiarowo niezależnych jednostek tworzy tak zwany zespół jednostek podstawowych układu SI. Fizyczne wielkości podstawowe, ich jednostki miar i zalecane symbole podano w tabeli 1.

Tabela 1

Podstawowe wielkości i jednostki układu SI.

Podstawowe wielkości		Podstawowe jednostki	
Nazwa	Symbol	Nazwa	Symbol
długość	<i>l</i>	metr	m
masa	<i>m</i>	kilogram	kg
czas	<i>t</i>	sekunda	s
prąd elektryczny	<i>I</i>	amper	A
temperatura*	<i>T</i>	kelwin	K
ilość substancji	<i>n</i>	mol	mol
światłość (natężenie światła)	<i>I_v</i>	kandela	cd

* Termodynamiczna („absolutna”) temperatura. Na oznaczenie temperatury Celsjusza zaleca się symbole *t* lub *θ*. W przypadkach gdy potrzebne są równocześnie symbole czasu i temperatury Celsjusza należy symbol *t* stosować na oznaczenie czasu, *θ* na oznaczenie temperatury Celsjusza [2].

Tabela 2

Symbole i jednostki niektórych wielkości termodynamicznych

Wielkość		Jednostki układu SI	
Nazwa	symbol	Nazwa	symbol
objętość	V	metr sześcienny	m^3
siła	F	niuton	$N = m \text{ kg s}^{-2}$
gęstość	ρ	kilogram na metr sześcienny	kg m^{-3}
ciśnienie	p	paskal	$\text{Pa} = \text{N m}^{-2}$
lepkość	η	paskal sekunda	Pa s
energia	E	dżul	$J = \text{N m}$
ciepło	q, Q^*	dżul	$J = \text{N m}$
praca	w, W^*	dżul	$J = \text{N m}$
energia wewnętrzna	$U, (E)$	dżul	$J = \text{N m}$
entalpia: $U + pV$	H	dżul	$J = \text{N m}$
eutalpia swobodna: $H - TS$	G	dżul	$J = \text{N m}$
energia swobodna: $U - TS$	A	dżul	$J = \text{N m}$
entropia	S	dżul na kelwin	$J \text{ K}^{-1}$
moc	P	wat	$W = J \text{ s}^{-1}$
pojemność cieplna			
pod stałym ciśnieniem $(\delta H/\delta T)_p$	C_p	dżul na kelwin	$J \text{ K}^{-1}$
w stałej objętości $(\delta U/\delta T)_v$	C_v	dżul na kelwin	$J \text{ K}^{-1}$
współczynnik rozszerzalności			
objętościowej: $V^{-1}(\delta V/\delta T)_p$	α	na kelwin	K^{-1}
współczynnik ściśliwości izoter-			
micznej: $P V^{-1}(\delta V/\delta p)_T$	κ	na paskal	Pa^{-1}
ciśnienie osmotyczne	Π	paskal	Pa
potencjał chemiczny substancji	$B \mu_B$	dżul na mol	$J \text{ mol}^{-1}$
absolutna aktywność substancji	$B \lambda_B$	bezwymiarowa	
względna aktywność substancji	$B a_B$	bezwymiarowa	
współczynnik aktywności,			
w skali ułamka molowego	f_B	bezwymiarowa	
w skali molalności	γ_B	bezwymiarowa	
w skali stężenia	γ_B	bezwymiarowa	
współczynnik osmotyczny	φ	bezwymiarowa	

* Według zaleceń $q > 0$ i $w > 0$ oznacza zwiększenie energii rozpatrywanego układu [2]. Wtedy $\Delta U = q + w$.

Tabela 3

Przedrostki zalecane w układzie SI

Mnożnik	przedrostek	symbol	mnożnik	przedrostek	symbol
10^{-1}	decy	d	10	deka	da
10^{-2}	centy	c	10^2	hecto	h
10^{-3}	mili	m	10^3	kilo	k
10^{-6}	mikro	u	10^6	mega	M
10^{-9}	nano	n	10^9	giga	G
10^{-12}	piko	p	10^{12}	tera	T
10^{-15}	femto	f	10^{15}	peta	P
10^{-18}	atto	a	10^{18}	eksa	E

Symbole wielkości fizycznych powinny być drukowane kursywą alfabetu łacińskiego lub greckiego, w maszynopisach podkreślone ołówkiem linią falistą, natomiast symbole jednostek miar powinny być drukowane antykwą (czcionką normalną).

Przyjmuje się, że wszystkie pozostałe wielkości fizyczne i jednostki są pochodnymi wielkości i jednostek podstawowych. Pewnym pochodnym jednostkom nadano specjalne nazwy i symbole. W tabeli 2 podano symbole i jednostki miar niektórych wielkości (funkcji) termodynamicznych. W publikacjach [2, 3] znajdują się obszerniejsze zestawienia wielkości i jednostek miar, zalecanych do stosowania w chemii i fizyce.

Często stosowanie jednostek podstawowych układu SI jest w praktyce uciążliwe, dlatego wygodne jest używanie przedrostków określających wielokrotność lub podwielokrotność. Zalecane przedrostki zebrano w tabeli 3.

Komentarze dotyczące wyboru jednostek w biotermodynamice

Masa: wielkości „właściwe” i „molowe”

Podstawową jednostką masy w układzie SI jest kilogram, jednak nazwy i symbole jej wielokrotności i podwielokrotności są wielokrotnościami i podwielokrotnościami grama. *Przykład:* μg a nie nkg dla 10^{-9} kg.

Określenie „właściwy”, poprzedzające nazwę wielkości ekstensywnej oznacza „dzielony przez masę”; wielkość właściwa powinna być oznaczona małą literą („Ekstensywna” wielkość fizyczna układu zależy od ilości zawartej w nim substancji). *Przykład:* c_p jest właściwą pojemnością cieplną pod stałym ciśnieniem. Odpowiednią jednostką jest $\text{J K}^{-1} \text{g}^{-1}$. (Określenie „ciepło właściwe” nie jest stosownym określeniem właściwej pojemności cieplnej).

Określenie „molowy” poprzedzające nazwę wielkości ekstensywnej oznacza „dzielony przez ilość substancji”, w wyniku czego otrzymuje się wielkość na mol. Wielkość powinna być oznaczona dużą literą ze wskaźnikiem we frakcji dolnej, napisanym małą literą. *Przykład:* $C_{p,m}$ jest molową pojemnością cieplną ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$), pod stałym ciśnieniem. Wskaźnik m można pominąć, jeśli nie grozi to dwuznacznością.

Jeśli to możliwe, wielkości termodynamiczne powinny być podawane jako wielkości molowe. Dla makrocząsteczek biochemicznych powinny być podawane zawsze masy cząsteczkowe (w daltonach, symbol Da, jednostka nie należąca do układu SI) lub liczbowo identyczne masy molowe (g mol^{-1}), stosowane w obliczeniach (porównaj [8]). W przypadku substancji, których ilość oznaczano wagowo, należy podawać zawartość wody i innych znanych lub oszacowanych zanieczyszczeń, oraz stosować odpowiednie poprawki. W przypadku nieznanej masy cząsteczkowej ilość związku powinna być podana, jeśli to możliwe, w jednostkach masy układu SI.

Objętość

Jednostką objętości w układzie SI jest metr sześcienny (m^3). W biotermodynamice wygodniejszymi jednostkami są zwykle jego podwielokrotności: decymetr sześcienny (dm^3), centymetr sześcienny (cm^3) i milimetr sześcienny (mm^3). Nie należy używać symbolu „cc” (do określenia cm^3).

Decymetr sześcienny jest identyczny z litrem (1 lub L). Tę nie należącą do układu SI jednostkę i jej podwielokrotności, mililitr ($1\ ml \equiv 1\ cm^3$), mikrolitr ($1\ \mu l \equiv 1\ mm^3$) i nanolitr ($1\ nl \equiv 10^{-18}\ m^3$) uważa się często w biologii za wygodniejsze i łatwiej zrozumiałe od jednostek układu SI. Z tego względu można oczekiwać, że jednostki objętości, pochodne litra, będą stosowane równoległe z jednostkami układu SI (jednak, porównaj komentarze pod hasłem „ciśnienie”).

Czas

Podstawową jednostką czasu w układzie SI jest sekunda (s). Inne jednostki czasu, dokładnie określone poprzez odniesienie do sekundy są to: minuta (min, nie mn), godzina (h nie hr) i dzień (d). Nie zachęcamy jednak do stosowania min, h lub d przy podawaniu wartości właściwości, obejmujących parametr czasu. Należy zdawać sobie sprawę z tego, że sekunda, jej wielokrotności i podwielokrotności są podstawowymi jednostkami miary czasu w większości urządzeń elektronicznych, stosowanych do oznaczania zależnych od czasu wielkości fizycznych. Ponadto, moc w watach otrzymuje się bezpośrednio przez dzielenie energii w dżulach przez czas w sekundach.

Temperatura

Termodynamiczne temperatury i różnice temperatur wyraża się podstawową jednostką układu SI, kelwinem, symbol K (nie stopnie Kelvina lub $^{\circ}K$). Temperaturę i różnice temperatur można wyrażać również stopniami Celsjusza, symbol $^{\circ}C$. Stopień Celsjusza był dawniej nazywany „centy-stopniem” (centi-grade). Dla wielu biologów stosowanie skali Celsjusza jest wygodniejsze, na przykład do wyrażania temperatur doświadczeń. Jednak zaleca się podawanie temperatury w kelwinach zawsze, gdy jej wartości są używane w związku z obliczeniami termodynamicznymi.

Ciśnienie

Jednostką ciśnienia w układzie SI jest paskal, to jest jeden niuton na jeden metr kwadratowy ($Pa = N\ m^{-2}$). Wygodną jednostką w wielu pomiarach ciśnienia jest kilopaskal (symbol kPa). Biolog-termodynamik powinien zauważyć, że pospolite wyrażenie termodynamiczne, pV jest wyrażeniem energii, w którym — gdy p jest w paskalach, a V w me-

trach sześciennych — iloczyn pV otrzymuje się bezpośrednio w dżulach. Wszystkie kombinacje zwyczajowych jednostek, nie należących do układu SI wymagają stosowania współczynników przeliczeniowych.

Powszechnie spotykane jednostki mm Hg lub Torr wprawdzie dokładnie określono poprzez odniesienie do Pa, lecz ich stosowania należy unikać (porównaj [2]).

Jedna atmosfera została określona jako 101 325 paskali ($1 \text{ atm} = 101\,325 \text{ kPa}$), jednak jej stosowania — jako jednostki nie należące do układu SI — należy również unikać. Ostatnio Komisja IUPAC Termodynamiki zaleciła przyjęcie 10^5 Pa (1 bar) jako ciśnienia standardowego w termodynamice chemicznej [9]. Należy jednak zauważyć, że w ciągu wielu lat zaakceptowanym ciśnieniem standardowym w obliczeniach stałych równowagi i standardowych funkcji termodynamicznych była 1 atmosfera.

