

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

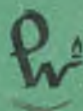
Postępy Biochemii

POSTBAH 34 (3)
(121-236) (1988)

1988

tom 34 nr 3

PL ISSN 0032-5422



PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich 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 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. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 25 odbitek swego artykułu: zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

Forma maszynopisu: maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, czcionką wielkości standardowej, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm. po lewej i ok. 1 cm. po prawej stronie. Maszynopis powinien zawierać (zgodnie z Normą Polską) nie więcej niż 30 wierszy na stronie oraz 60 znaków w jednym wierszu (co odpowiada sumie liter i odstępów). Odstępy pomiędzy wyrazami powinny odpowiadać jednemu znakowi. Wydawnictwo nie przyjmuje wydruków komputerowych z czcionką obcą, drobną i sporządzoną linią punktową.

Układ maszynopisu: strona informacyjna nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko(a) autora (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) i jego (ich) miejsce (a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy, piśmiennictwa, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin.

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 rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. 1-1). 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 zwracanie szczególnej uwagi na poprawość językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz niewprowadzanie do tekstu

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 34 ZESZYT 3

1988

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 34 (3)
(121-256) (1988)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: M. Gumińska (*Kraków*)
Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (*Warszawa*)
Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (*Warszawa*)
Członkowie: T. Chojnacki (*Warszawa*), M. Chorąży (*Gliwice*), M. Fikus (*Warszawa*), E. Gąsior (*Lublin*), W. Jachymczyk (*Warszawa*), A. Jerzmanowski (*Warszawa*), W. Korohoda (*Kraków*), W.J. Krzyżosiak (*Poznań*), J. Kwiatkowska (*Wrocław*), J. Kączkowski (*Warszawa*), E. Lisowska (*Wrocław*), S. Maleszewski (*Warszawa*), G. Palamarczyk (*Warszawa*), K. Raczyńska-Bojanowska (*Warszawa*), I. Siemion (*Wrocław*), L. Wojtczak (*Warszawa*), B. Wielgat (*Warszawa*), A. Taylor (*Gdynia*), J. Zborowski (*Warszawa*), Z. Zielińska (*Warszawa*)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 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, 02-809 Warszawa

SEKRETARZ REDAKCJI

M. Szyszko

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

CZŁONKOWIE REDAKCJI:

B. Czartoryska (*Warszawa*), M. Garstka (*Warszawa*)
B. Kamińska (*Warszawa*), J. Skangiel-Kramska (*Warszawa*)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1988

Nakład 1800 (1702 + 98)	Oddano do składania 29.IV.1988 r.
Ark. wyd. 11,5, ark. druk. 8,5	Podpisano do druku w lutym 1989 r.
Papier offset. kl. III, 70 g 70 × 100	Druk ukończono w kwietniu 1989 r.
Zam. nr 6483/12/88	Cena zł 180,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

JANINA KWIATKOWSKA*

Białka G jako „uniwersalny łącznik” w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы — *Minireview*

G proteins as „universal connection” in signal transmission from the membrane receptors on their effectors. — *Minireview*

Procesy metaboliczne, wzrost, różnicowanie i funkcje fizjologiczne komórek zwierzęcych podlegają wewnątrzkomórkowej oraz „zdalnie sterowanej” regulacji. Regulatorami „lokalnymi” są przejściowe i końcowe metabolity, koenzymy, jony i inne substancje drobnocząsteczkowe. Zależnie od ich stężenia zachodzi modulacja aktywności enzymów allosterycznych, funkcji białek transportowych, kurczliwych i innych. Dzięki temu ciągi przemian oraz funkcje fizjologiczne dostosowują się szybko do aktualnych warunków panujących w komórce.

Regulacja „zdalnie sterowana” odbywa się za pomocą sygnałów chemicznych i fizycznych: hormonów, neuromediatorów, czynników wzrostowych, kwantów świetlnych itp. W wielu przypadkach substancje sygnałowe i czynniki fizyczne działają jedynie na powierzchnię komórki, wiążąc się lub okazując wpływ na swoiste receptory i nie wnikają do błony ani cytoplazmy. Sygnał odbierany przez receptor jest następnie przekazywany na efektor docelowy lub pośredni. Za efektor docelowy można uważać kanały jonowe i translokazy, a skutkiem ich działania jest zmiana stężenia jonów i innych substancji drobnocząsteczkowych w komórce, co pociąga za sobą określony efekt biologiczny.

Efektory pośrednie są to enzymy, syntezujące lub rozkładające substancje chemiczne, spełniające funkcję przekaźników wtórnych. Z kolei te ostatnie przenoszą informację do różnych części komórki, pobudzając lub hamując aktywność enzymów, zmieniając przepuszczalność błon, regulując wewnątrzkomórkowe stężenie jonów itp. Do powszechnie występujących efektorów pośrednich, przekazujących sygnały odbierane przez receptory licznych substancji czynnych zaliczamy:

- a) cykazy adenylanową i guanylanową, syntetyzujące cAMP i cGMP. Oba wtórne przekaźniki aktywują kinazy białkowe, odpowiednio A i G;
- b) fosfolipazę C, hydrolizującą inozytlofosfatydy z utworzeniem dwu przekaźników wtórnych: trisfosfoinozytolu, mobilizującego jony wapnia w komórce oraz diacyloglicerolu, aktywatora kinazy białkowej C;

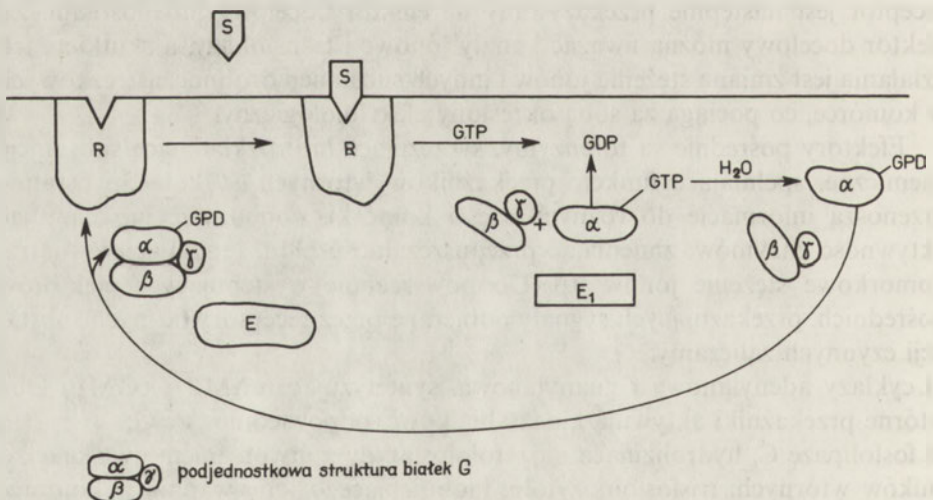
*Prof. dr hab., Zakład Biochemii AM, ul. Chalubińskiego 10, 50-368 Wrocław

- c) fosfodiestrą cyklicznego GMP, efektor rodopsyny. Aktywacja rodopsyny przez światło powoduje rozkład cGMP, co jest niezbędnym elementem powstania hyperpolaryzacji błony pręcików siatkówki i procesu widzenia;
- d) fosfolipazę A_2 , uwalniającą arachidonian z fosfolipidów i w tym samym rozpoczynającą syntezę prostaglandyn.

We wszystkich wymienionych układach rolę łącznika między receptorem a efektem spełniają białka G (dawniej zwane też białkami N). Występują one w kilku formach molekularnych o jednakowej strukturze podjednostkowej, podobnej budowie pierwszorzędowej i odmiennej swoistości funkcjonalnej (1-5). Białka G sprzęgają też receptory z ich docelowymi efektorami, między innymi — kanałami potasowymi i wapniowymi (6, 7).

Białka G należą do rodziny homologicznych, wielopodjednostkowych białek wiążących i hydrolizujących GTP. Zalicza się do niej czynniki elongacji EF-T_v, uczestniczące w syntezie białka, białka *ras*, jak np białka p21, produkty onkogenu *ras* u ssaków i drożdżowe białka RAS, a także tzw białka pokrewne *ras*, między innymi *R-ras* i *rho* u ludzi, *ral* u małp itp [1, 8].

W stanie niepobudzonym podjednostka α białek G wiąże się silnie z GDP. Przekazanie sygnału z receptora na efektor odbywa się drogą następującej sekwencji wydarzeń: po stymulacji receptora, GDP zostaje wyparty z miejsca wiążącego w pojednostce i zastąpiony przez GTP. Pociąga to za sobą zmianę konformacji i dysocjację białka G na wolną podjednostkę α i kompleks β/γ , a w następstwie — modulację efektora. Modulacja ta jest krótkotrwała, gdyż podjednostka α ma aktywność GTPazową. Hydroliza GTP prowadzi do reasocjacji podjednostek białka G i powrotu do stanu wyjściowego [1, 9]. Schemat działania białek G przedstawia Ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat działania białka G. S — sygnał chemiczny lub fizyczny; R — receptor; E — efektor; E' — efektor po modulacji.

