



O adenozyno-5'-tetrafosforanie

Andrzej Guranowski, Małgorzata Pietrowska-Borek

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

About Adenosine 5'-tetrphosphate

Summary

This review is a summary of our knowledge on uncommon mononucleotide, the adenosine 5'-tetrphosphate (p_4A). It covers the very first communications on p_4A and other nucleoside 5'-tetrphosphates, methods that allow to identify p_4A and estimate it quantitatively. It also presents the occurrence of p_4A in biological material, enzymatic reactions which can lead to the accumulation of p_4A in the cells, catabolic reactions, the properties of three specific p_4A hydrolases from rabbit, yellow lupin and humans, and of the yeast exopolyphosphatase for which p_4Ns are very good substrates. Finally, inhibition exerted by p_4A on some enzymatic reactions and the effects the compound exerts on blood vessels and nervous system are discussed.

Key words:

adenosine 5'-tetrphosphate, p_4A , p_4A synthesis, p_4A -degrading enzymes, p_4A hydrolase, p_4A as an inhibitor.

1. Wstęp

Adenozyno-5'-tetrafosforan (ppppA, p_4A) znany jest od pięćdziesięciu lat. Nie wzbudzał jednak, jak dotąd, szczególnego zainteresowania biochemików, mimo że jest najbliższym homologiem adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), który znajduje się przecież w centrum metabolizmu każdej komórki. My zainteresowaliśmy się p_4A przed kilkoma laty, kiedy przy okazji badania enzymów związanych z przekształcaniem innego, mało znanego nukleotydu, diadenozyno-5', 5'''-tetrafosforanu (Ap_4A), natrafialiś-

Adres do korespondencji

Andrzej Guranowski,
Katedra Biochemii
i Biotechnologii,
Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego,
ul. Wołyńska 35,
60-637 Poznań.

my w ekstraktach z różnych organizmów na aktywności wysoce swoistych enzymów, które katalizują hydrolityczne odszczepienie z p_4A skrajnej reszty fosforanowej (reszty δ), co prowadzi do powstania ATP.

Ta powszechność i swoistość enzymów sugerują, że p_4A może pełnić w komórkach jakieś funkcje. Wiedza o różnych niekanonicznych nukleotydach jest bardzo skromna, a już o p_4A szczególnie. W pierwszej w literaturze, monografii przedstawiamy obecny stan wiedzy o tym nukleotydzie. Niemała część badań nad p_4A miała bezpośredni lub pośredni związek z Katedrą Biochemii Akademii Rolniczej w Poznaniu.

2. Pierwsze doniesienia o p_4A i innych nukleozydo-5'-tetrafosforanach

Kilkuletnie badania Marriana (1-2) doprowadziły do ogłoszenia w latach 1953 i 1954 krótkich doniesień, w których autor wyraził przypuszczenie, że związek zanieczyszczający preparaty ATP pozyskane z mięśni wołu to adenozy-no-5'-tetrafosforan. W następnym roku Sacks opublikował spostrzeżenie, że w handlowych preparatach ATP uzyskanych z drożdży można stwierdzić nie tylko p_4A , ale i adenozy-no-5'-pentafosforan (p_5A). Nukleotydy te stanowiły odpowiednio około 8% i niecały 1% wszystkich związków adeninowych (3). Wreszcie, Lieberman w 1955 r. potwierdził przypuszczenia Marriana identyfikując p_4A w preparatach z mięśni konia (4). Zanieczyszczenie preparatów nukleozydo-5'-trifosforanów odpowiednimi nukleozydo-5'-tetrafosforanami wykazano następnie w innych preparatach ATP (5), w preparatach GTP (6,7), UTP (8) i CTP (9). Na podstawie naszych obserwacji przypuszczamy, że im starszy preparat ATP tym więcej w nim p_4A i p_5A . Aby wykazać obecność nukleozydo-tetrafosforanu (p_4N) w preparacie danego nukleozydotrifosforanu (NTP), wystarczy wykonać chromatografię cienkowsarstwową 3-5 mikrolitrów 30-50 mM roztworu NTP, np. na płytkach pokrytych żelazem krzemionkowym ze związkami fluoryzującym, w układzie rozpuszczalników dioksan:stężony amoniak:woda, zmieszanych w objętościowych proporcjach 6:1:6, rozwijanych przez 90 min. Na rysunku 1 pokazany jest taki chromatogram, sfotografowany pod lampą emitującą krótki ultrafiolet.

Przypuszczalnie każdy nukleozydotrifosforan (NTP) podlega spontanicznej dysmutacji:

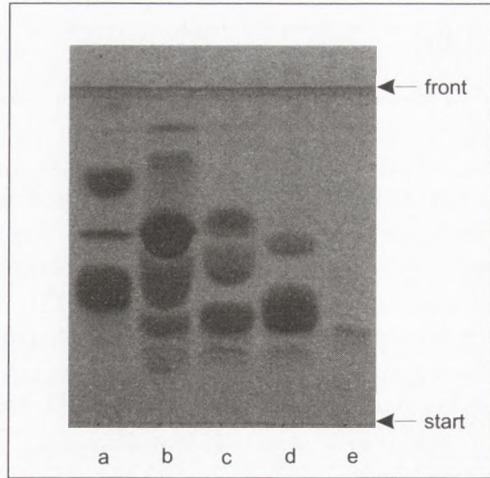


Taką sugestią wyrażono już wcześniej w odniesieniu do ATP i p_4A (5). Przyspieszoną dysmutację ATP zaobserwowano poddając roztwór zawierający 150 mM ATP i 50 mM $MgCl_2$ cyklicznemu wysuszeniu i rozpuszczaniu w wodzie w ciągu 4 dni (10).

Dziś, jeśli potrzebny jest czysty i w większych ilościach, najprościej p_4A kupić jako preparat pochodzący z mięśni końskich, np. w „Sigmie”. Dostępny jest tańszy preparat, w postaci soli sodowej, bądź droższy, lecz trwalszy, jako sól tri(cyklohek-

Rys. 1. Chromatografia cienkowarstwowa starych preparatów nukleozydotrifosforanów i towarzyszących im zanieczyszczeń. Zastosowano płytki aluminiowe pokryte żel krzemionkowym, zawierającym związek fluoryzujący w ultrafiolecie (Merck nr kat. 1.05554). W punktach od a-d, na linię startu nałożono 5 μ l 50 mM roztworów poszczególnych NTP; w punkcie e – 2 μ l 2 mM wzorca p_4A . Chromatogram rozwijano przez 90 minut w mieszaninie dioksan:25% amoniak:woda (6:1:6, w proporcjach objętościowych). Przedstawiony chromatogram sfotografowano w UV.

Na poszczególnych ścieżkach, począwszy od startu widać plamy: a – p_4A , ATP, ADP i AMP, b – p_4G , GTP, GDP, GMP, nie zidentyfikowanego związku i guanozyny, c – p_4C , CTP, CDP i CMP, d – p_4U , UTP, UDP, e – wzorca p_4A .



syloamoniowa). Można też uzyskać p_4A na drodze syntezy chemicznej (11) lub enzymatycznej, o czym piszemy w dalszej części artykułu.