Lepkość

Jednostką lepkości (η) w układzie SI jest paskal sekunda ($\text{Pa s} = \text{kg s}^{-1} \text{ m}^{-1}$). Tradycyjnie używanymi jednostkami nie należącymi do układu SI są puaz (P) lub centypuaz (cP), przy czym 1 Pa s jest równy 10 P.

Energia

Wyniki pomiarów energii, łącznie z pomiarami termicznymi, powinny być podawane w dżulach (J), kilodżulach (kJ) lub milidżulach (mJ). Używanie terminu „kaloria” nie jest właściwe (porównaj [7]). „Termochemiczna kaloria” (cal_{th}) określa się jako $1 \text{ cal}_{\text{th}} = 4.184 \text{ J}$.

Entropia

Zalecaną jednostką entropii w układzie SI jest dżul na kelwin (J K^{-1}). Nie należy stosować „jednostek entropii” (entropy units, e.u.).

Moc

Jednostką mocy w układzie SI jest wat (W). W biotermodynamice wygodniejszymi jednostkami są zwykle miliwat (mW), mikrowat (μW), pikowat (pW) i femtowat (fW). Niewłaściwe jest stosowanie rozpowszechnionych w biologii jednostek takich, jak „kalorie na godzinę” (porównaj [6]).

Gęstość

Jednostką gęstości (ρ) w układzie SI jest kg m^{-3} . Wygodniejszą jednostką jest zwykle g cm^{-3} .

Znakowanie zmiennych, stanów i przemian

Zmienne

Zmienne parametry funkcji termodynamicznych powinno się podawać w nawiasach za symbolem, np. $C_p(T,p)$. Podobnie, wartości liczbowe wielkości powinny się przedstawiać odpowiednim symbolem z wartościami parametrów dla ustalonych warunków pomiaru, podawanych w nawiasach.

Przykład: $C_p(298.2\text{ K}, 0.1\text{ MPa}, \text{pH} = 7.0)$ lub $C_p(25.0\text{ }^\circ\text{C}, 1\text{ bar}, \text{pH} = 7.0)$.

Stany

Wskaźniki we frakcji górnej przy symbolach właściwości (funkcji termodynamicznych) używa się często celem oznaczenia określonego stanu (Tab. 4). *Przykład:* $C_{p,B}^*$ jest (molową) pojemnością cieplną czystej substancji B pod stałym ciśnieniem.

Tabela 4

Niektóre zalecane wskaźniki frakcji górnej

wskaźnik	znaczenie
○ (lub ⊖)	standard
*	czysta substancja
∞	rozcieńczenie nieskończenie wielkie
id	idealny
∩	pozorny (porównaj tekst)
E	nadmiar
*	kompleks aktywny

Określenie „pozorny” (apparent) oznaczone wskaźnikiem we frakcji górnej stosuje się wtedy, gdy przemiana nie jest dokładnie znana lub gdy jej wartość niesie bliżej nieokreślone niedokładności. *Przykład:* ΔG° jest pozorną standardową zmianą entalpii swobodnej (Gibbs energy). Szczegółową dyskusję K' (pozorna stała równowagi) i ΔG° znajdzie Czytelnik w [6].

W innym znaczeniu słowo „pozorny” jest używane w kontekście cząstkowych wielkości molowych. W tym przypadku jako symbol pojęcia „pozorny” zaleca się stosowanie wskaźnika we frakcji dolnej Φ , jak w Y_Φ . Na oznaczenie tej cechy można też zastosować symbole Φ^X i Φ_x . *Przykład:* pozorna objętość molowa V_B substancji rozpuszczonej B jest zdefiniowana jako $V_{B,\Phi} = (V - n_A V_A^*)/n_B$ gdzie n_A i n_B oznaczają ilości rozpuszczalnika i substancji rozpuszczonej, V oznacza całkowitą objętość roztworu, a V_A^* — molową objętość czystego rozpuszczalnika A.

Celem zaznaczenia stanu agregacji zaleca się umieszczenie odpowiedniego symbolu w nawiasach za symbolem wielkości termodynamicznej. Komisja IUPAC Termodynamiki zaleciła ostatnio [9] symbole podane w (Tab. 5). *Przykład*: V_B^* (cr) jest (molową) objętością substancji B w czystym, krystalicznym stanie (porównaj Tab. 5).

Tabela 5

Symbole stanów agregacji

Stan	symbol
gaz	g
ciecz	l
ciało stałe	s
plyn	fl
ciekły kryształ	lc
ciało stałe krystaliczne	cr
ciało stałe bezpostaciowe	am
ciało szkliste	vit
roztwór	sln
roztwór wodny	aq

Nie ma potrzeby proponowania symboli na oznaczenie wszelkich stanów istotnych w układach biologicznych. W wielu przypadkach stosowanie określeń takich, jak na przykład „heliks” czy „kłębek” implikuje znajomość struktury tylko domniemanej. W innych przypadkach oznaczenia takie, jak „natywny” czy „zdenaturowany” mają ścisły związek z techniką przygotowania preparatu i ich znaczenie zmienia się od przypadku do przypadku. Z tego względu należy położyć nacisk na to, żeby używając takich terminów dokładnie je określać w kontekście ich stosowania, oraz żeby zapis ich symboliki był krytycznie dobrany. Każdy taki zapis powinno się stosować z rezerwą i — we wszystkich przypadkach — wyraźnie opisać w tekście stan, do którego odnosi się wartość lub funkcja.

Przemiany

Przemiana termodynamiczna jest oznaczana symbolem Δ , umieszczonym przed odpowiednią wielkością. Charakter przemiany oznacza się przypisem do Δ . Komisja IUPAC Termodynamiki zaleca obecnie [9] dwa sposoby stosowania przypisów:

1. stosowanie przepisowych symboli jako wskaźników we frakcji górnej lub dolnej; zaleca się formę zapisu $\Delta_\alpha^\beta: X$ na oznaczenie zmiany właściwości X w czasie przemiany $\alpha \rightarrow \beta$ gdzie α i β są symbolami stanów lub reagentów. *Przykład*: $\Delta_s^l H$ oznacza zmianę entalpii dla przejścia fazowego substancji ze stanu stałego w ciekły.

2. stosowanie specjalnych wskaźników we frakcji dolnej na oznaczenie przemiany: jako wskaźników we frakcji dolnej zaleca się stosowanie symboli podanych w tabeli 6. *Przykład:* $\Delta_c S_B$ oznacza entropię spalania substancji B. Obecnie symbol oznaczający przemianę zamieszcza się na ogół jako wskaźnik we frakcji dolnej przy symbolu właściwości, np. ΔS_c . Ten sposób zapisu będzie prawdopodobnie przeważał przez pewien czas w biotermodynamice.

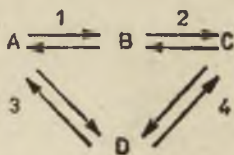
Tabela 6

Symbole przemian

przemiana	symbol (wskaźnik frakcji dolnej)
parowanie	vap
sublimacja	sub
topienie	fus
przejście jednej fazy stałej w inną	trs
mieszanie płynów	mix
rozpuszczanie	sol
reakcja (z wyjątkiem spalania)	r
spalanie	c
tworzenie (składnika z jego pierwiastków)	f

Symbole, zebrane w tabeli 6 są niewystarczające na oznaczenie wielu przemian ważnych w biologii. W takich przypadkach, jak na przykład jonizacja, protonowanie i utlenienie, przemianę powinno się dokładnie opisać w tekście i oznaczyć odpowiednim symbolem.

Należy pamiętać o tym, że w termodynamice biochemicznej przemiany nie zawsze są dokładnie określone. Z tego względu zaleca się stosowanie „neutralnych” symboli, jak a, b, lub 1, 2, ..., które — w miejsce bardziej specjalnych symboli — trzeba jednoznacznie objaśnić w tekście. Schematy złożonych reakcji powinno się zawsze przedstawiać w formie rycin. Zaleca się wtedy oznaczenie każdej składowej reakcji „neutralnym” symbolem. *Przykład:*



Roztwory

Słowo „roztwór” stosuje się w opisie ciekłej lub stałej fazy zawierającej więcej niż jeden składnik. Dla wygody jedną z tych substancji nazywa się „rozpuszczalnikiem” (zwykle substancja, występująca w naj-

większym stężeniu), a wszystkie pozostałe „substancjami rozpuszczonymi”. W roztworach, stosowanych w biologii i na ogół zawierających wiele składników rozróżnienie nie zawsze jest proste. Często mieszaninę o stałej zawartości składników nazywa się „rozpuszczalnikiem” (np. H_2O plus składniki buforu), wszystkie zaś pozostałe składniki „substancjami rozpuszczonymi”.

Tabela 7

Zalecane sposoby zapisu składu roztworu

Wielkość		Jednostka praktyczna
Nazwa	symbol	
ilość substancji B	n_B	mol
stężenie substancji rozpuszczonej B (ilość substancji B dzielona przez objętość roztworu)	$c_B, [B]$	mol dm ⁻³
stężenie masowe substancji B (masa B dzielona przez objętość roztworu)	ρ_B	g dm ⁻³
molalność substancji rozpuszczonej B (ilość substancji B dzielona przez masę głównego rozpuszczalnika)	m_B	mol kg ⁻¹
ułamek molowy substancji B ($n_B/\Sigma_i n_i$)	x_B	bezwymiarowa
ułamek masowy substancji B ($m_B/\Sigma_i m_i$)	w_B	bezwymiarowa
ułamek objętościowy substancji B ($V_B/\Sigma_i V_i$)	φ_B	bezwymiarowa

Zalecane sposoby zapisu składu roztworów zebrano w tabeli 7. Wskaźnik A (lub 1) we frakcji dolnej stosuje się niekiedy na oznaczenie rozpuszczalnika, a wskaźnik B (lub 2) na oznaczenie substancji rozpuszczonej, zawsze jednak należy opisać znaczenie stosowanych wskaźników.

Wygodną jednostką stężenia, czasem nazywaną „molalnością”, jest mol dm⁻³. Roztwór o stężeniu 0.1 mol dm⁻³ jest często nazywany roztworem 0.1-molarnym lub roztworem 0.1-M. Określenie molalność i symbol M można łatwo pomylić z molalnością (Tab. 7), dlatego zaleca się stosowanie określenia „stężenie” i symbolu „mol dm⁻³” (mol l⁻¹, mol L⁻¹).

W szczególnym przypadku roztworów wodnych, rozpuszczalnik można oznaczać jako „aq” nie należy zaś oznaczać jako „H₂O”. To ostatnie oznaczenie powinno się pozostawić na określenie jedynie czystej wody lub, ewentualnie gdy obecność substancji rozpuszczonych w wodzie nie jest istotna dla rozważanego problemu.