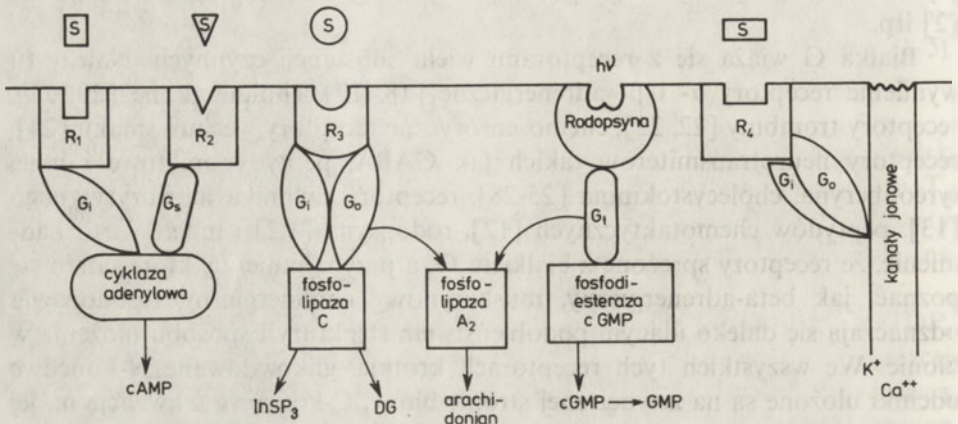
Białka G są niezbędnymi mediatorami tak ważnych i różnorodnych procesów biologicznych jak wzrost i proliferacja komórek, przewodzenie nerwowe, widzenie, smak, węch, synteza białka, sekrecja, metabolizm cukrów, tłuszczów, aminokwasów itp. Istnienie białek G wykazano w wielu tkankach i narządach, między innymi w wątrobie, erytrocytach, mięśniu serca [1, 10], tkance tłuszczowej [11], leukocytach [4, 5, 12], aortalii [13], mózgu [10, 14], trzustce [15], płytkach krwi [16], łożysku [17], zewnętrznych segmentach pręcików siatkówki [2] itp.

Białka G wiążą się z receptorami wielu substancji czynnych. Należy tu wymienić receptory α - i β - adrenergiczne [18, 19], cholinergiczne [20, 21], receptory trombiny [22, 23], chemosensoryczne receptory węchu i smaku [24], receptory neurotransmiterów takich jak GABA, peptydy opiatowe i inne, tyreoliberyna, cholecystokinina [25-28], receptory czynnika natriurytycznego [13], peptydów chemotaktycznych [12], rodopsyna [1,2] i inne. Warto nadmienić, że receptory sprzężone z białkiem G, a przynajmniej te, które udało się poznać, jak beta-adrenergiczny, muskarynowy cholinergiczny i rodopsyna odznaczają się daleko idącym podobieństwem struktury i sposobu ułożenia w błonie. We wszystkich tych receptorach krótkie, glikozylowane N-końcowe odcinki ułożone są na zewnętrznej stronie błony, C-końcowe sekwencje na jej powierzchni cytoplazmatycznej, zaś siedem hydrofobowych pętli ma położenie transemembranowe. Uważa się, że C-terminalny odcinek, łączący po cytoplazmatycznej stronie pętle transemembranowe, oddziałuje z białkami G. C-końiec odznacza się daleko idącym konserwatywnością i homologią budowy we wszystkich poznanych receptorach [29].

Do znacznego postępu w badaniach nad białkami G przyczyniło się znalezienie odpowiedniego instrumentu badawczego. Okazało się mianowicie, że inhibitorami białek G są toksyny bakteryjne, pochodzące z *Vibrio cholerae* i *Bordetella pertussis*. Ta ostatnia znana jest jako IAP — czynnik aktywujący wysepki. W obecności NAD toksyny te katalizują ADP-rybozylację podjednostki α w białkach G. Rybozylacja podjednostki α zachodzi jednak jedynie w jej połączeniu z β i γ . Rybozylacja uniemożliwia oddziaływanie białek G z receptorami i odbiór sygnałów. Jak się wydaje, nie pozbawia ona jednak białek G ich zdolności wiązania i hydrolizy nukleotydów guaninowych [21]. Naturalne substraty toksyny *pertussis* uważa się za tożsame z białkami G, a fakt blokowania jakiegoś efektu biologicznego przez tę toksynę — za potwierdzenie udziału białek G w danym procesie. Stosując znakowany NAD można w obecności toksyny *pertussis* łatwo zlokalizować białka G w całych komórkach, nietkniętych błonach, a także w trakcie preparowania, oczyszczania, na elektroforegramach itp [16].

Stosując biochemiczne metody wydzielenia białek, techniki immunologiczne oraz klonowanie genów wykazano istnienie kilku homologicznych białek G. Do dobrze zdefiniowanych należą: G_s , G_i , G_o i G_r . Białko G_s uczestniczy w aktywacji cykazy adenylanowej, G_r — w jej hamowaniu [1]. G_r okazało się tożsame z

transducyną, sprzęgającą rodopsynę z fosfodiesterazą cGMP [30] oraz z fosfolipazą A_2 [2]. Białko G_o przekazuje sygnały z muskarynowego receptora acetylocholin na kanały potasowe [20] oraz z receptorów neurotransmiterów, np GABA na odpowiednie efekторы [14, 17]. Jak się wydaje, w modulowaniu fosfolipazy C uczestniczy zarówno białko G_i jak i G_o [3, 4, 22, 24]. Udział wymienionych białek G w różnych układach regulacyjnych przedstawia schemat



Ryc. 2. Udział białek G w układach regulacyjnych. S — sygnał chemiczny; R — receptor; $InsP_3$ — inozytolo-1,4,5-trifosforan; DG — diacyloglicerol.

2. Białka uczestniczące w transmisji sygnałów podlegają modyfikacji kowalencyjnej. Coraz więcej danych wskazuje na to, że tak receptory jak i białka G mogą ulegać metylacji, acetylacji i fosforylacji. W fosforylacji uczestniczą kinazy tyrozynowe i kinaza białkowa C. Procesy te mogą przyczynić się do wyboru właściwego białka efektorowego przez białka G, hamowania lub nasilenia odpowiedzi komórkowej na sygnały.

Wszystkie znane białka G są związane z błoną. Izolowanie białek G_s , G_i i G_o wymaga detergentów. Białka te uważano za błonowe integralne, choć obecnie pogląd ten ulega zmianie. Chabre uważa, że jedynie receptory są białkami transmembranowymi, natomiast białka G należą do peryferyjnych i oddziałują z cytoplazmatycznymi domenami receptorów [31]. Pogląd ten jest zgodny z wynikami badań nad strukturą receptorów [29]. Białko G_i jest bardzo słabo związane z błoną, łatwo wydziela się za pomocą soli z zewnętrznych segmentów błony siatkówki i zawsze uważano je za białko peryferyjne [14].

Pierwszorzędowa struktura różnych typów białek G jest bardzo podobna. G_i , G_o i G_i cechuje pokrewieństwo immunologiczne i funkcjonalne, większe zaś różnice występują między nimi a G_s . Receptor α -adrenergiczny łączy się zarówno z G_i jak i G_o , a jedynie bardzo słabo reaguje z G_s . Rodopsyna reaguje z G_o równie sprawnie jak z G_i . W błonach neuronów, potraktowanych toksyną *pertussis*, β -receptory GABA tracą zdolność odbierania sygnałów, a przywraca ją dodanie do układu białek G_i lub G_o [25]. Działanie różnych białek G nie jest jednak

nawet w przypadku podobieństwa identyczne. I tak np muskarynowy receptor cholinergiczny osadzony na liposomach reaguje zarówno z G_o jak i z G_i , zachowując zdolność wiązania karbacholu (agonisty). Jednak czas upływający od związania karbacholu do dysocjacji białka G i hydrolizy GTP jest w obu przypadkach różny [21].

Ostatnio napływa coraz więcej doniesień o występowaniu białek G odmiennych od wyżej opisanych. Należy tu wymienić G_p , regulujące wiązanie tyreoliberyny przez receptor i aktywację lipazy C [27], G_{LH} wydzielone i wstępnie zcharakteryzowane z różnicujących się leukocytów ludzkich [5], „nowe” białka G znalezione w obojętnochłonnych granulocytach [32], erytrocytach, wątrobie i innych tkankach [33].

Wszystkie znane białka G są heterotrimerami i składają się z podjednostek α , β i γ . Podjednostki α poszczególnych typów białek G różnią się między sobą budową pierwszorzędową, odznaczając się jednak znaczną homologią strukturalną. Stosując techniki klonowania molekularnego wykazano, że każdy z typów podjednostek α : α_s , α_i i α_o występuje conajmniej w dwu, a α_i — w trzech formach molekularnych [1, 34, 35]. Masa cząsteczkowa α_s wynosi według Cerione i wsp. 42-45 kDa, [18], według Kurose i wsp. — 45 kDa [21]; α_i z adipocytów — 40-42 kDa [11], z aorty — 40 kDa [13], z mózgu — 41 kDa [20]; α_o z mózgu — 39 kDa [21]; α_{HL} z leukocytów — 40 kDa [5]; „nowego” erytrocytarnego białka G — 43 kDa [33]. Względna masę cząsteczkową podjednostki α z transducyny (α_t) podaje się jako 39 000 [20] lub 40 000 [36]; wyliczona ze składu aminokwasowego wynosi ona 39 945 Da. [30].