3. Jakościowe i ilościowe metody oznaczania p_4A

Z racji posiadanego ładunku, p_4A łatwo oddzielić od innych nukleotydów stosując chromatografię jonowymienną; na kolumnach, wypełnionych np. takimi anionitami jak Dowex 1 (12,13) i Resource Q (10), lub cienkowarstwową, np. na PEI-celulozie (14). Dla wykrycia p_4A w mało oczyszczonych mieszaninach, niemal w surowych ekstraktach, zastosowano najczulszą z metod – dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową związków znakowanych radioizotopem ^{32}P (15). Poza tym, p_4A od innych nukleotydów można dobrze oddzielić na złożach do chromatografii w fazie odwróconej, np. Hypersil ODS (16), a bardzo wygodnym podłożem do chromatografii cienkowarstwowej jest żel krzemionkowy, na którym mieszaninę nukleotydów daje się rozdzielić we wspomnianej już mieszaninie rozpuszczalników: dioksan:stężony amoniak:woda (17). Oryginalną metodę ilościowego oznaczania p_4A opracowali Manandhar i van Dyke (18). Zaobserwowali oni, że układ lucyferaza-lucyferyna może emitować światło nie tylko w obecności ATP, ale także w obecności p_4A , a kinetyka tej emisji jest w obu przypadkach różna. Po sześciu minutach, gdy ewentualna emisja światła w reakcji pobudzonej ATP jest już szczątkowa, emisja spowodowana obecnością p_4A osiąga maksimum. Tak zatem opóźniony odczyt luminescencji pozwala oznaczyć pikomolowe ilości p_4A .

4. p₄A w materiale biologicznym

Pierwsza publikacja na temat obecności p₄A w materiale biologicznym ukazała się w 1965 r., kiedy Heldt i Klingenberg (12) wykazali obecność tego związku w mitochondriach wątroby szczura. W następnym roku Small i Cooper donieśli o występowaniu p₄A w mięśniach królika i konia, gdzie stanowił on 0,03-0,04% wszystkich mononukleotydów adeninowych (13). Kolejne prace o występowaniu p₄A w materiale biologicznym dotyczyły wątroby szczura (14), kory nadnercza wołu (16,19,20), trombocytów królika (21) i drożdży (15). Oszacowano, że w komórkach zwierzęcych stężenie p₄A jest od 4 do 3 rzędów wielkości niższe niż stężenie ATP i wynosi 2 μM. Chromafinowe granule z kory nadnercza zawierają do 2,2 ± 0,1 nmoles p₄A/mg białka, co odpowiada stężeniu niemal 0,8 mM. Jest to 200-300-krotnie mniej niż ATP (20).

Podjmując próby zidentyfikowania nukleotydów sygnałowych, które miałyby funkcjonować podczas różnicowania się komórki eukariotycznej, Jakubowski wykrył, że mocno ufosforylowane nukleotydy syntetyzowane są wyłącznie podczas jednego ze stadiów rozwojowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, sporulacji, i że związkami tymi są p₄A i p₅A (15). Osiągają one wówczas, odpowiednio, 2 i 1,5% zawartości ATP. Natomiast w rosnących komórkach drożdży i we wczesnym stadium sporulacji zawartość tych nukleotydów jest mniejsza niż 0,1% ATP. Dodatkowym argumentem za tym, że p₄A i p₅A są nukleotydami sygnałowymi, zaznaczającymi jedno ze stadiów rozwojowych drożdży, sporulację, było to, że nie stwierdzono ich w zmutowanych komórkach drożdży niezdolnych do wytwarzania zarodników workowych (askospor).

5. Przemiany biochemiczne, które mogą prowadzić do nagromadzenia się p₄A w komórkach

Poznane dotąd enzymy i katalizowane przez nie *in vitro* reakcje, które potencjalnie mogą być odpowiedzialne za nagromadzenie się p₄A *in vivo* tworzą trzy grupy. Do pierwszej wchodzi enzymy, które katalizują dodanie reszty fosforanowej do ATP:

– kinaza adenylnowa (EC 2.7.4.3), która może przenieść resztę fosforanową z ADP (22):



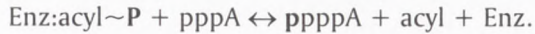
– kinaza fosfoglicerynowa (EC 2.7.2.3), która może przenieść resztę fosforanową z 1,3-bisfosfoglicerynianu (13):



– zmutowana syntetaza bursztynilo-koenzymu A (EC 6.2.1.5) z *Escherichia coli*, która może przenieść resztę fosforanową z kompleksu enzym:fosforan (23):

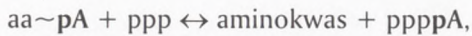


– syntetaza MurD (EC 6.3.2.9) z *E. coli*, która przenosi resztę fosforanową z acylo-fosforanu (24):

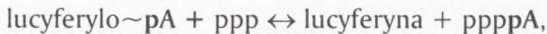


Do drugiej grupy wchodzi enzymy zdolne do przeniesienia reszty adenylnowej (AMP-) na tripolifosforan, P_3 , albo z mieszanego bezwodnika utworzonego między kwasem organicznym a resztą adenylnową, jak w przypadku:

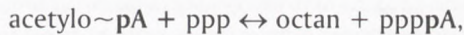
– niektórych syntetaz aminoacylo-tRNA, np. syntetazy lizylo-tRNA (EC 6.1.1.6) (14,15):



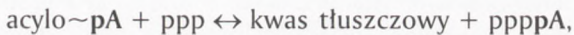
– lucyferazy (EC 1.13.12.7) ze świetlika *Photinus pyralis* (25):



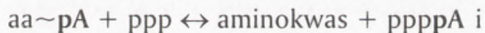
– syntetazy acetylo-CoA (EC 6.2.1.1) z drożdży (17):



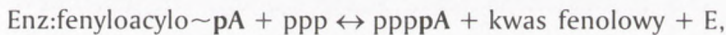
– syntetazy acylo-CoA (EC 6.2.1.3) z *Pseudomonas fragi* (26):



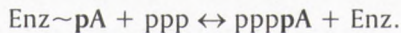
– nierybosomalnych syntetaz peptydowych (27):



– syntetazy kumarylo-CoA (EC 6.2.1.12) z *Arabidopsis thaliana* (28):

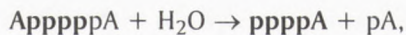


albo z kompleksu enzym:AMP, co jest prawdopodobnie jedynym mechanizmem działania ligaz DNA (29) i RNA (30) z faga T4 i alternatywnym mechanizmem dla mechanizmu z udziałem mieszanego bezwodnika w przypadku syntetazy acetylo-CoA z drożdży (17), syntetazy acylo-CoA z *P. fragi* (26) i pewnego mutantu syntetazy kumarylo-CoA z *A. thaliana* (Pietrowska-Borek i wsp., w przygotowaniu):