Autorzy powinni zdawać sobie sprawę, że końcowe stężenia niskocząsteczkowych składników — mogących dyfundować przez błony półprzepuszczalne, w roztworach biologicznych makrocząsteczek poddanych dializie wyrównawczej — mogą różnić się od końcowych stężeń

tych składników w roztworze dializującym. Potencjały chemiczne, μ , dyfundujących składników będą jednak identyczne po obu stronach błony. Z tego względu wyjściowy skład roztworu dializującego należy dokładnie określać (zob. [10, 11]).

Cząstkową wielkość molową substancji B określa się jako $Y_B = (\delta Y / \delta n_B)_{T,p,n,c}$, gdzie Y jest ekstensywną wielkością układu. *Przykład:* $V_B = (\delta V / \delta n_B)_{T,p,n,c}$ oznacza cząstkową objętość molową substancji B; $v_B = (\delta v / \delta m_B)_{T,p,m,c}$ oznacza cząstkową objętość właściwą substancji B.

Jeśli wielkość cząstkowa odnosi się do roztworu nieskończenie rozcieńczonego, powinna być oznaczona przez wskaźnik $^\infty$ we frakcji górnej (porównaj Tab. 4).

W miejsce zalecanego symbolu Y_B często stosuje się symbol \bar{Y}_B . Kreska ponad Y nie rozwiązuje dwuznaczności: w rzeczywistości symbol ten może wprowadzić Czytelnika w błąd, gdyż kreska jest często używana do oznaczania wartości średniej (porównaj [3]).

Warunki, do których odnosi się pozorna wartość molowa Y_ϕ powinno się wyraźnie podawać w tekście lub oznaczać symbolem. *Przykład:* $V_{B,\phi}(aq, c = 0.1 \text{ mol dm}^{-3})$ oznacza pozorną objętość molową substancji B w roztworze wodnym o stężeniu substancji B równym 0.1 mol dm^{-3} .

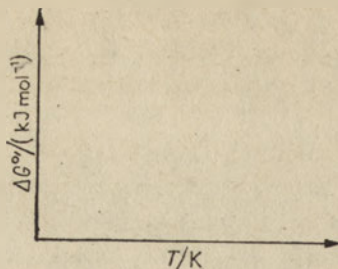
Przedstawianie wyników

Zawsze, gdy podaje się liczbowe wartości danych wielkości — w tekście, tabeli, wykresie czy na przezroczu — należy podawać również jednostki miary. Dodatkowo należy podawać informacje, dotyczące istotnych parametrów doświadczenia (temperatura, stężenie, pH, skład rozpuszczalnika etc). W pewnych przypadkach niewygodne jest włączanie odpowiednich parametrów doświadczenia do samej tabeli lub rysunku, czy nawet do towarzyszącego im opisu. W tych przypadkach niezbędne dodatkowe wyjaśnienia należy podać w tekście.

Przy podawaniu wyników pomiarów termodynamicznych w tabeli najbardziej wygodne jest na ogół zestawienie ich w postaci samych liczb, i zamieszczenie jednostki miary w opisie tabeli lub, najlepiej, w nagłówkach kolumn. W tym przypadku poprawnym sposobem zapisu jest podanie symbolu wielkości, podzielonego przez symbol jednostki miary.

Przykład: $\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$ lub $\frac{\Delta H}{\text{kJ mol}^{-1}}$ oznacza, że podane w tabeli liczby są zmianami entalpii wyrażonymi w jednostkach kilodżuli na mol.

Osie wykresów i nagłówki w tabelach należy oznaczać zarówno nazwą (lub symbolem) wielkości jak i zastosowaną jednostką, tak aby otrzymać iloraz, bezwymiarową liczbę, wpisywaną w kolumnę tabeli lub nanoszoną na wykres jako odpowiadający jej punkt. Taki przykład podano na rycinie 1.



Ryc. 1 Zmiana pozornej standardowej entalpii swobodnej, wyrażonej w kilodżulach na mol, jako funkcja temperatury, wyrażonej w kelwinach.

Uwagi tłumacza:

1. Stosując możliwie konsekwentnie zasadę ujednoczenia nomenklatury, szczególnie symboli, pozostawiono skróty przy symbolach w wersji angielskiej. Dotyczy to oznaczania kalorii termochemicznej (cal_{th}), oraz wszystkich skrótów przy symbolach stanów agregacji (Tab. 5) i symbolach przemian (Tab. 6).

2. Termin „pozorny” nie uwzględnia znaczenia, bardzo rozpowszechnionego w biochemii w odniesieniu do ΔG° (porównaj rozdział „Znakowanie zmiennych, stanów i przemian”, akapit drugi). W dostępnych tłumaczowi źródłach (Tinoco J., Sauer K., Wang J. C., *Physical Chemistry, principles and applications in biological sciences*, Prentice Hall Inc, New Jersey, 1978, str. 115; Marshall A. G., *Biophysical chemistry. Principles, techniques and applications*. J. Wiley and Sons, New York 1978, str. 91) ΔG° , określono według konwencji biochemicznej jako wartość odnoszącą się do pH 7,0, czyli nie do „przemian niedokładnie znanych, czy zawierających bliżej nieokreślone niedokładności”.

PIŚMIENICTWO

1. International Organization for the Standardization (1973) *SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units*, American National Standards Institute, New York.

Więcej szczegółów znajdzie czytelnik także w: International Standard ISO-31/O-1974 i ISO-31/I-XII (1965—1975), w których omówiono wielkości, jednostki, symbole, współczynniki przeliczeniowe i tabele przeliczeniowe dla różnych gałęzi nauki i technologii.

2. IUPAC's Physical Chemistry Division, Commission on Physicochemical Symbols, *Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units*, 1979 edition, *Pure Appl. Chem.*, **51**,1. a także do otrzymania z Pergamon Press, Oxford.
3. McGlashan, M. L. (1971) *Physicochemical quantities and units. The grammar and spelling of physical chemistry*, drugie wydanie, The Royal Institute of Chemistry, London.

4. CODATA (1973) Guide for the presentation in the primary literature of numerical data derived from experiments, *Codata Bull.*, no 9.
5. IUPAC's Physical Chemistry Division (1972) A guide to procedures for the presentation of thermodynamic data. *J. Chem. Thermodyn.*, **4**, 551 (1972) i *Pure Appl. Chem.* **29**, 395 (1972).
6. IUPAC-IUPAB-IUB Interunion Commission on Biothermodynamics: Recommendations for presentation of biochemical equilibrium data. *J. Biol. Chem.* **251**, 6879 (1976), *Post. Biochem.* **30**, 487 (1984).
7. IUPAC-IUPAB-IUB-Interunion Commission on Biothermodynamics: Calorimetric measurements on cellular systems. Recommendations for measurements and presentation of results. *Codata Bull.* no 44 (1981) i *Pure Appl. Chem.* **54**, 671 (1982).
8. Nomenclature Committee of IUB and IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (1981) Newsletter 1981, *Eur. J. Biochem.* **114**, 1 (1981).
9. IUPAC Physical Chemistry Division, Commission on Thermodynamics (1982). Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units. Appendix IV: Notation for states and processes significance of the word standard in chemical thermodynamics, and remarks on commonly tabulated forms of thermodynamic functions, *Pure Appl. Chem.* **54**, 1239.
10. Casassa E. F., Eisenberg H., (1964). Thermodynamic analysis of multicomponent solutions, *Adv. Prot. Chem.*, **19**, 287.
11. Eisenberg H. (1976) *Biological macromolecules and polyelectrolytes in solution*, Clarendon Press, Oxford.

KOMUNIKAT

Polskie Towarzystwo Biochemiczne utworzyło **Sekcję Biotechnologii**, powołaną na mocy decyzji Zarządu Głównego w dn. 17 listopada 1987 r. Głównym zadaniem nowej Sekcji będzie organizowanie narad specjalistycznych, kolokwiów, konferencji, a zwłaszcza „warsztatów” (workshops), umożliwiających nawiązywanie kontaktów pomiędzy biochemikami i innymi zajmującymi się biotechnologią, ale pracującymi w różnych instytucjach, resortach, programach. Działalność Sekcji powinna wypełnić istotną lukę w systemie badań podstawowych i stosowanych w tej nowej i ważnej dyscyplinie biologii.

Celem wsparcia tej inicjatywy, kwartalnik *Postępy Biochemii* otwiera nowy dział pt. **Nowe w Biotechnologii**. Zamieszczane w nim będą krótkie, ale zwięzłe i kompletne noty na temat najbardziej aktualnych osiągnięć w zakresie biotechnologii.

Redakcja

Z ŻYCIA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

CHRONICLE OF THE POLISH BIOCHEMICAL SOCIETY

W dniach od 17 do 19 września 1986 roku został zorganizowany w Katowicach XXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Podczas Zjazdu w dniu 18 września odbyło się XII Walne Zebranie członków Towarzystwa, na którym sprawozdanie z działalności w okresie XI kadencji złożył prezes prof. dr Kazimierz Zakrzewski. Walne Zebranie wybrało nowe władze Towarzystwa.

Sprawozdanie ustępującego Zarządu oraz skład nowych Władz P. T. Bioch. w załączeniu.

Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w XI kadencji 1983—1986 przedstawione na XII Walnym Zebraniu członków w dniu 18 września 1986 r.

W XI kadencji Polskie Towarzystwo Biochemiczne liczyło około 1300 członków, 1286 na koniec roku 1985, zgrupowanych w 12 oddziałach. Rocznie przyjmowano około 100 nowych członków i w przybliżeniu taka sama liczba członków ubywała, z powodu śmierci, wyjazdów, przenosin i in. Sprawy finansowe Towarzystwa układały się zadawalająco. Dotacja ze strony Polskiej Akademii Nauk wpływała regularnie i wynosiła w r. 1983 472 tys. zł, w r. 1984 401 tys. zł, w r. 1985 567 tys. zł. i na rok 1986 542 tys. zł. Składki w dalszym ciągu nie wpływają prawidłowo, gdyż około 30—40% członków zalega z wpłatami, z rozmaitych przyczyn, wśród których istotną rolę odgrywają wyjazdy na staże zagraniczne. Zarząd Główny Towarzystwa w latach 1984/85 przeprowadził akcję ściągania zaległości składkowych, która przebiegała w Oddziałach sprawnie i zredukowała zaległości za lata 1978—1984 do około 15—20%, zapewne nieściągalnych; zaległości te skumulowane są w dwóch większych Oddziałach Towarzystwa. Dla usprawnienia kontaktów z członkami i zmniejszenia coraz dotkliwiej odczuwanych kosztów wysyłki czasopism i innych materiałów utworzono „grupy abonenckie” w wielu placówkach. Grupy te powinny z czasem przekształcić się w koła Towarzystwa.