Podjednostki α odgrywają istotną rolę w mechanizmie działania białek G. W nich to mieści się obszar wiązania receptora, centrum wiążące nukleotydy guaninowe o aktywności GTPazowej, a w niektórych typach białek G — także obszar wiązania efektora. Na podstawie sekwencji aminokwasowej i danych o strukturze wtórnej transducyny Hingorani i Ho przedstawili model budowy α_t . Określili oni położenie trzech domen funkcjonalnych tego białka. Domena 1, wiążąca nukleotydy guaninowe składa się z 157 reszt aminokwasowych. Liczba odcinków o strukturze beta równoległej i beta-skrętów jest w domenie 1 identyczna jak w domenie wiązania GTP w białku EF- T_u . Domena 2 służy wiązaniu efektora, fosfodiesterazy cGMP. Domena ta składa się z 127 reszt, a 8 odcinków antyrównoległej struktury beta przypomina budowę dysmutazy ponadtlenkowej. W domenie 3 mieści się obszar wiązania receptora (rodopsyny) oraz podjednostek β i γ . Domena ta ma charakter hydrofilny, wchodzi w nią N- i C-terminalne odcinki łańcucha polipeptydowego. Kompleks podjednostek β/γ wiąże się przy końcu C-końcu tej domeny [30]. Przewidywaną strukturę podjednostek α i ich domen funkcjonalnych G podają Masters i wsp. [37].

Jak widać z podanego modelu, podjednostka α transducyny łączy się bezpośrednio z efektozem. Przypuszcza się, że również α_s i α_i łączą się z cykłązą adenylanową, modulując bezpośrednio jej aktywność [38]. Przypuszczano, że oddziaływanie podjednostki z efektozem ma miejsce we wszystkich typach białek G. Zgodnie z ogólnie przyjętą hipotezą działania białek G sądzono, że przed

stymulacją receptora przez agonistę białko G wiąże się z efektozem. Interakcja receptora z odpowiednią substancją czynną powoduje przyłączenie białka G do receptora, co pociąga za sobą wyparcie GDP z podjednostki α przez GTP oraz dysocjację podjednostek. Wolna podjednostka α łączy się wówczas z efektozem i moduluje jego aktywność. Po hydrolizie GTP, z podjednostką α łączy się podjednostki β i γ i w ten sposób białko G pozostaje w kompleksie z efektozem [38]. Hipoteza ta nie jest jednak uniwersalna, okazało się bowiem, że modulatorem efektora może być kompleks podjednostek β/γ . Kompleks ten łączy się z kanałem potasowym mięśnia serca po pobudzeniu receptora muskarynowego przez acetylocholinę. Wykazano to bezpośrednio w układach wydzielonych. Do błony komórkowej, zawierającej receptory i kanały potasowe dodawano oczyszczone podjednostki białka G, wykazując, że jedynie kompleks β/γ powoduje otwarcie kanałów potasowych po stymulacji receptora przez acetylocholinę [39]. Przypuszcza się, kompleks β/γ może być aktywatorem fosfolipaz C i A_2 oraz modulatorem „obojętnych” kanałów wapniowych [6, 39]. Nie jest też wcale pewne, czy w stanie niepobudzonym białko G wiąże się z efektozem, czy receptorem. Zachodzi więc możliwość, że o ile odbiór sygnału z receptora, wiązanie i hydroliza GTP zależą od podjednostki α , o tyle do modulacji efektora wykorzystywane są wszystkie podjednostki. Należy przy tym nadmienić, że w warunkach niedenaturujących podjednostki β i γ występują w kompleksie i są silnie ze sobą związane.

Początkowo sądzono, że kompleksowi β/γ przypada jedynie bierna rola w zakotwiczeniu białka G w błonie. Rolę taką gra ten kompleks z całą pewnością. Asocjuje on całkowicie z liposomami, podczas gdy podjednostka α łączy się z lipidami dopiero po osadzeniu w nich β/γ (14). Nie jest to jednak w żadnej mierze jedyna rola podjednostek β i γ w białku G. Kompleks β/γ uczestniczy w rozpoznawaniu receptora przez podjednostki α , wzmacnia też interakcję tych ostatnich z obszarami wiążącymi receptorów [14, 20, 35]. Wolnemu kompleksowi β/γ przypisuje się też ważne znaczenie w regulacji pobudzania receptora. Bokocho wyraża przypuszczenie, że wszystkie podjednostki β i γ , niezależnie od tego z jakich białek G pochodzą są funkcjonalnie identyczne. Wolny kompleks β/γ może łączyć się z podjednostkami α uwolnionymi z różnych białek G i tym samym nie dopuszczać do ich oddziaływania z efektozem. Decydujące znaczenie ma przy tym stopień powinowactwa kompleksu i różnych podjednostek α [12]. Zdaniem tego autora, a także Evansa i wsp., słabe działanie adrenaliny na cyklazę adenylanową w obojętnochłonnych leukocytach wiąże się z wysoką zawartością kompleksu β/γ w tych komórkach, i „wyłapywaniem” przezeń podjednostek α , uwalnianych pod wpływem hormonu [12, 17]. Kompleks β/γ jest też stabilizatorem podjednostek α , które chroni przed denaturacją i trawieniem [10].

Wielu autorów podaje, że podjednostki β białek G_s i G_i są strukturalnie identyczne i że ich względna masa cząsteczkowa wynosi 35 000 [8, 21]. Hildebrand i wsp. wydzielili podjednostki β z białek G_s i G_i erytrocytów ludzkich, mózgu wołu i żaby oraz z transducyny. Utrzymują oni, że mapy peptydowe wszystkich tych polipeptydów są nierozróżnialne, niezależnie od gatunku, tkanki

i typu białka G [40]. Inne doniesienia wskazują jednak, że podjednostka β transducyny o masie cząsteczkowej 36 kDa jest immunologicznie odmienna od podjednostek o masie 35 kDa [17]. Również w białkach G_o i G_{HI} znaleziono podjednostki β o masie cząsteczkowej 36 kDa [5].

Jak się wydaje, podjednostki γ białek G_s i G_i są identyczne, lub bardzo sobie bliskie. Ich masę cząsteczkową określa się na 5-7 kDa [18], 8 kDa [21], a nawet 11 kDa [20]. Podjednostka γ z G_i różni się od nich immunologicznie i strukturalnie [14, 36]. Obserwowano różnice map peptydowych podjednostek γ pochodzących z tkanek różnych gatunków zwierząt [40].

Ze względu na szczególną rolę białek G w procesach regulacji podjęto próby przesłedzenia ich zachowania się w różnicujących się komórkach 3T3- α_1 , które w ciągu 8 dni hodowli przechodzą z komórek o cechach fibroblastów w zróżnicowane adipocyty. Stwierdzono, że w ciągu tych 8 dni zawartość podjednostek α wzrasta w komórkach 8-krotnie, α_1 -4 krotnie, a zawartość β zaledwie dwukrotnie. Wydaje się, że w trakcie różnicowania komórek zmienia się stosunek podjednostek α do β [41].

Białka G zdają się być uniwersalnymi łącznikami i pośrednikami między receptorami błonowymi, odbierającym różnorodne sygnały chemiczne i fizyczne a białkami efektorowymi, takimi jak kanały jonowe, enzymy generujące przekaźniki wtórne itp. Odmienna struktura podjednostek różnych typów białek G pozwala na rozróżnianie receptorów i selekcjonowanie sygnałów. Zdolność różnych podjednostek do oddziaływania z efektorami daje dodatkowe możliwości sterowania różnymi rodzajami odpowiedzi komórkowej na bodźce. Specyficzność działania białek G może być regulowana drogą modyfikacji kowalencyjnej — fosforylacji, metylacji itp. Gospodarując nadzwyczaj oszczędnie, natura wykorzystuje uniwersalny mechanizm w różnych układach regulacyjnych. Niewielkie różnice strukturalne i modyfikacje białek pośredniczących pozwalają skierować sygnał odebrany przez receptor do różnych kanałów informacyjnych i uruchamiać różnorodne efekty biologiczne.

*Artykuł otrzymano 22 stycznia 1988 r.
Zaakceptowano do druku 9 lutego 1988 r.*

PIŚMIENICTWO

1. Bourne H. R., (1986), *Nature*, **321**, 814—816.
2. Jelsema C. L., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 163—168.
3. Paris S., Pouysségur J., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1970—1976.
4. Kikuchi A., Kozawa O., Kaibuchi K., Katada T., Ui M., Takai Y., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 19558—19562.
5. Oinuma M., Katada T., Ui M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 8347—8353.
6. Bourne H. R., (1987), *Nature*, **325**, 296—297.
7. Holz IV G. G., Rane S. G., Dunlop K., (1986), *Nature*, **319**, 670—672.
8. Michell B., Kirk Ch., (1986), *Nature*, **323**, 112—113.
9. Higashijmo T., Ferguson K. M., Smigel M. O., Gilman A. G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 757—761.