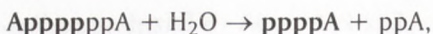


Do trzeciej grupy należy zaklasyfikować enzymy, które, jeśli będą katalizować degradację Ap_5A lub Ap_6A , wytworzą jako jeden z dwóch produktów p_4A :

– ektonukleotydazy (EC 3.1.4.1) (31,32):



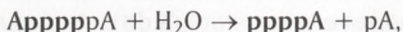
– symetrycznie działające hydrolazy Ap_4A (EC 3.6.1.41) (33,34):



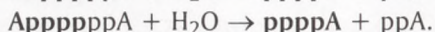
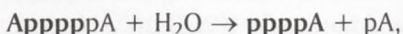
– fosforylaze Ap_4A (EC 2.7.7.53) (35):



– hydrolaze Ap_3A (EC 3.6.1.29) (36,41):



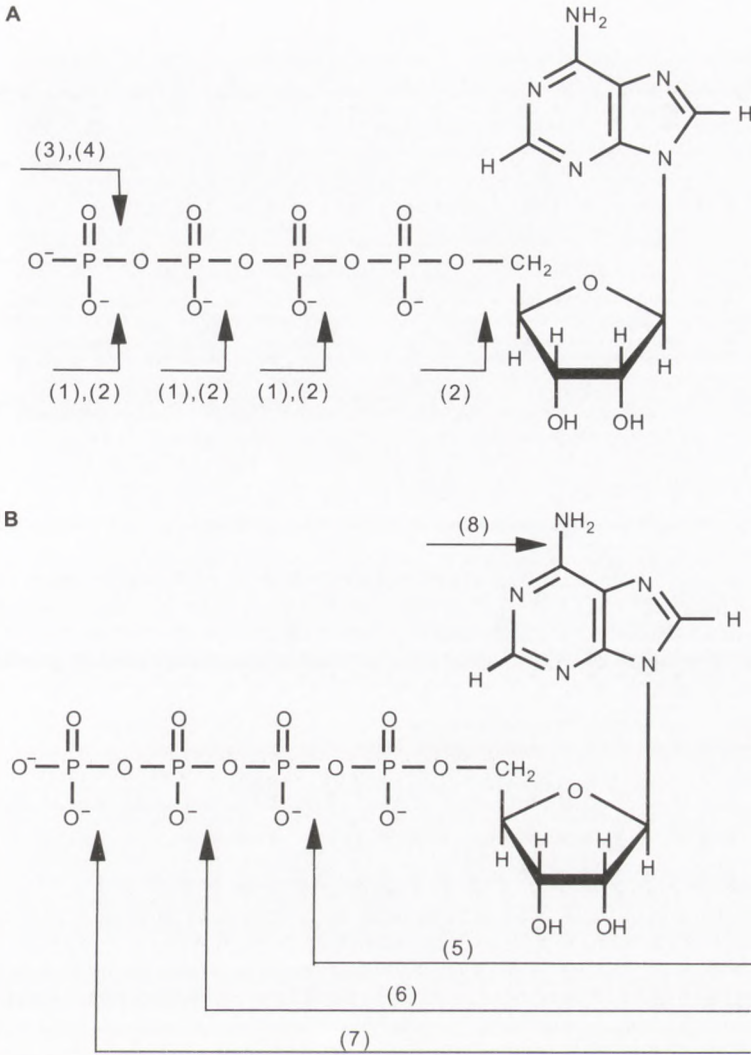
– oraz hydrolazy $\text{Ap}_5\text{A}/\text{Ap}_6\text{A}$ (nie odnotowane dotąd w rejestrze enzymów) (37,38):



6. Enzymy katabolizujące p_4A

Poznane dotąd enzymy, które degradują p_4A można podzielić według kryterium specyficzności substratowej oraz według tego, które miejsce w cząsteczce substratu jest atakowane przez cząsteczkę wody: łańcuch oligofosforanowy (rys. 2A) czy reszta nukleotydomowa (rys. 2B). Do enzymów o małej specyficzności substratowej, które rozpoznają łańcuch oligofosforanowy, a zatem działają jako *egzofosfatazy*, zaliczyć można fosfatazy i apyrazę. Alkaliczna (EC 3.1.3.1) czy kwaśna (EC 3.1.3.2) fosfataza, odszczepiając sukcesywnie reszty fosforanowe zdegraduje p_4A do adenyzy, a apyrazę (EC 3.6.1.5), katalizując najpierw w wolnej reakcji odhydrolizowanie grupy fosforanowej δ , a następnie, w szybkiej reakcji, grup γ i β , pozostawi w mieszaninie AMP (39). Od strony nukleotydu, cząsteczka p_4A może być atakowana przez wodę w reakcji katalizowanej przez mało swoisty enzym, fosfodiesterazę typu I (EC 3.1.4.1). Odszczepia ona z różnych możliwych substratów 5'NMP; tu, z cząsteczki p_4A – AMP. Wreszcie, za mało swoisty enzym degradujący, dla którego p_4A także może być substratem należy uznać deaminazę adenyzyfosforanową (EC 3.5.4.17); np. z *Aspergillus oryzae* lub z winniczka (*Helix pomatia*) (40). W wyniku jej działania z p_4A powstaje inozyno-5'-tetrafosforan (p_4I).

Innymi nieswoistymi enzymami zdolnymi do degradacji p_4A od strony nukleotydomowej są też różne hydrolazy z rodziny „nudix”: działające asymetrycznie hydrolazy Ap_4A (EC 3.6.1.17) (41-44) oraz niedawno odkryte hydrolazy specyficzne wobec Ap_5A i Ap_6A (37,38). Jako że rozpoznają one w swych potencjalnych substratach resztę ATP (45), zdegradują p_4A do ATP i P_i . Można powiedzieć, że działają jako *endofosfatazy*. Rozkład p_4A do ATP i P_i katalizowany przez hydrolazę Ap_4A wykazano po raz pierwszy w 1983 r. dla enzymu z nasion łubinu żółtego (41), a potwierdzenia tej właściwości zaczęły pojawiać się dopiero od niedawna, podczas charakteryzowania specyficzności substratowej hydrolaz Ap_4A z inwazyjnej bakterii, *Bartonella bacilliformis* (42), z robaka *Caenorhabditis elegans* (43) oraz hydrolazy nudix kodowanej przez gen g5R (D250) wirusa wywołującego gorączkę u świń afrykańskich (44). Sy-