Zarząd Główny Towarzystwa urzędował stale, dyżurując w lokalu Towarzystwa w Warszawie przy ul. Freta raz na tydzień, we wtorki. Prezydium, utworzone przez grupę warszawskich (stale dyżurujących) członków, poszerzoną o członków Zarządu z Łodzi i z Lublina, urzędowało 1 do 2 razy w kwartale. Plenarne zebrania Zarządu Głównego odbywały się raz na kwartał i z reguły były rozszerzone przez zaproszenie przewodniczących Oddziałów, redaktorów wydawnictw i inne osoby, jak np. organizatorzy dorocznego Zjazdu. Takie rozszerzenie zebrania zarządu było szczególnie cenne przy podejmowaniu uchwał dotyczących spraw ogólniejszych, m.in. nadających interpretację mniej jasnych punktów statutu. M.in. postanowiono, że zaległości składkowe członka pozbawia go wielu korzyści typu materialnego, np. ulgowe wpisowe na zjazdy, rabat w prenumeracie czasopism i in., ale nie członkostwa Towarzystwa.

Warunki lokalowe pracy Zarządu były bardzo złe, gdyż nie udało się dojść do porozumienia z administratorem budynku przy ul. Freta 16, Polskim Towarzystwem Chemicznym, co do zaadaptowania strychu w tym budynku dla potrzeb

Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Ten obszerny lokal w dalszym ciągu nie jest wykorzystywany ani przez PTBioch ani przez administrację budynku. Pogorszyły się też o tyle warunki pracy Zarządu, że administracja budynku uniemożliwiła naszemu Towarzystwu dostęp do telefonu w godzinach wieczornych, tj. w czasie dyżurów.

Wewnętrzna struktura organizacyjna Towarzystwa w XI kadencji rozbudowała się przez powstanie dwóch nowych sekcji: glikokoniuugatów i historycznej. Bez zakłóceń i bardzo wydajnie przebiega praca Komisji Nomenklaturowej, której głównym osiągnięciem w minionej kadencji było przygotowanie do druku Słownika Zalecanych i Zwyczajowych Nazw Enzymów, pierwszego tego rodzaju wydawnictwa w Polsce, opublikowanego w Postęпах Biochemii i rozpowszechnionego w postaci nadbłki. Rozpoczęto również, jak dotąd nieregularnie i w skromnej jeszcze postaci rozprowadzanie biuletynu Towarzystwa pod nazwą „List do członków PTBioch.”; wydawany jest on w Oddziale Towarzystwa w Szczecinie. Zebrania w oddziałach, podobnie jak w kilku latach ubiegłych, nie są ani liczne, ani bardzo dynamiczne. Średnio w 1 oddziale w ciągu roku odbywało się 6—7 zebrań, w znacznej części przy okazji odczytu gościa, zwłaszcza zagranicznego.

Regularnie przyznawano nagrody im. J. K. Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną i im. B. Skarżyńskiego za najlepszą pracę przeglądową opublikowaną w kwartalniku Postępy Biochemii. W roku 1985 przywrócono nagrodę im. Wł. Mozołowskiego dla młodych biochemików, którzy na dorocznym Zjeździe Towarzystwa najlepiej prezentowali swoje prace.

W minionej kadencji odbywały się zyskujące coraz większe znaczenie różne zebrania międzyoddziałowe i ogólnopolskie. Najważniejszym z nich jest doroczny ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, o liczności sięgającej 500 uczestników. Jego znaczenie polega m.in. na tym, że biorą w nim coraz liczniejszy udział osoby nie będące członkami naszego Towarzystwa; staje się więc nasz doroczny Zjazd coraz szerszym forum dyskusji naukowej. Od dwóch lat, w programie Zjazdu znajduje się sekcja wzgl. sympozjum na temat biotechnologii; stale też utrzymywana jest sekcja poświęcona biochemii klinicznej ogólnej lub monotematyczna. Regularną imprezą naukową stały się organizowane przez Oddział w Szczecinie sympozja na temat biochemii i toksykologii fluoru, z udziałem zagranicznych uczestników. Dwukrotnie zorganizowano międzyoddziałowe sympozja naukowe związane z uroczystościami ku czci wybitnych polskich biochemików. Zakończono rozpoczętą w ubiegłej kadencji serię „minisympozjów” na tematy biotechnologii i zaawansowanych problemów biochemii klinicznej. Te minisympozja miały charakter warsztatowy, tj. grupowały wyłącznie osoby zajmujące się aktywnie rozwijaniem danej problematyki i tylko zaproszonych przez organizatorów. Były to bardzo użyteczne spotkania, ale wobec wielkiego rozdrobnienia kadry specjalistów zajmujących się pojedynczym problemem, w trwających nieco ponad rok cyklu 5 spotkań wyczerpano możliwości ich kontynuowania. W przyszłości należy organizować sympozja specjalistyczne typu raczej szkoleniowego niż warsztatowego. Z inicjatywy Oddziału w Gdańsku rozpoczęto systematyczne spotkania biochemików uczących biochemii na akademiach medycznych. Spotkania takie odbyły się w Gdańsku w roku 1984, w Warszawie w r. 1985 i w Białymstoku w r. 1986; były one uznane jako cenne okazje wymiany poglądów i postanowiono je kontynuować w tym samym zarysie organizacyjnym, tj. by na każdym spotkaniu referowane były osiągnięcia i problemy dwóch ośrodków akademickich. Związane z tymi spotkaniami były również narady, prowadzone głównie na plenarnych zebraniach Zarządu Głównego, na temat doszkalania nauczycieli szkół średnich w zakresie biochemii i biologii molekularnej. Stan wiedzy i sposób przekazywania jej uczniom szkół średnich jest niezadawalający, ale nawiązanie roboczych kontaktów ze środowiskiem nauczycieli, a zwłaszcza z instytucjami progra-

mowymi i doszkalającymi okazało się nieomal niemożliwe. Również bez większych efektów było włączenie przedstawicieli Polskiego Towarzystwa Biochemicznego do Komisji Programowych w resorsie oświaty i wychowania: udział w tych komisjach okazał się raczej tytularnym niż roboczym.

Współpraca z FEBS rozwijała się na ogół zadowalająco, aczkolwiek udział przedstawicieli naszego Towarzystwa w komisjach FEBS nie został przywrócony do stanu z przed roku 1982. Około 10 osób corocznie korzystało ze stypendiów FEBS dla przeprowadzenia określonych badań lub zapoznania się z nowymi technikami badawczymi. Dzięki pomocy FEBS przywrócona została bezpłatna prenumerata Biochemical Education i w chwili obecnej w każdym ośrodku akademickim (Oddziale Towarzystwa) jest przynajmniej jeden członek PTBioch, otrzymujący do swej dyspozycji i udostępniający innym członkom jeden egzemplarz Biochemical Education.

Działalność wydawnicza Towarzystwa była ożywiona, ale zlecenia wydawnicze wykonywane są bardzo opieszale przez redakcję techniczną i drukarnie. Teczka redakcyjna kwartalnika Postępy Biochemii jest obecnie stale pełna, ale zaległości w druku i rozpowszechnianiu są znaczne. Jeszcze nie został rozpowszechniony nr 3/4 rocznika 1985, w drukarni, po składzie, ale przed złamaniem, znajduje się cały rocznik 1986, a do druku oddano już maszynopisy pierwszego zeszytu rocznika 1987. W sytuacji takiej, jaka jest w całej Polsce w odniesieniu do dostępności czasopism naukowych w ogóle, a biochemicznych w szczególności, opóźnianie druku jest równoznaczne z odcieciem nieomal wszystkich zawodowo pracujących biochemików od informacji o postępie tej dyscypliny na świecie. W minionej kadencji ukazały się, po długim procesie wydawniczym, dawno oczekiwane Monografie Biochemiczne: Nowe Słownictwo Biochemiczne; Elementy Enzymologii, oraz Immunologia Transplantacyjna. Pomimo istnienia dużego zapotrzebowania i starań ze strony Zarządu Głównego, nie udało się doprowadzić do wydania wzgl. do druku II wydania Elementów Enzymologii, dzieła bardzo poszukiwanego jako materiał seminaryjny i podręcznik dla bardziej zaawansowanych studentów i młodej kadry naukowej.

Miniona, XI kadencja władz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przebiegała wśród trudności, które — wbrew oczekiwaniom — nie były mniejsze niż w X kadencji. Stan zaopatrzenia bibliotek w czasopisma nie poprawił się istotnie, co przyczynia się do bardziej apatycznej postawy członków Towarzystwa w stosunku do takich naturalnych czynności, jak udział w zebrańiach i wspólnych akcjach na rzecz rozwoju własnej dyscypliny naukowej. Techniczne i materialne utrudnienia w pracy naukowej pogłębiają te nastroje. Niejednokrotnie występują lokalne kłopoty, które można by łagodzić, gdyby więz wewnątrz- i międzyzakładowa była silniejsza. Aktywizacja biuletynu Towarzystwa, usprawnienia administracyjne funkcjonowania biura Zarządu Głównego, a przede wszystkim zinstytucjonalizowanie narad typu zebrań plenarnych powinny w przyszłości przyczynić się do rewitalizacji naszego Towarzystwa.

Prezes

prof. dr Kazimierz Zakrzewski

Nowe Władze Towarzystwa

Zarząd Główny wybrany w dniu 18.IX.1986 r. przez Walne Zgromadzenie członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ukonstytuował się na posiedzeniu odbytym w dniu 27.XI.1986 r. w sposób następujący:

PREZES	doc. dr hab. Zofia Porembska
WICEPREZES	prof. dr hab. Tadeusz Wilusz
SEKRETARZ	doc. dr hab. Krzysztof Zwierz
SKARBNIK	dr Bogdan Sieliwanowicz

CZŁONKOWIE ZARZĄDU

prof. dr hab. Antoni Dancewicz	doc. dr hab. Lech Terliński
doc. dr hab. Marian Drózdź	prof. dr hab. Zofia Walter
prof. dr hab. Maria Gumińska	dr Teresa Wesolowska
doc. dr hab. Andrzej Guranowski	doc. dr hab. Maria Wojtas-Wasilewska
doc. dr hab. Janusz Greger	doc. dr hab. Marian Wolny
doc. dr hab. Henryk Kostyra	prof. dr hab. Kazimierz Zakrzewski

KOMISJA REWIZYJNA

doc. Wirginia Janiszowska
dr Lidia Paśś
dr Bogna Skoczylas

Nagrody P. T. Bioch. przyznane w 1986 roku

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zawiadamia, że w roku 1986 przyznano nagrody za wyróżniające się osiągnięcia w dziedzinie Biochemii.

NAGRODA im. WŁODZIMIERZA MOZOŁOWSKIEGO — dla młodych biochemików — za prezentację prac na XXII Zjeździe PTBioch. w Katowicach — wrzesień 1986:

- Krzysztof Szczygłowski, praca pt.: „Klonowanie i identyfikacja sekwencji DNA z łubinu złotego, swoistych dla symbiozy” — Katedra Biochemii Akademii Rolniczej w Poznaniu
- Jan Wiśniewski, praca pt.: „Wstępna charakterystyka wielogenowej rodziny głównych genów szoku cieplnego” (hsp 7) u szczura” — Zakład Biologii Nowotworów Instytutu Onkologii w Gliwicach
- Maria Gaczyńska, praca pt.: „Jak interpretować silnie unieruchomiony sygnał maleimidowego znacznika spinowego związanego z błonami erytrocytów” — Katedra Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego
- Piotr Marszałek, praca pt.: „Dielektroforeza i elektroforeza komórek *Neurospora Crassa*. Model uzyskiwania nowych odmian genetycznych i perspektywy zastosowań biotechnologicznych” — Instytut Elektroniki w Warszawie
- Marek Mirowski, praca pt.: „Nowy tkankowy inhibitor fibrynolizy. Niskocząsteczkowy inhibitor plazminy z nabłonka Guerin” — Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi.