10. Katada T., Oinuma M., Ui M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 8182—8191.
11. Greenberg A.S., Taylor S.I., Londos C., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 4564—4568.
12. Bokoch G.M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 589—594.
13. Anand-Srivastava M.B., Srivastava A.K., Cantin M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 4931—4934.
14. Sternweis P.C., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 631—637.
15. Willems P.H., Tilly R.H.J., De Pont J.J., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **928**, 171—178.
16. Brass L.F., Laposta M., Banga H.S., Rittenhouse S.E., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 16838—16847.
17. Evans T., Fawzi A., Fraser E.D., Brown M.L., Northup J.K., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 176—181.
18. Cerione R.A., Regan J.W., Nakata H., Codina J., Benovic J.L., Gierschik P., Somers R.L., Spiegel A.M., Birnbaumer L., Lefkowitz R.J., Caron M.G., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 3901—3909.
19. Brand D.R., Ross E.M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1657—1664.
20. Florio V.A., Sternweis P.C., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 3477—3483.
21. Kurose H., Katada T., Haga T., Ichiyama A., Ui M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 6423—6428.
22. Murayama T., Ui M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7226—7233.
23. Paris S., Pouysségur J., (1986), *EMBO J.*, **5**, 55—60.
24. Bruch R.C., Kalinoski D.L., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2401—2404.
25. Asano T., Ui M., Ogasawa N., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12653—12658.
26. Kassis S., Olasmaa M., Terenius L., Fishman P.H., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3424—3431.
27. Aub D.L., Gosse M.E., Cote T.E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 9521—9528.
28. Martin Y.F.J., Lucas D.O., Bajjalich S.M., Kowalchuk J.A., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 2918—2927.
29. Dohlman H.G., Caron M.G., Lefkowitz R.J., (1987), *Biochemistry*, **26**, 2657—2664.
30. Hingorani V.N., Ho Y.K., (1987), *FEBS Lett.*, **220**, 15—22.
31. Chabre M., (1987), *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 213—215.
32. Dickey B.F., Pyun H.Y., Williamson K.C., Navarro J., (1987), *FEBS Lett.*, **219**, 289—292.
33. Iyengar R., Rich K.A., Herberg J.T., Grenet D., Mumby S., Codina J., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 9239—9245.
34. Didsbury J.R., Snyderman R., (1987), *FEBS Lett.*, **219**, 259—264.
35. Murphy P.M., Eide B., Goldsmith P., Braun M., Gierschik P., Spiegel A., Malech H.L., (1987), *FEBS Lett.*, **221**, 81—86.
36. Fung B.K., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 10495—10502.
37. Masters B., Stroud R.M., Bourne H.R., (1986), *Protein Engin.*, **1**, 47—54.
38. Pennington S.R., (1987), *Nature*, **327**, 188—189.
39. Logothetis D.E., Kurachi Y., Galper J., Neer E.J., Clapham D.E., (1987), *Nature*, **325**, 321—326.
40. Hildebrandt J.D., Codina J., Rosenthal W., Birnbaumer L., Neer E.J., Yamazaki A., Britensky M.W., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 14867—14872.
41. Watkins D.C., Northup J.K., Malbon C.C., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 10651—10657.

TERESA JAKUBOWICZ *

Mechanizm i znaczenie fosforylacji białka rybosomowego S6 u Eukaryota

Mechanism and function of ribosomal protein S6 phosphorylation in Eukaryotes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Charakterystyka białka S6
- III. Fosforylacja S6 in vivo
- IV. Udział kinaz fosfobiałkowych w fosforylacji S6 in vitro
 - IV-1 Fosforylacja białka S6 przez kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów
 - IV-2 Udział kinaz niezależnych od cyklicznych nukleotydów w fosforylacji S6
 - a) kinaza aktywowana drogą ograniczonej proteolizy PAK II
 - b) kinaza C
 - c) kinaza swoista dla białka S6 (kinaza S6)
- V. Mechanizm aktywacji kinazy S6
- VI. Rola białka S6 w regulacji translacji
- VII. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Characteristic of S6 protein
- III. S6 phosphorylation in vivo
- IV. Involvement of the phosphoprotein kinases in S6 phosphorylation in vitro
 - IV-1 Phosphorylation of S6 protein by cyclic nucleotide—dependent protein kinases
 - IV-2 Involvement of cyclic nucleotide— independent protein kinases in S6 phosphorylation
 - a) protein kinase activated by a limited proteolytic digestion PAK II
 - b) protein kinase C
 - c) protein kinase specific for protein S6 (S6 kinase)
- V. Mechanism of S6 kinase activation
- VI. Role of S6 protein in regulation of translation
- VII. Summary

* Dr, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

Wykaz stosowanych skrótów: eIF2, eIF3, eIF4B — eukariotyczne czynniki inicjujące 2, 3, 4B; EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy; PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostowy; FGF — fibroblastyczny czynnik wzrostowy; NGF — czynnik wzrostu nerwu; PGF 2 α — prostaglandyna F2 α ; RSV — wirus mięsaka Rousa; AbMu LV — wirus białaczki mysiej Abelsona; PRV — wirus rzekomej wścieklizny; ViPK — kinaza indukowana pod wpływem infekcji wirusem rzekomej wścieklizny.

I. Wstęp

Posttraslacyjna modyfikacja białek, poprzez złożone mechanizmy fosforylacji/defosforylacji, odgrywa istotną rolę w regulacji aktywności enzymów. Klasyycznym przykładem może być regulacja metabolizmu glikogenu poprzez odwracalną fosforylację syntazy czy fosforylasy glikogenu. Ten rodzaj modyfikacji odgrywa również rolę w biochemicznych procesach związanych ze skurczem mięśni, regulacją wzrostu, transportem przez błony plazmatyczne, w transformacji nowotworowej, transkrypcji i biosyntezie białka.

Jeśli chodzi o biosyntezę białka, zmiany w poziomie fosforylacji obserwowane są w przypadku wielu składników aparatu translacyjnego. Przykładem mogą być czynniki inicjujące eIF2, eIF3, eIF4B, kompleksy mRNP czy białka rybosomowe. Jednakże funkcjonalne znaczenie tej modyfikacji nie zostało dotąd w pełni wyjaśnione. Wyjątek stanowi układ z retikulocytów, w którym mechanizm jak również rola fosforylacji eIF2 zostały w dużym stopniu poznane [1, 2].

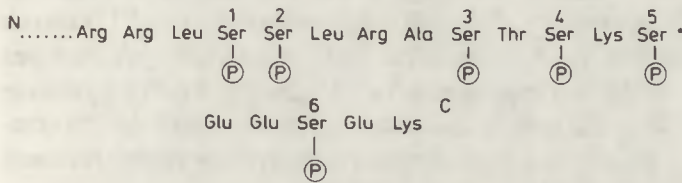
Substratami fosforylacji w komórkach *Eukaryota* są niektóre białka rybosomowe. Szczególne znaczenie odgrywa fosforylacja białka S6 mniejszej podjednostki rybosomu. Poziom fosforylacji tego białka ulega dynamicznym zmianom w zależności od warunków hodowli i fazy wzrostu organizmu. Do jego fosforylacji dochodzi w szybko rosnących komórkach wielu organizmów, w hodowlach tkankowych stymulowanych surowicą i czynnikami wzrostu. Brak fosforylacji S6 obserwowany jest natomiast w komórkach spoczynkowych i formach przetrwalnych wielu organizmów. Jest całkiem prawdopodobne, że z fosforylacją białka S6 rybosomu wiąże się wzrost biosyntezy białka w stymulowanych komórkach. Badania fizykochemiczne wykazały, że białko to występuje w miejscu wiązania aatRNA i mRNA do podjednostki 40 S co sugerować może jego istotną rolę w regulacji inicjacji biosyntezy białka.

II. Charakterystyka białka S6

Rybosomowe fosfoproteiny po raz pierwszy wykazano w retikulocytach królika i wątrobie szczura w pracowni Kabata [3] oraz Loeba i Blata [4]. Fosforylację białek rybosomowych organizmów eukariotycznych wykazano zarówno w doświadczeniach *in vivo*, jak *in vitro*. Obecność rybosomowych

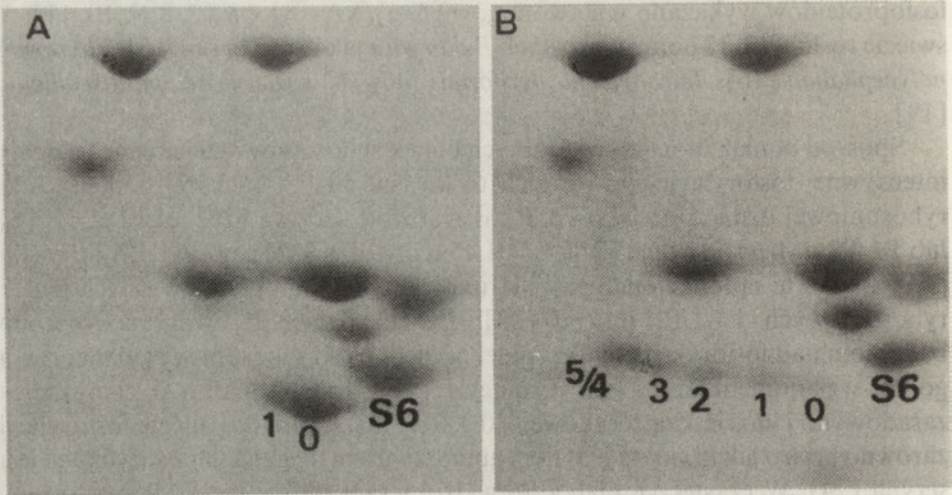
fosfoproteidów wykazano u stawonogów [5, 6], kręgowców [7, 8, 9, 10, 11], w świecie roślin [12, 13] oraz u prostych *Eukaryota* jak drożdże [14, 15], *Physarum polycephalum* [16], *Tetrahymena pyriformis* [17, 18] i *Dictyostelium discoideum* [19].