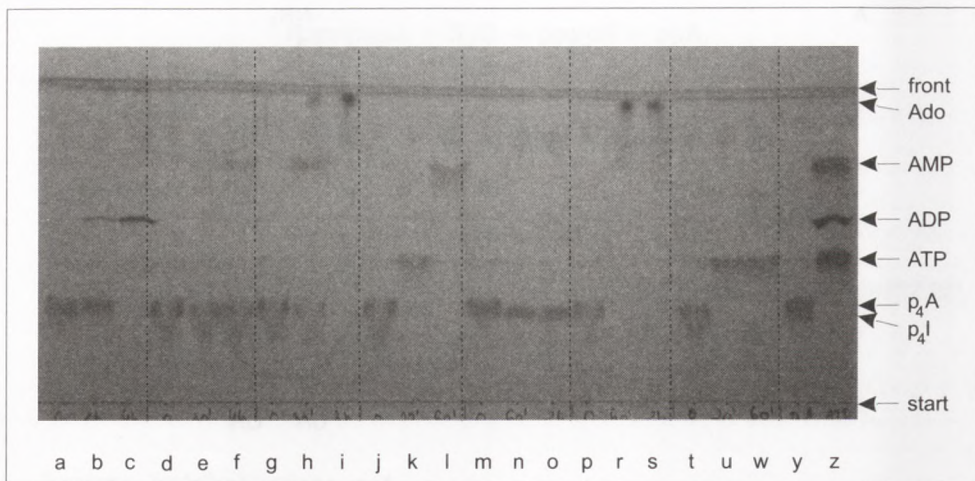


Rys. 2. Miejsca hydrolytycznego degradowania adenozy-5'-tetrafosforanu przez enzymy:

A – tnące p₄A od strony łańcucha oligofosforanowego: (1) – apyrazy (EC 3.6.1.5); (2) – alkaliczne (EC 3.1.3.1) i kwaśne (EC 3.1.3.2) fosfatazy; (3) – egzopolifosfatazy (EC 3.6.1.11); (4) – hydrolazy nukleozydo-5'-tetrafosforanów (EC 3.6.1.14).

B – degradujące p₄A od strony nukleotydu: (5) – fosfodiesterazy typu I (EC 3.1.4.1); (6) – symetrycznie działające hydrolazy Ap₄A (EC 3.6.1.41); (7) – asymetrycznie działające hydrolazy Ap₄A (EC 3.6.1.17); (8) – deaminazy adenozy-5'-tetrafosforanowe (EC 3.5.4.17).

metrycznie działające hydrolazy dinukleozydotetrafosforanów (EC 3.6.1.41), które degradują swe substraty uwalniając zawsze ADP (NDP), rozkładają p₄A do ADP i przypuszczalnie PP_i (33,34,46). Wreszcie bardzo wolną hydrolizę p₄A do AMP za-



Rys. 3. Chromatografia cienkowarstwowa przedstawiająca degradację p_4A katalizowaną przez nieswoiste enzymy.

Zastosowano płytki aluminiowe pokryte żelazem krzemionkowym zawierającym związek fluorydujący w ultrafioletcie (Merck nr kat. 1.05554). Chromatogram rozwijano przez 90 minut w mieszaninie dioksan:25% amoniak:woda (6:1:6, w proporcjach objętościowych).

Na poszczególnych ścieżkach chromatografowano mieszaniny zawierające p_4A , po inkubacji z następującymi enzymami:

a-c – symetrycznie działającą hydrolazą Ap_4A (EC 3.6.1.41) z *Escherichia coli*,

d-f – apyrazą (EC 3.6.1.5) z liścieni łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.),

g-i – fosfodiesterazą typu I (EC 3.1.4.1) z jadu węża (zanieczyszczona fosfatazą),

j-l – asymetrycznie działającą hydrolazą Ap_4A (EC 3.6.1.17) z łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.),

m-o – deaminazą adenylofosforanową (EC 3.5.4.17) z winniczka (*Helix pomatia*),

p-s – alkaliczną fosfatazą (EC 3.1.3.1) ze śluzówki jelit cielęcych,

t-w – egzopolifosfatazą (EC 3.6.1.11) z drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*),

Na ścieżce y widać wzorzec p_4A , a na z – wzorce AMP, ADP i ATP.

Stężenia enzymów i czas pobierania próbek dobrano wcześniej tak, aby na chromatogramie było widać zachodzące przemiany. Wobec tego, że zastosowano bardzo aktywny preparat asymetrycznie działającej hydrolazy Ap_4A z łubinu wąskolistnego, ujawniła się aktywność apyrazowa, która jest typowa dla homogennych preparatów hydrolazy Ap_4A uzyskiwanych z różnych źródeł.

obserwowano inkubując ten nukleotyd z preparatem hydrolazy Ap_3A z nasion łubinu żółtego (41) oraz z ludzkim białkiem Fhit (Guranowski, obserwacja nie opublikowana), które jest także hydrolazą Np_3N' (36). Przykłady postępujących reakcji degradacji p_4A katalizowanych przez większość z wymienionych enzymów nieswoistych widać na rysunku 3.

Za enzym o znacznie większej specyficzności substratowej można uznać egzopolifosfatazę (EC 3.6.1.11) wykrytą u bakterii i drożdży. Chociaż enzym ten preferuje długie łańcuchy polifosforanowe, hydrolizuje też tetra- i tripolifosforany oraz – co wykazano dopiero w latach 1996-1998 – p_4N i p_5N (47-50). Najbardziej swoistym

enzymem hydrolizującym p_4A jest hydrolaza nukleozydotetrafosforanów (EC 3.6.1.14) wykryta u ssaków (51,52) i roślin wyższych (53). Enzym ten także rozkłada p_4A do ATP i P_i , ale atak kierowany jest nie jak w przypadku asymetrycznie działających hydrolaz Ap_4A od strony nukleotydu (ATP), ale od strony łańcucha oligofosforanowego. Wykazano to na homogennym enzymie z łubinu, gdy analizowano jak hydrolizowany jest homolog, p_5A . Łubinowa hydrolaza Ap_4A degradowała p_5A do ATP + PP_i , a hydrolaza p_4N do uwalnianych kolejno dwóch reszt P_i i ATP (53).

6.1. Hydrolaza p_4A z mięśni królika

Częściowo oczyszczony preparat tego enzymu (51) hydrolizował, poza p_4A i p_4I , tripolifosforan, do PP_i i P_i , ale nie wykazywał aktywności wobec polifosforanów (P_n) i powszechnych nukleozydo-5'-di- i trifosforanów. Dla katalizowania reakcji hydrolizy p_4A enzym wymagał następujących kationów: $Co^{2+} > Fe^{2+} \approx Mg^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+}$, a dla hydrolizy P_3 : $Ni^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} \approx Mg^{2+} > Mn^{2+}$. Optimum działania w buforach trisowym lub glicyloglicynowym wypadło około pH 8,0. Wartości K_m dla p_4A i p_4I wyniosły, odpowiednio, 27 μM i 34 μM . Hydroliza p_4A w $H_2^{18}O$ doprowadzała do wbudowywania ^{18}O wyłącznie do uwolnionej reszty fosforanowej; co świadczy o tym, że w reakcji woda (jon hydroksylowy) atakuje skrajną resztę fosforanową.