NAGRODA im. BOLESŁAWA SKARZYŃSKIEGO — za najlepszy artykuł ogłoszony w 31 roczniku *Postępów Biochemii*:

- Jan Potempa, Adam Dubin, praca pt.: „Ewolucja struktury i funkcji serynowych enzymów proteolitycznych”. *Postępy Biochemii* **31**, 1985, 531—554 — Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

NAGRODA im. JAKUBA KAROLA PARNASA — za najlepszą pracę doświadczalną w dziedzinie biochemii wykonaną w Polsce w 1985 roku:

— Andrzej Jerzmanowski, Marek Maleszewski, praca pt.: „Phosphorylation and methylation of Physarum histone H1 during mitotic cycle” ogłoszony w *Eur. Biochemistry* 24, (1985), 2360—2367 — Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Prezes

Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Doc. dr hab. Zofia Poremska

Regulamin

NAGRODY im. WŁODZIMIERZA MOZOŁOWSKIEGO dla młodych biochemików

§ 2

Intencją nagrody jest wyróżnienie młodych biochemików za szczególnie dobre i interesujące przedstawienie wartościowych prac biochemicznych na dorocznym zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

§ 2

W konkursie mogą brać udział autorzy, którzy w roku kalendarzowym odbycia Zjazdu nie ukończą trzydziestego roku życia. Kandydować do nagrody mogą zarówno członkowie jak nieczłonkowie Towarzystwa, autorzy doniesień wygłaszanych oraz autorzy prac przedstawianych w formie plakatów, jednak tylko ci, którzy je osobiście prezentują. Współautorstwo starszych autorów, a w tym także samodzielnych pracowników nauki nie pozbawia prawa ubiegania się o Nagrodę.

§ 3

Kandydatów do Nagrody może zgłaszać każdy członek Towarzystwa lub uczestnik Zjazdu (włącznie z samym kandydatem), nie później jednak niż przed rozpoczęciem obrad Zjazdu w dniu przedstawienia danej pracy. Pracę należy zgłaszać do odpowiedniego wyznaczonego stanowiska w Biurze Zjazdu. Organizatorzy Zjazdu zapewnią wyraźne oznaczenie prac ubiegających się o Nagrodę — na plakatach względnie na programie dziennym u wejścia na salę obrad w przypadku prac wygłaszanych z mównicy.

§ 4

Zgłoszone do Nagrody prace ocenia Komisja powołana do spraw Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego w danym roku. Przewodniczącego Komisji powołuje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na wniosek organizatorów Zjazdu. Pozostałych członków Komisji, w liczbie nie mniej niż czterech osób powołuje Komitet Organizacyjny Zjazdu. Przewodniczący Komisji ma prawo dokooptować do Komisji dodatkowych członków, jeżeli w trakcie Zjazdu uzna to za konieczne. Komisja sama ustala tryb kwalifikowania prezentacji prac, w ramach zasad ujętych w niniejszym Regulaminie. Zaleca się, aby (w miarę możliwości) wszyscy członkowie Komisji zapoznali się ze wszystkimi zgłoszonymi do Nagrody pracami i aby byli obecni przy ich prezentacji.

§ 5

Przy ocenie kandydatur, Komisja uwzględni sposób przedstawienia pracy, logiczność i przejrzystość treści, dokumentację wyników, umiejętność dyskusowania oraz

wartość merytoryczną. W ocenie obowiązuje skala punktowa od 1 do 10, przy czym punkty 1 i 2 określają prezentacje słabe, punkty 3 do 5 — zadowalające, punkty 6 do 8 — dobre, a punkty 9 i 10 — bardzo dobre.

§ 6

Ostateczną ocenę wyraża się sumą punktów przyznanych przez Komisję. Członek Komisji może wykluczyć się z udziału w punktacji w przypadku kandydatów pochodzących z zespołu, z którym jest związany, lub jeśli nie zapoznał się z ocenianą pracą. W takich przypadkach sumę punktów przyznanych przez pozostałych członków Komisji mnoży się przez odpowiedni współczynnik.

§ 7

Komisja obraduje niejawnie, a protokoły obrad i inne materiały ulegają zniszczeniu przez Komisję po zakończeniu pracy.

§ 8

Przewodniczący Komisji przekazuje Zarządowi Głównemu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ostateczny wynik w postaci listy kandydatów ułożonej w kolejności otrzymanych punktów i uwidaczniającej sumy punktów przyznane przez Komisję poszczególnym kandydatom. Zarząd Główny na tej podstawie podejmuje decyzję odnośnie liczby nagród i ich wysokości, oraz podejmuje uchwałę odnośnie przyznania nagród.

§ 9

Osoby wyróżnione Nagrodą im. Włodzimierza Mozołowskiego otrzymują, oprócz nagrody pieniężnej, stosowne dyplomy, a lista wyróżnionych podawana jest do wiadomości ogólnej przez ogłoszenie jej w kwartalniku Postępy Biochemii.

§ 10

Niniejsza wersja Regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dn. 13 marca 1986 roku i wchodzi w życie na XXII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Katowicach w roku 1986.

SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z kursu FEBS dla zaawansowanych n.t.

Oddziaływanie DNA z ligandami drobnocząsteczkowymi oraz białkowymi.

Fontevraud, Francja, 31 lipca — 11 września 1986 r.

Report on the FEBS Advanced Course „DNA — Ligand Interactions: From Drugs to Proteins”.

Fontevraud, France, 31 August—11 September, 1986

Zorganizowane w średniowiecznym opactwie w Fontevraud dwutygodniowe spotkanie zgromadziło 115 uczestników z 21 krajów w tym 4 osoby z Polski. Dyrektorem kursu był dr Wilhelm Guschlbauer (Gif-sur-Yvette, Centre Saclay). Program obejmował około 20 ponad godzinnych wykładów taką samą liczbę półgodzinnych referatów, trzy sesje plakatowe, na których przedstawiono około 50 komunikatów oraz trzy dyskusje okrągłego stołu. Znakomitym pomysłem organizatorów było urządzenie czytelnego zaopatrzonej w odbitki prac związanych z tematyką poszczególnych wykładów.

W podsumowaniu W. Saenger (Berlin Zach.) wypunktował trzy problemy wokół których ogniskowała się tematyka kursu: struktura DNA, oddziaływanie drobnocząsteczkowych ligandów z DNA i interakcje białko-DNA.

Dzięki postępowi technik — krystalizacja oligonukleotydów, badania rentgenograficzne kryształów przy osiągniętej rozdzielczości 0,9 Å, można odejść od uśrednionej struktury włókna DNA i ustalić położenie każdego atomu. Wprowadzeniem w krystalografię nukleotydów był wykład Olgi Kennard z Anglii (Cambridge). Część jego poświęcona była strukturze krystalicznej dwuniciowego dodekanukleotydu, w którym obok 10 klasycznych par zasad występują pary G · A i A · G. Geometria tych par jak i par G · T i A · C może zawierać klucz do zrozumienia mechanizmów korekty błędów w procesie replikacji. Zdaniem prelegentki otrzymywane kryształy zawierające w swej strukturze wiele cząsteczek wody stanowią źródło informacji o konformacji DNA w komórce. Ale zauroczeni swoimi strukturami krystalografowie przyznają, że ograniczeniem jest statyczny obraz DNA wylaniający się z badań. Poza tym w większości otrzymanych kryształów oligonukleotydy charakteryzują się strukturą A, podczas gdy DNA w komórce występuje przede wszystkim w konformacji B. R. E. Dickerson (Los Angeles), zapytany w jaki sposób otrzymał swój kryształ dodekanukleotydu o strukturze B, odpowiedział z nierzadkim zresztą w tym gronie poczuciem humoru, że po prostu przypadkiem. Część jego wykładu poświęcona była ogólnej charakterystyce struktur A, B i Z DNA i informacji jaką dla białek i drobnocząsteczkowych ligandów stanowią grupy funkcyjne zasad zorientowane do dużej i małej bruzdy heliksu. Natomiast występowanie naprzemienne puryn i pirymidyn nie jest warunkiem koniecznym pojawienia się struktury Z, bowiem strukturą tą charakteryzuje się otrzymany w pracowni A. Richa krystaliczny „miniheliks” heksameru d(CGATCG) (R. V. Gessner, Cambridge, USA).

Wiązanie wody i jonów metali, głównie Mn^{2+} i Mg^{2+} przez DNA omówił D. R. Kearns (San Diego). W szerokim zakresie stężeń soli ponad 80% reszt fosforanowych jest zobojętnionych przez jony Mn^{2+} rozłożone w kilku warstwach a objętość heliksu wraz ze związanymi przeciwjonami wynosi $1.2 \text{ dm}^3/\text{mol}$ par zasad. O różnych strukturach DNA i ich znaczeniu biologicznym mówił R. D. Wells (Birmingham, USA) wiele uwagi poświęcając Z-DNA i połączeniom między strukturą Z i B. Region o zaburzonej konformacji jest niewielki i nie przekracza, zdaniem wykładowcy, 1–2 niesparowanych zasad. Można strukturze Z przypisać wiele funkcji biologicznych, uzyskuje się dane przemawiające za jej istnieniem w komórce, za możliwą jej rolę w procesie transkrypcji czy w utrzymywaniu DNA w strukturach bardziej złożonych ale uzyskanie przekonywującego dowodu na ich biologiczne znaczenie jest równie trudne jak wykazanie, że tRNA ma istotnie w komórce przypisywaną mu strukturę. Bardzo przejrzysty i oparty w dużej mierze o własne doświadczenia był wykład M. Lenga (Orlean) poświęcony technikom otrzymywania przeciwciał przeciw DNA oraz ich zastosowaniu do wykrywania adduktów i szczególnych struktur (Z-DNA) tak *in vitro* jak i *in situ*.