Śród ponad 70-u indywidualnych białek rybosomowych jedynie 3 ulegają intensywnej fosforylacji. Dwa z nich to kwaśne białka większej podjednostki rybosomowej oznaczone jako P1/P2 w wątrobie szczura [20], eL12/eL12' [8] lub P1/P2 u *Artemia salina* [21], L44/L45 u drożdży [22] czy LA1-LA3 u roślin [13]. Białka te są funkcjonalnymi i strukturalnymi analogami kwaśnych białek rybosomowych L7/L12 *E. coli* [23]. Jednak najwięcej uwagi poświęcono badaniom nad fosforylacją białka małej podjednostki rybosomowej, oznaczonego S6 wg. nomenklatury Mc' Conkey'a [11]. Jest to białko o charakterze zasadowym i masie cząsteczkowej 30 000 — 35 000. Białko ulega fosforylacji zarówno *in vivo* jak *in vitro* a jedynym aminokwasem ulegającym modyfikacji jest seryna [24]. W cząsteczce białka S6 wątroby szczura wykryto 15 reszt seryny przy czym w zależności od warunków środowiska, fosforylacji ulegają tylko niektóre z nich. Wykazano, że zmodyfikowane w białku S6 reszty seryny, zlokalizowane są w regionie C-końca omawianej cząsteczki białka, złożonej z 249 aminokwasów. Niżej przedstawiono osiemnastoaminokwasowy fragment C-końca białka S6 z zaznaczeniem potencjalnych miejsc fosforylacji wg Wettenhalla i Morgana [25].



Ryc. 1. Sekwencja aminokwasów fragmentu C — końca białka S6 wątroby szczura (25).

W zależności od stopnia ufosforylowania białko S6 może występować w różnych formach. Formy te można rozdzielić drogą elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakrylamidowym [26, 27] ponieważ obecność każdej dodatkowej grupy fosforanowej zwalnia szybkość migracji białka w pierwszym kierunku elektroforezy podczas gdy szybkość wędrówki białka w kierunku drugim pozostaje nie zmieniona [28]. Tak więc na barwionych żelach czy autoradiogramach obserwować można od jednej do pięciu różnych form białka S6 [29, 30, 31, 32, 33, 34]. Na zamieszczonym dla przykładu zdjęciu przedstawiono białko S6 komórek BHK w pojedynczej, nieufosforylowanej formie (Ryc. 2a) i w pięciu w różnym stopniu ufosforylowanych jego pochodnych (Ryc. 2b).



Ryc. 2. Elektroforetyczna analiza białek rybosomowych komórek BHK wg (31):
 A — komórki starych hodowli — pojedyncza forma białka S6,
 B — komórki stymulowane surowicą (1h) — 5 różnych form białka S6.

III. Fosforylacja białka S6 *in vivo*

Badając stan fosforylacji białka S6 *in vivo* wykazano, że różne czynniki wpływają na zróżnicowany stopień ufosforylowania tego białka w komórce. Stwierdzono, że hormon peptydowy glukagon oraz prostaglandyna E1, których działanie podnosi stężenie cAMP w komórce [35, 36, 37, 38] jak również bezpośrednie podanie cAMP lub jego analogów [35, 36, 39, 40, 41] stymuluje fosforylację białka S6. Działanie omawianych czynników prowadzi do utworzenia pochodnych białka S6 z jedną bądź dwiema zmodyfikowanymi resztami seryny w cząsteczce białka [40, 41].

W odróżnieniu od omawianych wyżej, szereg czynników takich jak insulina, EGF, PDGF, prostaglandyna F_{2α} i wiele innych stymulujących wzrost i podziały komórkowe czynników prowadzi do powstawania pochodnych omawianego białka z pięcioma resztami fosfoseryny w cząsteczce. W tabeli 1 przedstawiono wykaz czynników, które w optymalnych warunkach wpływają na modyfikację 5 reszt serynowych białka S6 w różnych komórkach i tkankach. Na podstawie wyników badań kinetycznych prowadzonych na komórkach 3T3 stymulowanych czynnikami wzrostu surowicy [29] wykazano, że powstawanie różnych form białka S6 zachodzi stopniowo od mniej do bardziej fosforylowanych pochodnych. Maksymalny poziom fosforylacji obserwuje się po upływie 30 min. Wysoki poziom fosforylacji białka S6 utrzymuje się przez 2 godziny a następnie zachodzi jego stopniowa defosforylacja. Podobne obserwacje uzyskano dla stymulowanych surowicą komórek HeLa [30] i BHK [31].

Tabela 1

Czynniki wpływające na powstawanie pięciu fosforylowanych form białka S6 *in vivo* (częściowo wg 54)

Rodzaj materiału biologicznego	Czynnik stymulujący	Piśmiennictwo
Fibroblasty — komórki 3T3	surowica	29
	EGF	54
	PDGF	42
	prostaglandyna F 2 α	43
	ortowanadan	44
	insulina	43
	transformacja AbMuLV	45
Fibroblasty — BHK	surowica	31
	infekcja PRV	46,47
Fibroblasty zarodków kurczęcia	estry forbolowe	48
	transformacja RSV	49,50
Komórki <i>HeLa</i>	insulina	60
Komórki <i>hepatoma Reuber H35</i>	insulina	51,52
	estry forbolowe	51,52
Wątroba	regeneracja	53
	gorączka Q (<i>Coxiella burneti</i>)	54
	cycloheximid	28
	dwumetylonitrozamina	55
Retikulocyty	nieznaczny spadek pH	56
	NaF (5mM)	56
Oocyty <i>Xenopus laevis</i>	progesteron	24,57
	iniekcja pp60v src	58
	iniekcja AbMuLV	45
	nieznaczne podwyższenie pH	59

Zwraca uwagę fakt, że czynniki, których działanie podnosi stężenie cAMP w komórce wpływają na modyfikację dwóch reszt serynowych białka S6. Z kolei czynniki stymulujące wzrost i podziały komórkowe prowadzą do powstawania wysokofosforylowanych jego pochodnych. Skłoniło to Lasticka i Mc' Conkey'a [60] do wysunięcia hipotezy o istnieniu dwóch alternatywnych szlaków zaangażowanych w fosforylację białka S6: szlak zależny od cAMP i szlak niezależny od cyklicznych neukleotydów.

Należy jeszcze dodać, że wzrost inkorporacji fosforanu do omawianego białka obserwuje się w takich warunkach jak: regenerująca wątroba szczura [53], komórki transformowane wirusami nowotworowymi [49, 50], kiełkujące spory drożdży [61] i *Mucor racemosus* [62] i zapłodnione jaja jeżowca [63].

Na podstawie wszystkich przedstawionych tutaj obserwacji wysnuto kolejną

hipotezę, że fosforylacja białka jest niska, bądź zupełnie jej brak w komórkach spoczynkowych oraz formach przetrwalnikowych wielu organizmów a jego fosforylacja poprzedza wzrost szybkości syntezy białka oraz związaną z tym stymulację wzrostu komórki. Wysłunięto nawet przypuszczenie, że stan fosforylacji białka S6 może być głównym elementem regulacyjnym komórkowego wzrostu i różnicowania [64].

Warto dodać, że ciekawych danych na temat stanu fosforylacji białka S6 *in vivo* dostarczyły badania skutków szoku cieplnego. Glover [65] i Olsen [66] wykazali, że odpowiedzi na szok cieplny towarzyszy szybka defosforylacja białka S6 małej podjednostki rybosomowej *Drosophila melanogaster*. Podobne obserwacje uzyskano z badań nad komórkami roślin wyższych [34], ssaków [67, 68] i drożdży [69]. Co więcej, przywróceniu optymalnej temperatury wzrostu towarzyszy refosforylacja białka S6. Zjawisko stresu cieplnego wydaje się być bardzo dobrym modelem do badań regulacji aktywności enzymów zaangażowanych w modyfikacji tego białka jak również jednym z możliwych sposobów badań nad kontrolą translacji na etapie selekcji określonych mRNA.