6.2. Hydrolaza p_4A z nasion łubinu żółtego

Na enzym ten natrafiono kiedy próbowano wyjaśnić różnice w specyficznościach substratowych między preparatami asymetrycznie działających hydrolaz Ap_4A z nasion łubinu żółtego a enzymami wyizolowanymi z różnych zwierząt. Wyizolowany bowiem w naszej pracowni preparat łubinowy degradował p_4A do ATP i P_i całkiem sprawnie – z szybkością porównywalną do degradowania Ap_4A (41), a hamowanie degradacji Ap_4A przez p_4A nie było silne (stałych K_i nie wyznaczano). Zwierzęce enzymy natomiast, były bardzo silnie hamowane przez p_4A (patrz niżej), a katalizowany przez niektóre z nich rozpad p_4A był reakcją bardzo powolną (Guranowski, dane nie opublikowane). Pojawiło się zatem pytanie, czy aby rozważany preparat łubinowy nie mógł być zanieczyszczony hydrolazą p_4A ? O istnieniu takiej aktywności (w ekstraktach z tkanek królika) donoszono wówczas tylko w jednej pracy z 1966 r. (51). W celu sprawdzenia czy taka hydrolaza faktycznie istnieje w łubinie sporządzono mieszaninę inkubacyjną zawierającą p_4A i przetestowano przy jej użyciu różne frakcje uzyskiwane podczas typowej procedury oczyszczania hydrolaz Ap_4A i Ap_3A . Już w chromatografii jonowymiennej białek uzyskanych z surowego ekstraktu po wysoleniu siarczanem amonowym wykazano, że w nasionach łubinu żółtego jest spora ilość hydrolazy p_4A . Na nośniku DEAE-Sephacel wpływała ona między hydrolazą Ap_3A a hydrolazą Ap_4A . Dalsze oczyszczanie podczas sączenia molekularnego,

pokazało, że ewentualne zanieczyszczenie hydrolazy p_4A zostało usunięte, gdyż każda z hydrolaz ma inną masę: hydrolaza Ap_4A około 18 kDa, hydrolaza Ap_3A 41 kDa, a hydrolaza p_4A 25 kDa. Ta ostatnia nie degraduje dinukleozydopolifosforanów. Jest mało prawdopodobne, aby opisany w 1983 r. preparat hydrolazy Ap_4A był zanieczyszczony hydrolazą p_4A . Zdolność łubinowej hydrolazy Ap_4A do degradacji p_4A potwierdzono potem parokrotnie, gdy charakteryzowano homogenne preparaty pozyskane metodą elucji powinowactwa i preparat enzymu rekombinowanego izolowanego z *E. coli* (54) (Guranowski, dane nie publikowane).

Łubinowa hydrolaza p_4A jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie 25 ± 1 kDa. (Do dziś jest jedynym preparatem hydrolazy p_4A oczyszczonym do stanu elektroforetycznej jednorodności). Dla przeprowadzania reakcji enzym potrzebuje któregoś z następujących kationów: $Mg^{2+} \gg Co^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+}$. Optimum pH wypada przy 8,2. K_m dla p_4A wynosi $3 \mu M$ a k_{cat} $8,5 s^{-1}$. p_4A i p_4G są hydrolizowane z taką samą szybkością, a p_5A 200-krotnie wolniej. Ten ostatni nukleotyd podlega sekwencyjnej defosforylacji, w wyniku czego powstaje ATP i $2P_i$. Inhibitorami łubinowej hydrolazy p_4A okazały się Zn^{2+} , Ca^{2+} i F⁻; wartości IC_{50} dla tych jonów wyniosły, odpowiednio, 100, 200 i $120 \mu M$ (53).

6.3. Egzopolifosfataza z drożdży

Badanie w latach osiemdziesiątych enzymów degradujących Ap_4A doprowadziło do wykrycia trzech różnych sposobów enzymatycznego rozpadu tego związku: 1) znanej już wcześniej hydrolizy asymetrycznej do ATP + AMP, typowej dla wyższych eukariota; 2) hydrolizy symetrycznej do 2ADP, typowej dla prokariota, oraz 3) fosforolizy prowadzącej do ATP i ADP, wykrytej u drożdży i pierwotniaków (patrz artykuł przeglądowy (55)).

W przeciwieństwie do hydrolaz dinukleozydopolifosforanów, które są w stanie zdegradować p_4A , drożdżowa fosforylaza (EC 2.7.7.53) nie może tego dokonać (34). W swym miejscu katalitycznym, od strony rozpoznającej nukleotyd donorowy, umieszcza bowiem tylko cząsteczkę (fragment) mającą (-y) dwie reszty fosforanowe, ADP (ADP-), z której przejmie resztę AMP-, aby następnie z utworzonego kompleksu pośredniego enzym~AMP przerzucić ją albo na P_i , co daje ADP, albo na nukleotyd akceptujący; np. ATP lub p_4A , co prowadzi do powstania, odpowiednio, $AppppA$ lub $ApppppA$ (56). Jeśli zatem p_4A może być substratem drożdżowej fosforylasy Ap_4A to tylko w roli akceptora reszty adenylanowej.

Po badaniach łubinowej hydrolazy p_4A , postanowiliśmy sprawdzić czy i u drożdży (*S. cerevisiae*) występuje jakiś enzym katalizujący degradację p_4A . Wspomniano już, że p_4A jest naturalnym metabolitem u tych organizmów (15). W surowych ekstraktach z drożdży p_4A był szybko degradowany, ale nie można było w nich określić specyficzności enzymu degradującego z powodu różnych aktywności usuwających produkty reakcji, ATP i ADP. Już frakcjonowane wysalanie siarczanem amonowym