Problematykę farmakologii molekularnej zainicjował R. E. Dickerson omawiając wiązanie szeregu ligandów nieinterkalacyjnych z DNA: netropsyny i dystamycyny, zawierających układ benzimidazolowy barwnika Hoechst 33285 i antybiotyku CC-1065. Częsteczki tych związków, w swych najbardziej prawdopodobnych konformacjach wygięte w sierp, pasują do mniejszej bruzdy DNA. W takim sposobie wiązania wykładowca widzi wyraz ewolucji. Podczas gdy duże białka regulatorowe (np. represory, białka aktywujące) odczytują informację zawartą w większej bruzdzie, antybiotyki, które pomagają mikroorganizmowi we współzawodnictwie z konkurentami, wyewoluowały by wiązać się w mniej bogatej w informację bruzdzie heliksu. Omijają zatem konieczność kompetycji z regulatorowymi białkami swej ofiary. Preferencja do par A · T tych ligandów wynika z zawady sterycznej jaką stanowi grupa aminowa guaniny i z mniejszej szerokości bruzdy w obszarze sekwencji A · T niż G · C. Jej szerokość, 3.5 \AA w tym obszarze, jest idealna by pomieścić płaskie układy aromatyczne ligandów. Dickerson przedstawił model kompleksu netropsyny z dodekanukleotydem oparty o analizę rentgenograficzną kryształu. Z badań tych wynika, że jakkolwiek geometria dodekanukleotydu jest niewiele zmieniona w miejscu wiązania ligandu to poza tym obszarem następuje usztywnienie struktury oligonukleotydu. Znaczną część swego, jak zwykle, błyskotliwie poprowadzonego wykładu M. J. Waring (Cambridge, Anglia) poświęcił dynamicznym aspektom oddziaływań ligandów. Względna wrażliwość poszczególnych sekwencji na działanie DNazy I zależy od czasu inkubacji DNA z aktynomycyną D lub nogalamycyną. Odpowiada to przemieszczaniu cząsteczek antybiotyków wzdłuż heliksu w poszukiwaniu miejsc o wyższym powinowactwie.

C. Hélène (Paryż) przedstawił badania nad oligonukleotydami kowalencyjnie połączonymi z wielopierścieniowym układem aromatycznym. Fragment oligonukleotydowy wnosi specyficzność wiązania. Wielopierścieniowy układ aromatyczny np. pierścień akrydynowy utrwała to wiązanie poprzez interkalację. Tak skonstruowane ligandy, komplementarne do promotorów czy sekwencji regulacyjnych, mogą blokować specyficznie transkrypcję. W materiale bakteryjnym znaleziono ostatnio naturalne odpowiedniki takich układów — są nimi „micRNA” (por. D. Hulanicka, 1985, Post. Bioch. 31, 585).

Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego do badań nieinterkalujących ligandów przedstawił W. Leupin (Zurich) a mechanizmowi oddziaływań bleomycyny z DNA poświęcony był referat R. M. Burgera (Bronx).

Większość wykładów dotyczących DNA-białko poświęcona była białkom bakteryjnym. W tematykę tę wprowadził Peter von Hippel (Eugene), który podniósł ro-

łę niespecyficzných oddziaływań DNA-białka w odnajdywaniu miejsc receptorowych w DNA. Spośród dwóch możliwych mechanizmów — wędrówki niespecyficznie związanego np. represora wzdłuż heliksu w poszukiwaniu operatora i przenoszenia cząsteczki białka między liniowo oddalonymi, lecz przestrzennie blisko położonymi fragmentami DNA („interdomain transfer”) wykładowca wyróżnił ten drugi mechanizm. W nukleoidzie bakteryjnym bowiem jedynie 10—15% DNA występuje w stanie wolnym. Cząsteczka represora przesuwająca się wzdłuż heliksu w poszukiwaniu operatora potykałaby się nieustannie o inne cząsteczki białkowe mniej lub bardziej specyficznie oddziaływujące z DNA. Proces rozpoznawania byłby zatem niezwykle powolny.

T. Steitz (New Haven) omawiał strukturę kryształów tworzonych przez CAP („catabolite gene activator protein”) ze składającym się z 22 par zasad oligonukleotydem. O badaniach struktury aktywnych obszarów enzymów polimeryzujących deoksynukleotydy mówił M. Modak (Newark). M. Schnarr (Strasburg) i F. Buck (Frankfurt) przedstawili badania oddziaływań z DNA białka Iex A. Różni się ono od innych represorów *E. coli* dużą liczbą kontrolowanych (15—20) genów odpowiedzialnych głównie za system reperacyjny. Przejście aporepresora **trp** w formę aktywną następuje w wyniku związania dwóch cząsteczek tryptofanu z białkiem o strukturze dimeru. W pracowni P. B. Siglera (Chicago) przy użyciu metody rentgenograficznej określono strukturę zarówno aporepresora jak i represora. Poprzez porównanie obydwu struktur uzyskano informację jak cząsteczki tryptofanu indukują allosteryczne przejście białka w formę tworzącą z DNA specyficzny kompleks. Mechanizmy prowadzące do reperacji pomyłek w procesie replikacji omówił M. Radman (Paryż) wskazując na znaczenie sekwencji otaczających dla naprawy błędów. Najłatwiej naprawie podlegają pary G · T, których występowanie jest najbardziej prawdopodobne w wyniku deaminacji reszt 5-metylocytozyny, najtrudniej zasady niesparowane. Badania struktury i funkcji metylaz prokariotycznych przedstawili B. Lauster (Berlin Zach.) i G. Pósfai (Szeged). W Szegedzie skonstruowano wektory zawierające połączone fragmenty genów różnych metylaz i badano aktywność takich enzymów — „chimer”.

Wprowadzeniem w problematykę nukleaz restrykcyjnych był wykład S. E. Halforda (Bristol, W. Brytania), a jego rozwinięciem była prezentacja struktury krystalicznej kompleksu restryktazy EcoRI i dodekanukleotydu zawierającego miejsce cięcia restryktazy (John M. Rosenberg, San Francisco). G. Maas (Hannover) omówił specyficzność restryktaz — wymiana 1 pary zasad w kanonicznej strukturze — GAATTC — prowadzi do zmniejszenia aktywności 10^2 — 10^5 razy. Drugą część wykładu prelegent poświęcił oddziaływaniom z DNA białek utrzymujących jednoniciową strukturę podczas replikacji. Rozwinięciem tego tematu był wykład F. Grossegue (Getynga), w którym dokonano porównania współdziałania elementów procesu replikacyjnego u bakterii z układem eukariotycznym. Badania w pracowni autora wykazały m.in., że α polimeraza DNA z grascicy cięcej ma także aktywność „prymazy”. Udało się jednak rozdzielić te dwie aktywności. Wyodrębniona prymaza zawiera dwie podjednostki polimerazy α . Wśród białek wiążących jednoniciowy DNA znaleziono dehydrogenazę mleczanową. Nie wiadomo czy ta ostatnia obserwacja ma znaczenie biologiczne.

Sesje plakatowe, odbywały się wieczorem w dawnym klasztorным refektarzu będącym również salą restauracyjną. Nieraz dyskusje przeciągały się do późnej nocy.

Ufundowane w XI wieku królewskie opactwo w Fontevraud było po opactwie w Cluny największym zespołem klasztorным średniowiecza. Mury kościoła kryją grobowce królów Anglii z dynastii Plantagenetów, Henryka II, Ryszarda Lwie Serce. Przekształcone w dobie napoleońskiej w więzienie opactwo było, jednym z najcięższych więzień w Europie, do połowy lat sześćdziesiątych. Restaurowane

i modernizowane budynki odkrywają wiele ze swego dawnego blasku zachowanego czasem przez grę przypadku, a czasem dzięki bezinteresownemu umiłowaniu piękna. To ponoć anonimowy dziewiętnastowieczny więzień uchronił kapitale kolumn bazyliki przed barbarzyństwem strażników i współników niedoli maskując je gipsem. Urok miejsca i jego odosobnienie sumujące się ze słoneczną pogodą sprzyjały życzliwej atmosferze. Ożywiało ją andegaweńskie wino i niewinne przygody jak takie, które wynikały z kruchości krzesełek na sali obrad. Pierwsze załamało się pod P. B. Siglerem (Chicago). Jeśli jednak ożywienie groziło bałaganem — na widownię wkraczał dyrektor kursu i dmac w myśliwski róg przywracał porządek. Bo koniecznie trzeba powiedzieć, że Wilhelm Guschlbauer był duszą wszystkiego co się tam działo. Do programu należały wycieczki, które wiodły między bajeczne zamki doliny Loary i należał też wieczór pieśni prowansalskich, hiszpańskich i aramejskich.

A na pożegnalnym obiedzie podano kaczkę w pomarańczach (ale to mi pewno PT Redakcja skreśli).

Marek Gniazdowski

Sprawozdanie ze szkoły letniej na temat Indukcja struktury DNA.

Berlin Zach. 18—23.VIII.1986

Report on the Berlin Summerschool "Induction of DNA structure" — West Berlin, 18—23 August, 1986

Szkoła odbyła się w tygodniu poprzedzającym XVII Zjazd FEBS. Organizatorami z ramienia zachodniobierlińskiego senatora nauki i badań byli prof. Wolfram Saenger i dr Burghardt Wittig. Miejscem obrad był dom gościnny ewangelickiego ośrodka szpitalno-rehabilitacyjnego Johannesstift położonego na skraju Berlina w dzielnicy Spandau. W szkole brało udział około 70 uczestników z osiemnastu krajów, w tym niżej podpisany z Polski. Na program zajęć złożyło się 16 wykładów, kilkanaście piętnastominutowych referatów i dwie sesje plakatowe, na których przedstawiono 26 komunikatów.

Problematykę szkoły można podzielić na następujące przeplatające się wzajemnie wątki tematyczne: struktura przestrzenna DNA, zmiany jej pod wpływem drobnocząsteczkowych ligandów, oddziaływania enzymów i białek regulatorowych z DNA, struktura chromatyny.

Otworzył konferencję S. Arnott (W. Brytania) wykładem o polimorfizmie kwasów nukleinowych. Między dwoma niciami podwójnego heliksu mogą występować znaczne różnice struktury: Wykładowca przywołał przykład poli dA³. poli dT, w którym łańcuch poliadenylowy charakteryzuje się strukturą A natomiast łańcuch komplementarny ma strukturę B. Nie wpływa to zasadniczo na konformację reszt deoksyrybozy, natomiast różnice obserwuje się w przyleganiu sąsiadujących w łańcuchu zasad. Arnott przestrzegał przed nadawaniem zbyt ogólnego znaczenia różnicom w skręceniu w stosunku do siebie sąsiadujących par zasad obserwowanym w kryształach oligonukleotydów, różnicom przypisywanym występowaniu obok siebie określonych zasad.