IV. Udział kinaz fosfobiałkowych w fosforylacji S6 *in vitro*

IV-1. Fosforylacja białka S6 przez kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów

Doświadczenia *in vitro* wydają się potwierdzać hipotezę wysuniętą przez Lasticka i Mc' Conkey'a [60]. Wykazano mianowicie, że oczyszczona podjednostka katalityczna kinazy zależnej od cAMP (kinaza A) wybiórczo fosforyluje białko S6 podjednostki 40S [40, 41, 70, 71]. Enzym katalizuje modyfikację dwóch reszt serynowych w pozycjach 1 i 2 C-końcowego białka S6 [25, 71]. Warto podkreślić, że te same pozycje seryny są modyfikowane *in vivo* w odpowiedzi na działanie czynników podnoszących stężenie cAMP w komórce [71]. Kinaza zależna od cGMP również fosforyluje białko S6 ale tylko 1 reszta fosforanu wbudowywana jest do cząsteczki białka [54].

IV-2. Kinazy niezależne od cyklicznych nukleotydów zaangażowane w fosforylacji białka S6

W piśmiennictwie naukowym przez długi czas nie było danych odnośnie fosforylacji białka S6 poprzez kinazy białkowe niezależne od cyklicznych nukleotydów. Badania ostatnich lat przyniosły znaczny postęp w tej dziedzinie. Wyizolowano i scharakteryzowano kilka takich enzymów. Są to: kinaza aktywowana drogą ograniczonej proteolizy PAK-II, kinaza C i kinaza specyficzna dla białka S6.

a) kinaza aktywowana drogą ograniczonej proteolizy PAK-II

W stymulowanych insuliną komórkach 3T3-L1 wykazano obecność kinazy fosfobiałkowej, której aktywację, *in vitro* można przeprowadzić drogą ograni-

czonej proteolizy przy użyciu trypsyny [56]. Tak zaktywowana forma enzymu może fosforylować białko S6 oraz inne substraty takie jak: eIF2, histon H1, syntaza glikogenu, kazeina, białko pp12 wirusa RSV i niekiedy białko rybosomowe S10, które nie ulega fosforylacji w warunkach fizjologicznych. Analogiczny enzym został wyizolowany i oczyszczony z retikulocytów królika [72] i wątroby szczura [54]. Stwierdzono, że występuje on w komórce w formie nieaktywnego proenzymu o masie cząsteczkowej 80 000 podczas gdy masa cząsteczkowa jego zaktywowanej formy oszacowana została na 45 000—55 000. W optymalnych warunkach enzym katalizuje inkorporację 3 reszt fosforanowych na cząsteczkę białka S6 [73]. Modyfikacji ulegają reszty seryny oznaczone 1, 2 i 3 na ryc. 1.

b) kinaza C

Wykazano że, estry forbolowe wpływają na wzrost fosforylacji białka S6 w komórkach wielu organizmów *in vivo* [48, 74]. Równocześnie wiadomo, że estry forbolowe są induktorami kinazy C. Nasunęło to przypuszczenie o możliwości udziału kinazy C w modyfikacji białka S6. W wielu pracowniach udało się wykazać, że ten występujący w błonie plazmatycznej, zależny od fosfolipidów i jonów wapnia enzym, może rzeczywiście wykorzystywać S6 jako substrat do fosforylacji [75, 76, 77]. Fosforylację białka S6 katalizuje również pochodna tego enzymu powstająca drogą ograniczonej proteolizy tzw. kinaza M [75]. Jest to enzym obecny w cytoplazmie, który w odróżnieniu od kinazy C nie wymaga jonów Ca^{++} i fosfolipidów jako kofaktorów. Fakt, że kinaza M i opisany wyżej PAK II są aktywowane drogą ograniczonej proteolizy nasuwa pytanie — czy jest to jeden czy dwa różne enzymy? Zdaniem niektórych badaczy [75], ten sam mechanizm aktywacji, ta sama masa cząsteczkowa, zdolność do fosforylacji histonu H1, eIF2 i oprócz białka rybosomowego S6 również białka S10 (charakterystyczne, że nie fosforylowanego w warunkach fizjologicznych) może wskazywać, że kinaza M i PAKII to ten sam enzym. Inni natomiast przedstawiają dowody na odrębność tych dwóch aktywności. Między innymi możliwość ich rozdzielenia na P-celulozie czy też fakt, że poliklonalne przeciwciała przeciw kinazie C rozpoznają PAK II [54].

Wykazano, że kinaza C katalizuje inkorporację dwóch [76] lub trzech [75] reszt fosforanowych do białka S6 *in vitro*. Co więcej, używając podjednostek 40S ufosforylowanych uprzednio przez kinazę A jako substratu, wykazano, że kinaza C katalizuje modyfikację dalszych reszt serynowych białka S6 [75]. Prowadzi to w konsekwencji do uzyskania czterech a niekiedy pięciu pochodnych tego białka. Dane te wskazują pośrednio, że kinaza C modyfikuje inne niż kinaza A miejsca serynowe białka S6.

Kwestia bezpośredniego udziału kinazy C w modyfikacji S6 budzi kontrowersje. W pracowni Traugh [54] używając oczyszczonej kinazy C z retikulocytów, mózgu czy wątroby szczura nie obserwowano fosforylacji białka S6 *in vitro*. Wielu badaczy [78, 79] opierając się na obserwowanej korelacji aktywacji kinazy C i fosforylacji S6 *in vivo* sugeruje pośredni udział tego enzymu w złożonym mechanizmie fosforylacji białka S6, co będzie dyskutowane w dalszej części artykułu.

c) kinaza specyficzna dla białka S6 (kinaza S6)

W 1984 r. w laboratorium Thomasa [29] wykazano, że ekstrakty bezkomórkowe, wyizolowane ze stymulowanych surowicą czy EGF komórek 3T3, cechowała prawie trzydziestokrotnie wyższa zdolność fosforylacji białka S6 *in vitro*, niż ekstrakty z komórek kontrolnych, nie poddanych działaniu w/w czynników. (Analiza elektroforetyczna modyfikowanego białka wykazała pięć, w różnym stopniu ufosforylowanych pochodnych, co jest odzwierciedleniem sytuacji *in vivo*). Tak wysoką aktywność preparatu uzyskano dzięki zastosowaniu β —glicerofosforanu jako czynnika buforującego i jednocześnie inhibitora fosfataz. Stabilizacja aktywności enzymu, określonego mianem kinazy S6, poprzez β —glicerofosforan, a jak wykazano później i inne inhibitory fosfataz wykazuje, że enzym sam może ulegać fosforylacji [44]. Świadczyć to może także, że jego aktywność jest regulowana przez fosforylację. Jednakże enzym odpowiedzialny za fosforylacyjną modyfikację kinazy S6 nie został dotąd wykazany.

Kinaza S6 została wyizolowana i oczyszczona z komórek 3T3-L1 stymulowanych insuliną [80], z komórek BHK stymulowanych surowicą [31], z fibroblastów zarodków kurczęcia infekowanych wirusem transformującym RSV [81] i innych. Dla uproszczenia w tabeli 2 przedstawiono wykaz opisanych dotychczas kinaz zaangażowanych w fosforylacji S6 z uwzględnieniem materiału biologicznego, z którego zostały one wyizolowane oraz czynników aktywujących. W odróżnieniu od opisanej wcześniej kinazy C i kinazy aktywowanej drogą ograniczonej proteolizy (PAK II), omawiany tutaj enzym wykazuje bardzo wysoką specyficzność substratową. Enzym nie fosforyluje, powszechnie stosowanych w badaniach, substratów kwaśnych, jak kazeina i fosfityna, ani też zasadowych histonów czy protaminy. Nie fosforyluje innych białek rybosomowych z wyjątkiem S6. Ostatnio w pracowni Krebsa zastosowano do badań syntetyczny, ośmio-aminokwasowy peptyd o sekwencji identycznej z fragmentem C końcowego regionu białka S6 wątroby szczura: Arg Arg Leu Ser Ser Leu Arg Ala [86]. Wykazano też, że enzym może, choć w mniejszym stopniu niż kinaza A, fosforylować inny syntetyczny peptyd (ang. *kemptide*) o sekwencji Leu Arg Arg Ala Ser Leu Gly [85].

Z przedstawionych w tabeli 2 danych zwraca uwagę wielkie zróżnicowanie mas cząsteczkowych kinazy S6 izolowanej w różnych pracowniach: wartości wahają się w granicach 29 000—95 000. Czy to może wskazywać na istnienie wielu kinaz S6? Wiadomo, że wielkość oznaczonej masy cząsteczkowej zależy często od stosowanej techniki. Przykładem może być kinaza S6 z jaj *Xenopus laevis*. Jej masa cząsteczkowa oznaczona drogą jednokierunkowej elektroforezy w SDS oszacowana została na 92 000; mcz. enzymu poddanego filtracji żelowej na kolumnie Sephacryl S200 oznaczono na 70 000—80 000, a podczas wirowania w gradiencie glicerolu na 55 000 [85, 89]. Trudno zatem odpowiedzieć czy opisane dotychczas preparaty są różnymi enzymami, a więc czy istnieje wiele czy tylko jedna kinaza S6. Nie wykluczone, że badania genetyczne nad identyfikacją i sekwencjonowaniem genów kinazy S6 dostarczą w przyszłości jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie.