pozwołilo wzbogacić preparat w aktywność hydrolizującą p_4A i zmniejszyć aktywności hydrolizujące ATP. Chromatografia jonowymienna, podczas której obserwowano tylko jeden szczyt aktywności, sączenie molekularne i chromatografia na barwnym żelu (Matrex Gel green A), doprowadziły do uzyskania 4000-krotnie oczyszczonego preparatu „hydrolazy p_4A ”; wolnego od enzymów degradujących inne nukleotydy adeninowe. Podczas badania specyficzności substratowej pokazano, że ta drożdżowa „hydrolaza p_4A ” może degradować także P_3 i P_4 , ale nie PP_i lub ATP. Jednocześnie w literaturze o polifosforanach (57) natrafiono na informację o tym, że drożdże zawierają rozpuszczalną egzopolifosfatazę (scPPX1), która – poza preferowanymi dłogołańcuchowymi polifosforanami – degraduje także P_4 i P_3 , ale nie PP_i lub ATP. (Wśród związków testowanych wówczas jako potencjalne substraty nie było p_4A). Nadto, masa owej egzopolifosfatazy (45 kDa) była bardzo podobna, jeśli nie identyczna (w zależności od zastosowanej techniki badawczej) z masą wyznaczoną metodą sączenia molekularnego dla „hydrolazy p_4A ” podczyszczzonej z ekstraktów drożdżowych. Zachęciło to nas do przeprowadzenia badań porównawczych naszego preparatu ze zrekombinowaną scPPX1 pozyskaną z pracowni Artura Kornberga z Wydziału Biochemii Uniwersytetu Stanforda dzięki uprzejmości Shenjiang Liu. Okazało się, że nasz preparat jest aktywną egzopolifosfatazą, a preparat scPPX1 zachowuje się w niskim pH jak hydrolaza p_4A ($k_{cat} = 723 s^{-1}$). Dla reakcji hydrolizowania p_4A do ATP i P_i scPPX1 potrzebuje jednego z następujących kofaktorów: $Co^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ni^{2+}$. Optimum pH jest około 4,75, a K_m , wyznaczona dla p_4A w 50 mM buforze octanowym, przy 5 mM $CoCl_2$, wynosi 80 μM . p_5A degradowany był w tych warunkach 18-krotnie wolniej, a p_4G i p_4I były defosforylowane do GTP i ITP z taką samą szybkością jak p_4A do ATP. Tak zatem, p_4A jest u drożdży sprawnie degradowany, ale jego defosforylację do ATP katalizuje nie wysoce swoista hydrolaza p_4N , ale enzym o szerszej specyficzności substratowej – egzopolifosfataza (48), której w działaniu nie przeszkadza reszta nukleozydowa obecna na długim łańcuchu polifosforanowym.

6.4. Hydrolaza p_4N z łożyska człowieka

Prace prowadzone nad tym enzymem w naszym laboratorium są nadal w toku. Zwłaszcza nad doczyszczeniem go do stanu jednorodnego. Na podstawie dotychczasowych wyników przypuszcza się, że hydrolaza p_4N jest białkiem o masie 104 kDa, złożonym przypuszczalnie z dwóch podjednostek o masie około 52 kDa. Poza p_4A , który jest najlepszym substratem, enzym katalizuje defosforylację innych p_4N i p_5A . Przyjmując szybkość degradacji 0,5 mM p_4A za 100, inne substraty zbadane przy tym samym stężeniu ulegały hydrolizie z następującymi szybkościami: p_4I , 53; p_4dA , 76; p_4dI , 38; p_4G , 76; p_4C , 28; p_4U , 51 i p_4m^7G , 14.

Substratem jest też P_3 , ale nie PP_i czy P_4 . Aktywność dwuwartościowych kationów, które są niezbędne dla katalizowanej defosforylacji p_4A układu się następu-

jąco: $\text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$. Optimum pH wypada między 6,8 a 7,2, a K_m dla p_4A wynosi $50 \mu\text{M}$.

7. p_4A jako inhibitor

Nukleozydo-5'-tetrafosforany okazały się silnymi inhibitorami konkurencyjnymi asymetrycznie działających hydrolaz dinukleozydotetrafosforanów (EC 3.6.1.17) (8,43,58-60). (Stałe hamowania K_i ujęto w tabeli 1; najniższe z nich dochodzą do 10^{-9} M). Zjawisko wykorzystano do oczyszczania tych hydrolaz z różnych organizmów. Z barwnych, niebieskich lub czerwonych, żeli agarozowych wymywano zaadsorbowane enzymy mieszaniną p_4A i Mg^{2+} . Taka elucja powinowactwa pozwalała uzyskać preparaty jednorodnie elektroforetycznie (61-65). Pionierami w stosowaniu tej metody byli Maria Jesus Costas i wsp. (61), którzy na żelach Cibacron Blue F3G-A-Sepharose 4B lub Reactive Blue 2-Sepharose CL-6B oczyścili enzym z wątroby szczura wymywając go $10 \mu\text{M}$ p_4A w obecności $5 \mu\text{M}$ MgCl_2 .

Tabela 1

Nukleozydo-5'-tetrafosforany jako inhibitory asymetrycznie działających hydrolaz Ap_4A (EC 3.6.1.17)

Źródło enzymu	p_4N	K_i (nM)	Substrat	Literatura
jaja krewetki <i>Artemia salina</i>	p_4A	130	Gp_4G	(58)
	p_4G	6	Gp_4G	(58)
	p_4A	137	Ap_4A	(60)
	p_4G	13	Ap_4A	(60)
wątroba szczura	p_4A	48	Ap_4A	(59)
	p_4G	14	Ap_4A	(59)
	p_4A	18	Gp_4G	(60)
	p_4G	13	Gp_4G	(60)
komórki guza Ehrlicha	p_4A	30	Ap_4A	(8)
	p_4G	20	Ap_4A	(8)
	p_4U	37	Ap_4A	(8)
	p_4A	12	Gp_4G	(8)
	p_4G	6	Gp_4G	(8)
	p_4U	2	Gp_4G	(8)
latarenki świetlika <i>Photinus pyralis</i>	p_4A	7,5	Ap_4A	(64)
śluzówka jelita cienkiego świni	p_4A	10	Ap_4A	(65)
obleniec <i>Caenorhabditis elegans</i>	p_4A	10	Ap_4A	(43)

Innym enzymem hamowanym przez p_4A i p_4G jest rozpuszczalna cyklaza guanylanowa z różnych tkanek szczura, świnki morskiej i myszy. Wartości K_i wyznaczone

dla p_4A i p_4G w reakcji katalizowanej przez enzym z płuc szczura wynosiły, odpowiednio, $1 \mu M$ i $2,5 \mu M$ (66).

8. Fizjologiczne efekty wywierane przez p_4A

Obecność p_4A w tkance mięśniowej i w gęstych granulach trombocytów i komórek chromafinowych kory nadnercza skłoniły badaczy ewentualnych efektów fizjologicznych wywieranych przez ten nukleotyd do badania białek mięśni, naczyń krwionośnych i układu nerwowego. W rozdziale tym streszczamy wyniki uzyskane w toku tych badań.

Preparaty miozyny (67), które wykazują aktywność ATP-azową wyizolowane z serca psa i mięśni szkieletowych królika katalizowały hydrolizę p_4A do ADP i 2 reszt P_i . W trakcie tej reakcji, jako pierwszy produkt defosforylacji powstawał zapewne ATP, ale w związku z tym, że podlegał on sprawniejszej defosforylacji niż p_4A , nie obserwowano jego nagromadzenia się. Tak jak w przypadku hydrolizowania ATP, maksymalną aktywność degradacji p_4A obserwowano w obecności jonów wapniowych. Aktywność ATP-azy wyizolowana z mięśni królika i karpia hydrolizowała p_4A z niewielką szybkością; 40-krotnie wolniejszą niż zmierzona podczas hydrolizowania ATP. Stosując ultrawiwowanie analityczne wykazano, że niskie stężenie p_4A wywoływało rozbieżność aktomiozyny z mięśni karpia na aktyne i miozynę. To rozbieżność nie było spowodowane ani domieszką ATP w preparacie p_4A ani pewną ilością ATP jaka tworzyła się z p_4A w trakcie trwania eksperymentu.