Szereg innych wykładów poświęcono strukturom przestrzennym DNA niezależnym od takich czynników jak białka czy drobnocząsteczkowe ligandy. Jeżeli w jednej nici heliksu występują obok siebie puryny, zwłaszcza adenina, to ze względu na większą powierzchnię pierścieni wzajemne ich przyleganie ("stacking") jest większe niż między tyminami. W miejscu tym następuje niewielkie odchylenie

osi DNA od linii prostej. Jeśli następuje nagromadzenie takich sekwencji w jednej nici w odstępach co około 10 par zasad, to kumulacja tych odchyżeń daje zakrzywienie osi heliksu. Jak podkreślił współtwórca tej koncepcji E. N. Trifonov (Izrael) krzywiżna osi DNA ("curved DNA") jest w tym wypadku niezależna od jakichkolwiek zewnętrznych czynników, np. ligandów białkowych. Wykładowca przedstawił opracowany wspólnie z V. Brendelem słownik sekwencji DNA o ustalonym znaczeniu biologicznym ("Gnomic — A dictionary of genetic codes", Balaban Publ., Rehovot, Filadelfia, 1986). Jedną z cech „zakrzywionego” DNA jest jego anormalna ruchliwość elektroforetyczna. Wykład D. M. Crothersa (USA) był poświęcony wykorzystaniu tej metody do badania fragmentów DNA izolowanego z kinetoplastów *Leishmania tarentolae*. Fragmenty te zawierały sekwencje oligoadenylowe (Ca₅₋₆T) występujące w okresie co 10 nukleotydów. Niewielkie zakrzywienia osi sumują się w zagęcie linii heliksu ujawniające się podczas elektroforezy. Autor wykazał badając syntetyczne polinukleotydy różniące się periodycznością występowania sekwencji oligoadenylowych, że to zagęcie jest wykrywalne istotnie wtedy, gdy sekwencje powtarzają się w sposób odpowiadający skokowi heliksu (por. Koo, Wu i Crothers, *Nature* (1986), 320, 501—506). D. Lilley (W. Brytania) omówił mechanizmy przechodzenia w formy krzyżowe ("cruciforms") powtarzających się odwróconych sekwencji ("inverted repeats") w superhelikalnym kuliście zamkniętym DNA plazmidowym. Mechanizm typu C polega na stopieniu DNA na dużym odcinku i następnie utworzeniu dwuniciowej struktury krzyżowej. Charakteryzuje się on wysoką entalpią aktywacji. Drugi natomiast, „typu S”, polega na stopniowym narastaniu struktury a jej powstawanie wymaga obecności soli. O mechanizmie przekształcania się tych sekwencji w formę krzyżową decydują sekwencje otaczające.

Lewoskrętna struktura DNA znalazła reprezentatywnych wykładowców w osobach T. Jovina (RFN) i A. Richa (USA). Badania w tej dziedzinie koncentrują z jednej strony nadal na określaniu cech strukturalnych polinukleotydów i warunków sprzyjających powstawaniu struktury Z oraz naturze heliksu na złączach między strukturami Z i B. Z drugiej natomiast badania te zmierzają do określenia sensu biologicznego lewoskrętnego DNA. Narzędziem mogą być przeciwciała przeciw Z-DNA. Badając wiązanie przeciwciał z chromatyną izolowaną z różnych stadiów embrjonalnych *Drosophila* stwierdzono charakterystyczne zmiany w reaktywności chromatyny. Pozostaje kwestią otwartą o ile same przeciwciała mogą indukować strukturę Z (Jovin). Innym podejściem doświadczalnym jest izolowanie białek specyficznie wiążących się z Z-DNA. Białko wykazujące 10⁵ razy większe powinowactwo do Z-DNA niż do B-DNA wyizolowano z zarodków pszenicy (Rich). Tworzenie struktury DNA może mieć znaczenie regulacyjne również poprzez zmniejszenie ilości wtórnych splotów w kuliście zamkniętym DNA (A. Nordheim, RFN). W badaniu tych struktur oprócz metod fizykochemicznych znajdują zastosowanie związki reagujące z DNA (dietylopirowęglan, czterotlenek osmu, dimetylosiarczan czy aldehyd chlorooctowy). Również w szeregu krótkich doniesień (m.in. M. J. Ellison, USA, E. Palecka, Czechosłowacja i Bernadette Hervé, Francja) przedstawiono badania struktury Z.

Oddziaływaniu ligandów z DNA poświęcony był wykład M. Waringa (W. Brytania). Oddziaływania dwóch antybiotyków, echinomycyny i dystamycyny z DNA badane były metodą "footprinting" z zastosowaniem DNazy I degradującej nie osłonięte przez ligandy sekwencje DNA. Pierwszy z nich, zbudowany z dwóch pierścieni chinoksalinowych połączonych cyklicznym peptydem, tworzy z DNA kompleks, w którym obydwa pierścienie ulegają interkalacji. Dystamycyna natomiast lokuje się w mniejszej bruzdzie DNA. Bardzo interesujące było stwierdzenie, że oprócz miejsc wiązania antybiotyków, a zatem nie ulegających enzymatycznej hydrolizie pojawiają się w heliksie DNA miejsca o zwiększonej wraz-

liwości na nukleazę. Uzupełnieniem wykładu Waringa było przedstawienie przez Richa struktury kryształu kompleksu innego antybiotyku chinoksalinowego, triostyny A z oktanukleotydem. Istotnym spostrzeżeniem było wykazanie, że zasady graniczące od zewnątrz z pierścieniami chinoksalinowymi tworzą pary zasad typu Hoogsteena a nie typu Watsona-Cricka. Odległość między deoksyrybozylowymi atomami węgla w parze Hoogsteena jest mniejsza o 2 Å i mniejszą powierzchnię zajmują same zasady. Zaobserwowana zmiana geometrii zasad jest więc wyrazem dostosowania struktury miejsca wiązania do rozmiarów interkalatora. Spośród doniesień plakatowych należy wymienić komunikat C. Zimmera (NRD) o zmianach specyficzności oddziaływań z DNA w wyniku zamiany w dystamycynie i związkach pokrewnych pierścieni pirolowych na imidazolowe a także doniesienie Ann Bogh (Berlin Zach.) o kompetycji między tyrocydyną i gramicydyną. Pierwszy z nich wiążąc się z DNA hamuje transkrypcję, drugi odwraca ten efekt.

Wśród wykładów traktujących o oddziaływaniach białek z DNA należałoby wymienić wystąpienie J. Rosenberga (USA). Autor przedstawił strukturę krystalicznego kompleksu dodekanukleotydu z nukleazą restrykcyjną EcoAI. Pozostawiając specjalistom analizę detali należy stwierdzić, że opracowany na podstawie tych badań model do wszystkich przemówił swym pięknem i precyzją. Dwa wykłady poświęcone były mechanizmom regulacyjnym procesu transkrypcji. G. Brahms (Francja) badał syntezę RNA w układzie *in vitro* używając jako matrycy warianty cyklicznej formy DNA plazmidu pBR 322 o różnej liczbie zwojów superhelikalnych. Zmiana liczby zwojów wpływała na wydajność transkrypcji z poszczególnych promotorów, a także mogła indukować przedwczesną terminację RNA. A. Klug (W. Brytania) omówił strukturę kompleksu białka regulującego transkrypcję 5s rRNA przez polimerazę III (TFIIIA) z matrycą. Białko będące cynkoproteidem o periodycznej strukturze pierwszorzędowej i jonach metalu wbudowanych między resztami cysteiny i histydyny oddziałuje z nie kodującą nicią DNA. Badania regulacji transkrypcji genów 5s rRNA przedstawił w krótkim doniesieniu T. Pieler (Berlin Zach.). Kilka wykładów oraz szereg komunikatów poświęcone było strukturze i funkcji chromatyny. H. Eisenberg (Izrael) podsumował ogólne cechy strukturalne chromatyny. E. Moudrianakis (USA) przedstawił badania kryształów oktameru histonu tworzącego nukleosom. Gospodarz spotkania B. Wittig zajął się aktywną transkrypcyjnie formą nukleosomów i udziałem białka HMG17 w aktywowaniu transkrypcji. Rolę białek HMG1 i HMG2 w utrzymaniu rozciągniętej struktury chromatyny w procesie transkrypcji przedstawił G. Dixon (Kanada). O identyfikacji topoizomerazy II w białkach szkieletowych chromatyny i jej znaczeniu jako białka chromatyny mówił W. Earnshaw (USA). Różnym aspektom struktury chromatyny poświęcone było kilkanaście innych komunikatów i doniesień plakatowych. Sporo informacji wnosili w dyskusji obszerne wystąpienia Kluga.

Atmosferze skupienia i dyskusjom przysłużyło się dobrze oddalenie miejsca obrad od ruchliwego centrum miasta. Organizatorzy zapowiedzieli, że na dystrakcje będzie czas w okresie zjazdu FEBS. Odosobnienie nie było jednak tak zupełne a braku dystrakcji nie należy rozumieć zbyt dosłownie. Jedno popołudnie poświęcono na trzygodzinny objazd miasta a wieczór na wycieczkę statkiem połączoną z bankietem, na którym nie zabrakło senatora, inicjatora tego spotkania. Bankiet i pożegnalna kolacja zapewne nie zaszkodziły nieformalnym kontaktom między uczestnikami. Atmosfera spotkania wiele zawdzięczała poczuciu humoru prof. Saengera, zawsze życzliwie uśmiechniętemu, nawet gdy zabieganemu drowi Wittigowi, dzielnie radzącej sobie z biurem szkoły pani Verenie Müller i wielu innym, których nazwisk nie zdołałem zidentyfikować.

Marek Gniazdowski

Sprawozdanie z VIII Międzynarodowego Sympozjum na temat „Biochemiczne aspekty funkcjonowania nerek”. Jugosławia, Dubrownik. 5—8 października, 1986

Report on the 8th International Symposium on „Biochemical Aspects of Kidney Function” — Yugoslavia, Dubrovnik, 5—8 October, 1986.

W dniach od 5—8 października 1986 roku odbyło się w Dubrowniku VIII Międzynarodowe Sympozjum, poświęcone biochemicznemu aspektowi funkcjonowania nerek. Organizatorami Sympozjum byli: Z. Kovačević i I. Samaržija (Jugosławia) oraz W. G. Guder i K. J. Ullrich (RFN). Wzięło w nim udział blisko 60 naukowców z Europy (Polskę reprezentowały dwie osoby: prof. S. Angielski z Akademii Medycznej w Gdańsku oraz niżej podpisany), Stanów Zjednoczonych, Kanady i Japonii.

Uczestnicy Sympozjum zapoznali się z 57 pracami przedstawionymi w ośmiu grupach tematycznych:

1. Funkcje błon rąbka szczoteczkowego;
2. Układy transportujące metabolity i ATPazy związane z transportem;
3. Kultury tkankowe i izolowane kanaliki nerkowe;
4. Potencjał błonowy a procesy transportu;
5. Regulacja równowagi kwasowo-zasadowej;
6. Leki a metabolizm;
7. Metabolizm nerki w warunkach normy i patologii;
8. Różnice w metabolizmie nerek zależne od gatunku i stadium rozwoju.

Wiele uwagi poświęcono molekularnym podstawom funkcjonowania układów transportujących metabolity w różnych fragmentach nefronu. H. Koepsell (RFN) zasugerował istnienie w korze nerki trzech różnych polipeptydów wiążących glukozę, będących prawdopodobnie składnikami zależnego od jonów sodu układu transportującego glukozę. Natomiast H. Ebel (RFN) wykazał, że uwarunkowany obecnością jonów Na^+ transport glukozy jest wrażliwy na zmiany płynności błon pęcherzyków rąbka szczoteczkowego. Przedstawiono również wyniki badań związanych z transportem karnozyny (S. Silbernagl, RFN), długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (M. A. Trimble, USA) oraz anionów organicznych (K. J. Ullrich, RFN). Ciekawą pracę dotyczącą rekonstrukcji zależnego od jonów sodu układu transportującego neutralne aminokwasy referował J. D. McGivan (Wielka Brytania). Aż 5 wystąpień poświęconych było ATPazom związanym z procesami transportu. Szeroko omówiono także niektóre zagadnienia dotyczące potencjału błonowego komórek nerki.