Charakterystyka kinaz zaangażowanych w fosforylację białka S6 *in vitro*

Nazwa enzymu	Źródło enzymu	Czynnik stymulujący	Ilość form S6	Masa cząsteczkowa	Specyficzność substratowa	Písmiennictwo
kinaza A	różne komórki i tkanki		2	RI — 47 000 RII — 54 000 C — 40 000	szeroka specyficzność substratowa	40, 59, 71
PAK II	3T3-L1, retikulocyty, wątroba		3	proenzym — 80 000 forma aktywowana 45 000—55 000	szeroka specyficzność substratowa	56, 72
kinaza C	różne komórki i tkanki		2—3	77 000	szeroka specyficzność substratowa	75, 76, 77, 82
kinaza H4				55 000	S6, histon H4	83
kinaza ViPK	komórki BHK	PRV	1—5		S6 (przy wysokich stężeniach soli) S7, protamina, histony	84
	3T3-L1	insulina, PMA		50 000—60 000	S6	80
	jaja <i>Xenopus laevis</i>		4—5	50 000, 70 000, 90 000	S6, kemptyd	78, 85
	3T3	EGF	1—5		S6	29, 44
kinaza S6	3T3-D1	FGF		29 000—95 000	S6, syntetyczny peptyd Arg Arg Leu Ser Ser Leu Arg Ala	86
	fibroblasty zarodków kurczęcia	PMA, surowica RSV			S6	81
	komórki BHK	surowica, PRV	2—3	30 000	S6	31, 47
	astrocyty	insulina, PMA			S6	79
	komórki PC12	NGF		45 000	S6	87, 88

V. Mechanizm aktywacji kinazy S6

W świetle przedstawionych danych literaturowych powstaje pytanie: w jaki sposób tak różnorodne czynniki jak insulina, czynniki wzrostowe, estry forbolowe itd, wiążąc się z różnymi receptorami na powierzchni komórki, wywołują tę samą fizjologiczną odpowiedź prowadzącą do aktywacji kinazy S6, a w konsekwencji do fosforylacji białka S6. Wiadomo, że receptory niektórych czynników wzrostowych czy insuliny cechuje aktywność kinazy tyrozynowej [90]. Infekcja fibroblastów zarodka kurczęcia wirusem RSV, która prowadzi między innymi do syntezy kinazy tyrozynowej w transformowanych komórkach [49, 50] również prowadzi do aktywacji kinazy S6. Ponadto iniekcja kinazy tyrozynowej wirusów transformujących RSV [58], AbMu LV [45] czy receptora insuliny [90] do oocytów *Xenopus laevis* także powoduje wzrost aktywności kinazy S6. Wskazywać by to mogło na udział kinaz tyrozynowych w aktywacji kinazy S6. Fakt, że 1 mM ortowanadan, specyficzny inhibitor fosfataz fosfotyrozynowych stabilizuje aktywność surowych preparatów kinazy S6 może również o tym świadczyć [44]. Nie ma jednak bezpośrednich danych doświadczalnych wskazujących, że kinaza S6 jest substratem kinaz tyrozynowych.

Wykazano, że w komórkach 3T3 [80] astrocytach [79] i fibroblastach zarodków kurczęcia [81] estry forbolowe również stymulują aktywność kinazy S6. Wiadomo, że receptorem estrów forbolowych jest kinaza C, a więc enzym, który w odróżnieniu od kinaz tyrozynowych katalizuje fosforylację reszt serynowych i treoninowych substratów białkowych. Może to więc wskazywać na istnienie alternatywnej drogi aktywacji kinazy S6 via kinaza C. Podobnie jak w przypadku kinaz tyrozynowych fosforylacja kinazy S6 przez ten enzym nie została eksperymentalnie wykazana. Ostatnie badania Evansa i Farrara [78] przeprowadzone na mysich limfocytach T traktowanych interleukiną 2 i diacyloglicerolem również sugeruje udział kinazy C w aktywacji kinazy S6.

Wszystkie te dane wskazujące pośrednio na zaangażowanie kinaz tyrozynowych oraz serynowo/treoninowej kinazy C w aktywacji kinazy S6 wydają się sugerować, że w komórce regulacja aktywności tego enzymu przebiega kilku drogami.

Warto ponadto wspomnieć, że poziom fosforylacji białka S6 zależy od pH [63]. Z obserwacji Wassermanna i Houle'a [59] wynika, że w obecności progesteronu, którego działaniu towarzyszy alkalizacja cytoplazmy komórki w oocytach *Xenopus laevis*, poziom fosforylacji białka S6 rośnie 6–8krotnie. Wydaje się, że może to mieć związek ze wzrostem wymiany Na^+/H^+ w błonach plazmatycznych tych komórek, ponieważ wiadomo, że czynniki te wpływają na wzrost poziomu fosforylacji S6 [91].

VI. Rola białka S6 w regulacji translacji

Komórki spoczynkowe poddane działaniu surowicy lub czynników wzrostowych odpowiadają zwiększeniem szybkości biosyntezy białka [92] oraz

związanym z tym szybkim włączeniem endogennego mRNA i 80S rybosomów do polisomów [93].

Szereg obserwacji wskazuje, że fosforylacja białka S6 prowadzi do wzrostu szybkości inicjacji biosyntezy białka dla określonych klas mRNA [95, 96].

Ostatnio przebadano wpływ fosforylacji białka S6 na zdolność wiązania syntetycznych i naturalnych mRNA do podjednostek 40S modyfikowanych kinazą A i PAK II. Wykazano znacznie wyższy poziom translacji poli (A, U, G) [73] oraz naturalnego globinowego mRNA [97] przez podjednostki modyfikowane przez PAK II w porównaniu z podjednostkami nieufosforylowanymi. Natomiast podjednostki 40S ufosforylowane przez kinazę A nie różniły się ani poziomem wiązania ani translacji obydwu rodzajów mRNA [73, 97]. Omówiony tutaj wpływ fosforylacji wydaje się być specyficzny dla określonych klas mRNA, gdyż jak wykazano wcześniej, fosforylacja S6 zarówno przez PAK II jak i kinazę A nie zmieniła poziomu syntezy kolagenu w bezkomórkowym systemie translacji. Na podstawie własnych obserwacji Traugh i Pendegrast [54] wyróżniają trzy klasy mRNA, które mogą być w różnicowany sposób rozpoznawane przez 40S w zależności od stopnia fosforylacji białka S6:

1. mRNA wykorzystywane w sposób wybiórczy przez 40S modyfikowane kinazą S6 (aktywowaną mitogenami)

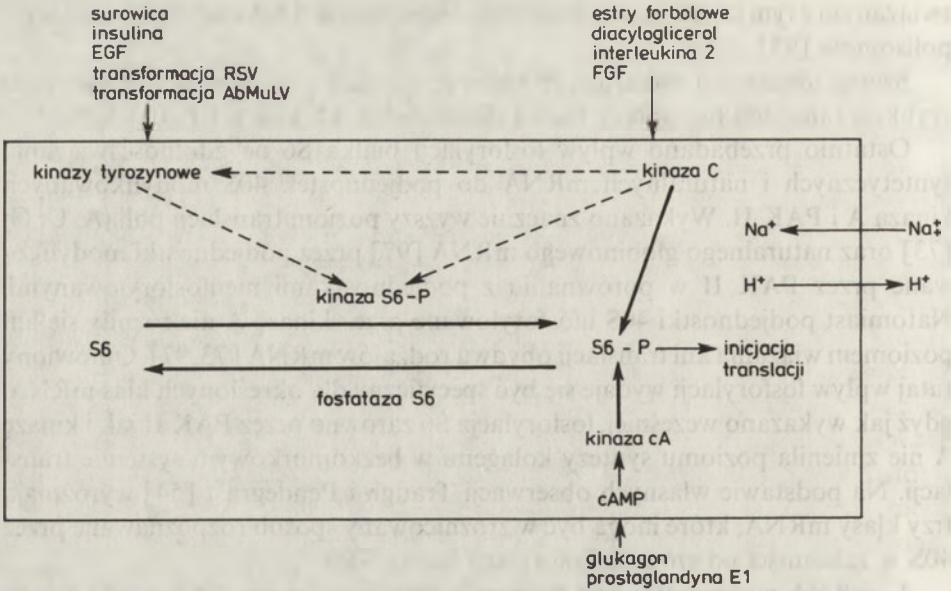
2. mRNA wykorzystywane w komórce w sposób ciągły niezależnie od stopnia fosforylacji S6

3. mRNA wybiórczo wykorzystywane przez 40S modyfikowane kinazą A. Sugeruje się, że ta zróżnicowana wybiórczość podjednostek 40S jest związana z ich zmianami konformacyjnymi pod wpływem fosforylacji. O możliwości takich zmian donoszono już wcześniej [98], a ostatnie badania w pracowni Thomasa [99] wskazują, że fosforylacja S6 wpływa na zmiany konformacyjne 18 S RNA w tym regionie rybosomowego kwasu nukleinowego, który jak się obecnie sugeruje, odpowiedzialny jest za wiązanie mRNA z 40S [100]. Należy tutaj pamiętać, że w selekcji mRNA istotną rolę odgrywa również sama cząsteczka messenger RNA a w szczególności struktura pierwszorzędowa oraz konformacja sekwencji liderowej znajdującej się na końcu 5'mRNA [101, 102, 103], a także czynniki inicjujące [1, 2, 104].