Podczas badania naczyń krwionośnych zaobserwowano oddziaływanie p_4A z receptorami purynowymi; i to zarówno metabotropowymi ($P2Y$) jak i jonotropowymi ($P2X$) (68-70).

Poprzez rozluźnienie naczyń, za pośrednictwem receptorów $P2Y$, które znajdują się na komórkach śródbłonna, p_4A obniża ciśnienie krwi. Jednak w pewnych warunkach, np. podczas krwotoku, działając poprzez receptory $P2X$ mięśni gładkich, p_4A powoduje skurcz naczyń. Działa przy tym mocniej na te receptory niż ATP (71). Podobne efekty opisano dla nasieniowodów świnki morskiej (72) i szczura (68). Zewnątrzkomórkowa aktywność p_4A ustaje, gdy ektonukleotydu przekształca go w inne mononukleotydy adeninowe. Warto tu zaznaczyć, że p_4A jest mniej podatny na hydrolizę katalizowaną przez te enzymy niż ATP, dzięki czemu efekt działania p_4A na receptory trwa dłużej niż efekt wywierany przez ATP (73). Wspomniana dwistość efektów wywieranych przez p_4A na naczynia krwionośne, w zależności od ich napięcia, sugeruje, że nukleotyd ten może odgrywać znaczącą rolę w fizjologicznej regulacji stanu naczyń (71).

W związku z tym, że p_4A został zidentyfikowany w granulach chromafinowych i w środowisku na zewnątrz komórek chromafinowych, gdzie może pojawiać się w wyniku działania enzymów hydrolizujących Ap_5A (74), postanowiono zbadać czy p_4A może działać na receptory purynowe w zakończeniach synaptycznych. Mode-

lem w tych badaniach były synaptosomy wyizolowane ze śródmózgowia szczura (75). Wykazano, że p_4A jest tam agonistą receptorów P2. Wskaźnikiem działania p_4A i innych efektorów był pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych. p_4A podany zewnątrzkomórkowo, w obecności jonów wapniowych, powodował wzrost stężenia Ca^{2+} w komórkach. W pewnym zakresie pobór Ca^{2+} zależał od stężenia p_4A . p_4A działał poprzez receptory ATP (P2X), a nie przez receptory dla diadenozynopolifosforanów, bowiem efekt wywierany przez p_4A był znoszony przez ATP, lecz nie przez Ap_5A . Takie związki antagonistyczne dla receptorów purynowych P2 jak suramina czy PPADS, kwas fosforanopirydoksalo-6-azafenylo-2',4'-disulfonowy, blokowały efekty wywierane przez p_4A . Również przy okazji tych badań wykazano, że p_4A był dużo bardziej oporny na hydrolizę katalizowaną przez ektonukleotydyazy synaptosomów niż ATP. Po 2 minutach, z podanej porcji 0,1 mM p_4A hydrolizowało tylko 2%, podczas gdy z takiej samej ilości ATP hydrolizie uległo aż 75%.

9. Perspektywy i spekulacje

Na podstawie tej monografii wynika, że aktualna wiedza o biochemii p_4A jest bardzo skromna. Nowych impulsów do badań biologicznej roli p_4A może przysporzyć oczyszczenie hydrolazy p_4A człowieka i znalezienie kodującego ją genu. Interesujące będzie też ustalenie poziomu tego enzymu w poszczególnych tkankach i jego lokalizacji w komórkach. Na razie, najmocniejszym argumentem za tym, że p_4A , a może też inne p_4N , pełnią jakieś funkcje biologiczne jest utrwalona przez ewolucję zdolność do syntezy w komórkach eukariotycznych swoistej hydrolazy p_4A , która może kontrolować poziom tego nukleotydu. Czyżby rola tak swoistego enzymu miała się sprowadzać tylko do usuwania związku, który pojawia się „omyłkowo”, aby nie konkurował w ważnych reakcjach z ATP? Spekulować można też na temat istnienia w komórkach swoistych „kinaz”, które wykorzystują jako ko-substrat właśnie p_4A i przenoszą jego skrajną grupę fosforanową na jakiś akceptor; np. białkowy. Pomocne w rozstrzygnięciu tego byłoby zsyntetyzowanie $[\delta-^{32}P]p_4A$ i uzyskanie swoistego obrazu elektroforetycznego ufosforylowanych białek. Wreszcie, użyteczne dla badania zarówno mechanizmu reakcji katalizowanych przez hydrolazy p_4A jak i funkcji fizjologicznych będzie wyprodukowanie różnych analogów substratu.

Praca finansowana była z tematu 81-5, prowadzonego w ramach badań statutowych, i tematu 198/R/81/W, dotyczącego badań własnych Katedry.

Literatura

1. Marrian D. H., (1953), *Biochim. Biophys. Acta*, 12, 492.
2. Marrian D. H., (1954), *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 278-281.
3. Sacks J., (1955), *Biochim. Biophys. Acta*, 16, 436.