Duże zainteresowanie wzbudziła praca prezentowana przez S. Stephenson (Wielka Brytania), zawierająca wyniki badań nad hydrolizą neuropeptydów przez peptydazy rąbka szczoteczkowego. Wydaje się prawdopodobne, że enzymy te ochraniają dalej położone fragmenty nefronu przed niekontrolowanym działaniem tych peptydów.

Tematem osobnej sesji było wykorzystanie nowych technik w badaniach biochemicznych nerki. Między innymi referowano wyniki badań dotyczących metabolizmu izolowanych fragmentów nefronu (P. Vinay, Kanada), hodowanych *in vitro* komórek nabłonkowych oraz zastosowania jądrowego rezonansu magnetycznego w tego typu badaniach (R. Kinne, RFN). Są one ograniczone stosunkowo niewielką ilością preparatu i krótkim czasem życia tych komórek. Interesujące rozwiązanie przedstawił D. Scott (RFN), który w wyniku transfekcji komórek części grubościennego ramienia wstępującego pętli Henlego (TAHL) wczesnymi genami SV 40, otrzymał linię komórkową charakteryzującą się niewielkimi wymaganiami życiowymi, szybkim wzrostem i długim czasem życia. Linia ta zachowuje wła-

ściwości komórek macierzystych TAHL, przez co stanowi dogodny model do badań specyficznych dla tych komórek funkcji oraz ich regulacji.

Nie zabrakło prac dotyczących regulacji równowagi kwasowo-zasadowej w komórkach nerek oraz wpływu zmian w homeostazie pH na metabolizm, a między innymi wpływu kwasicy na ammoniogenozę (H. Preuss, USA, P, Vinay, Kanada), proliferację retikulum endoplazmatycznego kanalików proksymalnych (M. Bergeron, Kanada) czy indukcję karboksykinazy fosfoenolopirogronoanowej i glutaminy zależnej od fosforanu (N. Curthoys, USA). Rolę nerek w utrzymaniu równowagi kwasowo-zasadowej rozpatrywano często w powiązaniu z metabolizmem wątroby (D. Haussinger, RFN, Z. Kovacević, Jugosławia (czy jelit) S. Snart, Wielka Brytania).

Licznie zaprezentowano prace poświęcone funkcjonalnemu zróżnicowaniu nefronu oraz lokalizacji enzymów w różnych jego fragmentach. I tak S. Angielski wskazał na różnice w metabolizmie AMP i adenozyiny w rdzeniu i w korze nerki, podczas gdy H. Endou (Japonia) zwrócił uwagę na występowanie oksydazy ksantynowej i dysmutazy ponadtlenkowej głównie w proksymalnej części kanalików nerkowych oraz w kłębuszku nerkowym. Podobną lokalizację stwierdzono w przypadku enzymu przekształcającego angiotensynę I (J. Marchetti, Francja). Natomiast W. G. Guder (RFN) zaprezentował bardzo ciekawy referat dotyczący badań nad nerkowym układem kininogen-kalikreina-kinina-kininaza, wskazując, że występowanie enzymów tego układu jest związane z regulacją funkcjonowania kanalików zbiorczych.

Omówiono także wpływ niektórych leków na metabolizm nerki. Interdyscyplinarny charakter Sympozjum podkreślony został przez naukowców prezentujących prace związane z funkcjonowaniem nerek w warunkach patologii.

Sympozjum odbyło się w sali konferencyjnej Hotelu Dubrovnik President, położonego malowniczo na skalistym wybrzeżu Adriatyku, co zapewniło uczestnikom wypoczynek w krótkich przerwach między obradami. Organizatorzy dołożyli starań, aby zapoznać wszystkich uczestników z historią i zabytkami starego Dubrownika oraz z zaletami miejscowej kuchni.

Mariusz Michalik

Volume 33

Number 2—3

Obituaries:

The late Professor Irena Chmielewska (Institute of Biochemistry at the Warsaw University, Warsaw) 115

The late Professor Janusz Gregorczyk (Department of Clinical Biochemistry and Diagnostic at the Pomerian School of Medicine (Szczecin) 119

An editorial introduction:

A new series of articles on the biological role and mechanism of action of the so called growth factors 123

Articles:

A. Klein — Growth factors — a new family of regulatory peptides (Department of Animal Biochemistry (Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) 125

A. Inglot — Interferons as nonclassic hormones interacting with growth factors (Laboratory of Tumor Virology, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Pol. Acad. Sci., Wrocław) 151

W. Popik — Transforming growth factors (Laboratory of Tumor Virology, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Pol. Acad. Sci., Wrocław) 165

M. Kosz-Vnenchak, M. Kawecka, D. Magielska-Żero — Products of some oncogenes and cellular growth factors (Department of Microbiology and Immunology, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) 183

Historical:

A. Klein — Nobel Prize for Medicine 1986 (Department of Animal Biochemistry, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) 199

Articles:

A. M., Kołodziejczyk, A. S. Kołodziejczyk — Muramylopeptides and their pharmacological properties (Institute of Chemistry, Organic and Nutritional Technology, Institute of Technology, Gdańsk, Department of Organic Chemistry, University of Gdańsk) 203

M. Warwas, G. Sawicki — The cystatins (Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Medical Academy, Wrocław) 231

H. Jańska — Regulation of enzyme activity by the formation of protein-mixed disulfides (Institute of Biochemistry, University of Wrocław, Wrocław) 243

D. Skowrya, M. Żylicz — The heat shock proteins (Division of Biophysics, Department of Molecular Biology, University of Gdańsk, Gdańsk)	259
L. Lachowicz — Brain Protein Kinases Cyclic AMP-Dependent (II Department of Biochemistry Institute Physiology and Biochemistry, School of Medicine, Łódź)	277
G. Palamarczyk — Cotranslational processing results in the heterogeneity of the oligosaccharide structure of N-glycoproteins (Institute of Biochemistry and Biophysics, Pol. Acad. Sci., Warszawa)	297
E. Zdebska — Structure, immunological specificity and biosynthesis of human blood cell complex glycosphingolipids and glycoproteins (polylactosaminoglycins) (Department of Biochemistry, Institute of Hematology, Warszawa)	309
Z. Szweykowska-Kulińska, J. Augustyniak — Transfer RNA genes: their organization and expression (Department of Biopolymer Biochemistry Adam Mickiewicz University, Poznań)	329
Nomenclature	357
Chronicle of the Polish Biochemical Society	371
Meeting Reports	377

SPIS TREŚCI

Wspomnienia:

Profesor Irena Chmielewska — Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego	115
Profesor Janusz Gregorczyk — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie	119
Od redakcji	123

Artykuły:

A. Klein — Czynniki wzrostowe — nowa rodzina peptydów regulacyjnych	125
A. Inglot — Interferony jako nieklasyczne hormony współdziałające z czynnikami wzrostowymi	151
W. Popik — Transformujące czynniki wzrostowe	165
M. Kosz-Vnenchak, M. Kawecka, D. Magielska-Żero — Produkty niektórych onkogenów a czynniki wzrostu komórkowego	183

Z historii biochemii:

A. Klein — Nobel 1986 w dziedzinie medycyny	199
---	-----

Artykuły:

A. M. Kołodziejczyk, A. S. Kołodziejczyk — Muramylopeptydy i ich własności farmakologiczne	203
M. Warwas, G. Sawicki — Cystatyny	231
H. Jańska — Regulacja aktywności enzymów poprzez tworzenie mieszanych dwusiarczków białkowych	243
D. Skowrya, M. Żylicz — Białka szoku termicznego	259
L. Lachowicz — Kinazy białkowe mózgowia aktywowane przez cAMP	277
G. Palamarczyk — Heterogenność struktury reszt cukrowych N-glikoprotein jako wynik procesów kotranslacyjnych	297
E. Zdebska — Struktura, właściwości immunologiczne i biosynteza złożonych glikosfingolipidów i glikoprotein (polilaktozoaminoglikanów) błony krwinek człowieka	309
Z. Szweykowska-Kulińska, J. Augustyniak — Geny transferowych RNA: ich organizacja i ekspresja	329

Słownictwo:

Przedstawianie danych termodynamicznych i pokrewnych w biologii, zalecenia, 1985 (tłum. W. Hendrich)	357
--	-----

Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego:

Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w XI kadencji 1983—1986 przedstawione na XII Walnym Zebraniu członków w dniu 18 września 1986 r. (K. Zakrzewski)	371
Nowe władze Towarzystwa	373
Nagrody P. T. Bioch. przyznane w 1986 roku	374
Sprawozdanie z kursu FEBS dla zaawansowanych n.t.: Oddziaływania DNA z ligandami drobnocząsteczkowymi oraz białkowymi (M. Gniazdowski)	377

Sprawozdania ze zjazdów:

Sprawozdanie ze szkoły letniej n.t.: Indukcja struktury DNA (M. Gniazdowski)	382
Sprawozdanie z VIII Międzynarodowego Sympozjum n.t.: „Biochemiczne aspekty funkcjonowania nerek” (M. Michalik)	383

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwóch lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minireviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 5 stron maszynopisu, informujące o nowych interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych, oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innych czasopismach, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska: poprawki wynikające z błędów drukarni nanosimy ołówkiem; niezbędne zmiany autorskie nanosimy niebieskim atramentem. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 25 odbitek swego artykułu.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

Forma maszynopisu: maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autor(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów), jego (ich) miejsce(a) pracy oraz wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły informować rzeczowo winny o przedstawionych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1. Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku, np. kwas glutaminowy (I).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

Piśmiennictwo: w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 271, 1 np.

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

Dixon M., Weeb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co., London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58; Academic Press, London.

Załączniki: każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście oraz oznaczyć (na górze strony otówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuły tabel i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść, zaznaczając z jakich(jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzorów cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczenie „góra” i „dół” (otówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów, aby zabezpieczyć maszynopis i ilustracje przed pogięciem.

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1987

Nakład 1730 (1636+94)	Oddano do składania 31.III.1987 r.
Ark. wyd. 21,25, ark. druk. 17,5	Podpisano do druku w grudniu 1987 r.
Papier ilustrac. kl. V, 71 g, 70×100	Druk ukończono w lutym 1988 r.
Zam. 4338/12/86	Cena zł 320,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

<http://rcin.org.pl>

Postępy Biochemii

Prenumeratę **na kraj** przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki **za granicę** przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie Nr 1153-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do dnia 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 1. Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

Indeks 36969

Post. Biochem. 33, z 2—3, s. 113—392

Indeks 36969