4. Lieberman I., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3373-3375.
5. Liébecq C., Degueldre-Guillaume M-J., (1968), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 495-501.
6. Gardner J. A., Hoagland M. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 1244-1246.
7. Moreno A., Vallejo C. G., Sillero A., (1975), *Analyt. Biochem.*, 68, 648-650.
8. Moreno A., Lobatón C. D., Günther Sillero M. A., Sillero A., (1982), *Int. J. Biochem.*, 14, 629-634.
9. Costas M. J., Cameselle J. C., Günther Sillero M. A., Sillero A., (1983), *Anal. Biochem.*, 134, 455-458.
10. McLennan A. G., (2000), *Pharmacol. Ther.*, 87, 73-89.
11. Verheyden A., Wehrli W. E., Moffatt J. G., (1965), *L. Am. Chem. Soc.*, 87, 2257-2265.
12. Heldt H. W., Klingenberg M., (1965), *Biochem. Z.*, 343, 433-451.
13. Small G. D., Cooper C., (1966), *Biochemistry*, 5, 26-33.
14. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., (1968), *Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in Mammalian Cells*, Eds. San Pietro A., Lamborg M. R., Kenney P. T., 3-16, Academic Press Inc., New York.
15. Jakubowski H., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2378-2382.
16. Günther Sillero M. A., Del Valle M., Zaera E., Michelena P., García A. G., Sillero A., (1994), *Biochimie*, 76, 404-409.
17. Guranowski A., Günther Sillero M. A., Sillero A., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 2986-2990.
18. Manandhar M. S. P., van Dyke K., (1974), *Analyt. Biochem.*, 58, 368-375.
19. van Dyke K., Robinson R., Urquilla P., Smith D., Taylor M., Trush M., Wilson M., (1977), *Pharmacology*, 15, 377-391.
20. Gualix J., Abal M., Pintor J., Miras-Portugal M. T., (1996), *FEBS Lett.*, 391, 195-198.
21. Lee J. W., Jeon S. J., Kong I. D., Jeong S. W., (1995), *Korean J. Physiol.*, 29, 217-223.
22. Kuprianov V. V., Ferretti J. A., Balaban R. S., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, 869, 107-111.
23. Luo G-X., Nishimura J. S., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 9516-9520.
24. Bouhss A., Dementin S., van Heijenoort J., Parquet C., Blanot D., (1999), *FEBS Lett.*, 453, 15-19.
25. Ortiz B., Sillero A., Günther Sillero M. A., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 212, 263-270.
26. Fontes R., Günther Sillero M. A., Sillero A., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 3152-3158.
27. Dieckmann R., Pavela-Vrancic M., von Döhren H., (2001), *Biochim. Biophys. Acta*, 1546, 234-241.
28. Pietrowska-Borek M., Stuble H-P., Kombrink E., Guranowski A., (2001), XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, streszczenia, 78.
29. Madrid O., Atencia E. A., Sillero A., Günther Sillero M. A., (1998), *FEBS Lett.*, 433, 283-286.
30. Atencia E. A., Madrid O., Günther Sillero M. A., Sillero A., (1999), *Eur. J. Biochem.*, 261, 802-811.
31. Mateo J., Miras-Portugal M. T., Rotllán P., (1997), *Am. J. Physiol.*, 273, C918-C927.
32. Mateo J., Rotllán P., Martí E., Gomez de Aranda I., Solsona C., Miras-Portugal M. T., (1997), *Biochem. J.*, 323, 677-684.
33. Garrison P. N., Roberson G. M., Culver C. A., Barnes L. D., (1982), *Biochemistry*, 21, 6129-6133.
34. Plateau P., Frommant M., Brevet A., Gesquière A., Blanquet S., (1985), *Biochemistry*, 24, 914-922.
35. Guranowski A., Blanquet S., (1985), *J. Biol. Chem.*, 260, 3542-3547.
36. Barnes L. D., Garrison P. N., Siphshvili Z., Guranowski A., Robinson A. K., Ingram S. W., Croce C. M., Ohta M., Huebner K., (1996), *Biochemistry*, 35, 11529-11535.
37. Cartwright J. L., McLennan A. G., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 8604-8610.
38. Ingram S. W., Stratemann S. A., Barnes L. D., (1999), *Biochemistry*, 38, 3649-3655.
39. Guranowski A., Starzyńska E., Rataj-Guranowska M., Günther Sillero M. A., (1991), *Protein Expression Purif.*, 2, 235-239.
40. Guranowski A., Starzyńska E., Günther Sillero M. A., Sillero A., (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, 1243, 78-84.
41. Jakubowski H., Guranowski A., (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 9982-9989.
42. Cartwright J. L., Britton Ph., Minnick M. F., McLennan A. G., (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256, 474-479.
43. Abdelghany H. M., Gasmi L., Cartwright J. L., Bailey S., Rafferty J. B., McLennan G., (2001), *Biochim. Biophys. Acta*, 1550, 27-36.
44. Cartwright J. L., Safrany S. T., Dixon L. K., Darzynkiewicz E., Stepinski J., Burke R., McLennan A. G., (2002), *J. Virology*, 76, 1415-1421.

45. Guranowski A., Brown P., Ashton P. A., Blackburn G. M., (1994), *Biochemistry*, 33, 235-240.
46. Guranowski A., Jakubowski H., Holler E., (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 14784-14789.
47. Guranowski A., Robinson A. K., (1996), *FASEB J.*, 10, 1105.
48. Guranowski A., Starzyńska E., Barnes L. D., Robinson A. K., Liu Sh., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1380, 232-238.
49. Kulakovskaya T. V., Andreeva I. S., Kulaev I. S., (1997), *Biokhimiya*, 62, 1225-1227.
50. Andreeva N. A., Kulakovskaya T. V., Kulaev I. S., (1998), *FEBS Lett.*, 429, 194-196.
51. Small G. D., Cooper C., (1966), *Biochemistry*, 5, 14-26.
52. Pietrowska-Borek M., Szalata M., Guranowski A., (1999), *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 4, 439.
53. Guranowski A., Starzyńska E., Brown P., Blackburn G. M., (1997), *Biochem. J.*, 328, 257-262.
54. Maksel D., Guranowski A., Ilgoutz S. C., Moir A., Blackburn G. M., Gayler K. R., (1998), *Biochem. J.*, 329, 313-319.
55. Guranowski A., (2000), *Pharmacol. Ther.*, 87, 117-139.
56. Guranowski A., Just G., Holler E., Jakubowski H., (1988), *Biochemistry*, 27, 2959-2964.
57. Wurst H., Kornberg A., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 10996-11001.
58. Vallejo C. G., Sillero M. A. G., Sillero A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, 358, 117-125.
59. Lobatón C. D., Vallejo C. G., Sillero A., Sillero M. A. G., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 50, 495-501.
60. Vallejo C. G., Lobatón C. D., Quintanilla M., Sillero A., Sillero M. A. G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, 438, 304-309.
61. Costas M. J., Pinto R. M., Fernández A., Canales J., García-Agúndez J. A., Cameselle J. C., (1990), *J. Biochem. Biophys. Methods*, 21, 25-33.
62. Pinto R. M., Costas M. J., Fernández A., Canales J., García-Agúndez J. A., Cameselle J. C., (1991), *FEBS Lett.*, 287, 85-88.
63. Łażewska D., Starzyńska E., Guranowski A., (1993), *Protein Expr. Purif.*, 4, 45-51.
64. McLennan A. G., Mayers E., Walker-Smith I., Chen H., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 3706-3709.
65. Hankin S., Winterø A. K., McLennan A. G., (1997), *Int. J. Biochem.*, 29, 317-323.
66. Ignarro L. J., Gross R. A., Gross D. M., (1976), *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 2, 337-346.
67. Winand-Devigne J., Hamoir G., Liébecq C., (1967), *Eur. J. Biochem.*, 1, 29-32.
68. Taylor D. A., Wiese S., Faison E. P., Yarbrough G. G., (1983), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 224, 40-45.
69. Abbracchio M. P., Burnstock G., (1994), *Pharmacol. Ther.*, 64, 445-475.
70. Burnstock G., King B. F., (1996), *Drug Dev. Res.*, 38, 67-71.
71. Lee J. W., Kong I. D., Park K. S., Jeong S. W., (1995), *Yonsei Med. J.*, 36, 487-496.
72. Bailey S. J., Hourani S. M., (1995), *Brit. J. Pharmacol.*, 114, 1125-1132.
73. Hourani S. M., Bailey S. J., Johnnosn C. R., Tennant J. P., (1998), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 358, 464-473.
74. Rodríguez-Pascual F., Torres M., Rotlán P., (1992), *Arch. Biochem. Biophys.*, 297, 176-183.
75. Gómez-Villafuertes R., Gualix J., Miras-Portugal M. T., Pintor J., (2000), *Neuropharmacol.*, 39, 2381-2390.