Przedstawione wyżej dane wskazujące na istotną rolę fosforylacji S6 w inicjacji translacji nie są jednoznaczne. [105, 106, 107, 108]. Wydaje się, że wyniki badań *in vitro* są niedość przekonujące. Nie wykluczone, że ostateczne wnioski można będzie wyciągnąć po zbadaniu zdolności translacji naturalnych mRNA przy użyciu podjednostek 40S modyfikowanych przez opisaną ostatnio specyficzną dla białka S6 kinazę (kinazy).

VII. Podsumowanie

Ponizej przedstawiony został schemat, który stanowi próbę podsumowania uzyskanych dotychczas danych dotyczących możliwych dróg fosforylacji białka S6 w komórce oraz biologicznego znaczenia tej modyfikacji.



Ryc. 3. Schemat mechanizmu fosforylacji białka S6 *in vivo*.

Linie ciągłe (grubsze) — enzymy zaangażowane w bezpośrednią fosforylację S6.

Linie przerywane — enzymy pośrednio zaangażowane w modyfikację S6.

Część badań przedstawionych w artykule wykonano w ramach koordynowanych tematów: RP.II.13.1.11 i CPBR 3.13.1.3.2.

Artykuł otrzymano 29 października 1987 r.

Zaakceptowano do druku 7 marca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Pain V. M., (1986), *Biochem. J.*, **235**, 625—637.
2. Moldave K., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 1109—1149.
3. Kabat D., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4160—4175.
4. Loeb J.E., Blat C., (1970), *FEBS Lett.*, **10**, 105—108.
5. Madjar J.J., Fournier A., (1981), *Molec. Gen. Genet.*, **182**, 273—278.
6. Van Agthoven A., Kriek J., Amons R., Möller W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 553—565.
7. Jergil B., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **28**, 546—554.
8. Kaerlein M., Horak I., (1976), *Nature*, **259**, 150—151.
9. Hanocq-Quertier J., Baltus E., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **120**, 351—355.
10. Leader D., (1980), *Molecular Aspects of Cellular Regulation.*, (red. P. Cohen), tom 1, 201—233; Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
11. McConkey E.H., Bielka H., Gordon J., Lastick S.M., Lin A., Ogata K., Reboud J.P., Traugh J.A., Traut R.R., Warner J.R., Welfle H., Wool J.G., (1979), *Molec. Gen. Genet.*, **169**, 1—6.
12. Trawavas A., (1973), *Plant. Physiol.*, **51**, 760—767.
13. Scharf K.D., Nover L., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **909**, 44—57.

14. Grankowski N, Gąsior E, (1975), *Acta Biochim. Polon.*, **22**, 45—56.
15. Zinker S, Warner J. R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1799—1807.
16. Belanger G, Bellemarie G, Lemieux G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 862—868.
17. Kristiansen K, Plesner P, Kruger A., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **83**, 395—403.
18. Cuny M, Sripati C. E., Hayes D. L., (1985), *J. Cell. Physiol.*, **124**, 349—357.
19. Juliani M. H., da Costa M. J. C., Manhaes B. M. C., (1983), *FEBS Lett.*, **154**, 400—406.
20. Lin A, Wittmann-Liebold B, McNally J., Woll I. G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **10**, 9189—9197.
21. Uchiumi T, Wahba A. J., Traut R. R., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 5580—5584.
22. Kudlicki W, Szyszka R, Paleń E, Gąsior E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 180—187.
23. Grankowski N., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 173—195.
24. Kruppa J, Darmer D, Kalthoff H, Richter D., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **129**, 537—542.
25. Wettenhall R. E. H., Morgan F. J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 2084—2091.
26. Kaltschmidt E, Wittmann H. G., (1970), *Anal. Biochem.*, **36**, 401—412.
27. Lastick S, McConkey E. H., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2867—2875.
28. Gressner A. M., Wool J. G., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1482—1490.
29. Novak-Hofer J., Thomas G., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5995—6000.
30. Lastick S. M., Nielsen P. J., McConkey E. H., (1977), *Mol. Gen. Genet.*, **152**, 223—230.
31. Jakubowicz T, Leader D. P., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **164**, 83—88.
32. Traugh J. A., Porter G. G., (1976), *Biochemistry*, **15**, 610—616.
33. Roberts S., Ashby C. D., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 288—296.
34. Scharf K. D., Nover L., (1982), *Cell*, **30**, 427—437.
35. Schubart U. K., Shapiro S, Fleischer N., Rosen O. M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 91—101.
36. Wettenhall R. E. H., Howlett G. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9317—9323.
37. Blat C, Loeb J. E., (1971), *FEBS Lett.*, **18**, 124—126.
38. Gressner A. M., Wool J. G., (1976), *Nature*, **259**, 148—150.
39. Cawthon M. L., Bitte L. F., Krystosek A., Kabat D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 275—278.
40. Traugh J. A., Del Grande R. W., Tuazon P. T., (1981), w Cold Spring Harbor Conf. Cell. Prolif. (red. Rosen O., Krebs E.), tom 8, str. 999—1012; Cold Spring Harbor Lab., New York.
41. Floyd G. A., Traugh J. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **117**, 257—262.
42. Nishimura J., Deuel T. F., (1983), *FEBS Lett.*, **156**, 130—134.
43. Thomas G., Martin-Perez J., Siegmann M., Otto A. M., (1982), *Cell*, **30**, 235—242.
44. Novak-Hofer J., Thomas G., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10314—10319.
45. Maller J. L., Foulkes J. G., Erikson E., Baltimore D., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**, 272—276.
46. Kennedy J. M., Stevely W. S., Leader D. P., (1981), *J. Virol.*, **39**, 359—366.
47. Jakubowicz T, Leader D. P., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **168**, 371—376.
48. Blenis J., Spivack J. G., Erikson R. L., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**, 6408—6412.
49. Blenis J., Erikson R. L., (1984), *J. Virol.*, **50**, 966—969.
50. Decker S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 4112—4115.
51. Trevillyan J. M., Perisic O., Traugh J. A., Byus C. V., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 3041.
52. Trevillyan J. M., Kulkarni R. K., Byus C. V., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 897—902.
53. Gressner J. M., Wool J. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6917—6925.

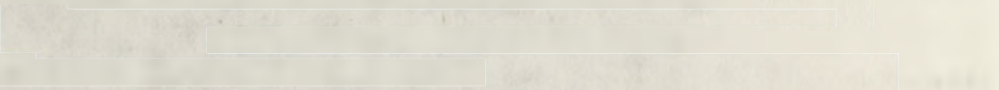
54. Traugh J.A., Pendergast A.M., (1986), *Nucl. Acid. Res.*, **33**, 195—230.
55. Gressner A.M., Von de Leur E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **608**, 459—468.
56. Perisic O., Traugh J.A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 13998—14002.
57. Nielsen P.J Thomas G., Maller J.L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 2937—2941.
58. Spivack J.G., Erikson R.L., Maller J.L., (1984), *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1631—1634.
59. Wasserman W.J., Houle J.G., (1984), *Dev. Biol.*, **101**, 436—445.
60. Lastick S.M., McConkey E.H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 917—923.
61. Szyszka R., Gąsior E., (1984), *Acta Biochim. Polon.*, **4**, 375—382.
62. Larsen A., Sypherd P.S., (1980), *J. Bacteriol.*, **141**, 20—25.
63. Ballinger D.G., Hunt T., (1981), *Dev. Biol.*, **87**, 277—285.
64. Thomas G., (1980), Protein Phosphorylation and Bio-regulation, (red. Thomas G., Podesta E.J., Gordon J.), str. 102—110; Korger, Basel.
65. Glover C.V.C., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 1781—1785.
66. Olsen A.S., Triemer D.F., Sanders M.M., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2017—2027.
67. Kennedy J.M., Burdon R.H., Leader D.P., (1984), *FEBS Lett.*, **169**, 267—273.
68. Richter W.W., Zang K.D., Issinger O.G., (1983), *FEBS Lett.*, **153**, 262—266.
69. Jakubowicz T., (1985), *Acta Biochim. Polon.*, **32**, 7—12.
70. Del Grande R.W., Traugh J.A., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 421—428.
71. Wettenhall R.E.H., Cohen P., (1982), *FEBS Lett.*, **140**, 263—269.
72. Lubben T.H., Traugh J.A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 13992—13997.
73. Burghard S.J., Traugh J.A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14003—14008.
74. Trevillyan J.M., Kulkarni R.K., Byus C.V., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 897—902.
75. Parker P.J., Katan M., Waterfield M.D., Leader D.P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **148**, 579—586.
76. Le Peuch C.J., Ballester R., Rosen O.M., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**, 6858—6862.
77. Padel V., Söling H.D., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **151**, 1—10.
78. Evans S.W., Farrar W.L., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 4624—4630.
79. Pierre M., Toru-Delbauffe D., Gavaret J.M., Pomerance M., Jacquemin C., (1986), *FEBS Lett.*, **206**, 162—164.
80. Tabarini D.J., Heinrich J., Rosen O.M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**, 4369—4373.
81. Blenis J., Erikson R.L., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**, 7621—7625.
82. Woodgett J.R., Gould K.L., Hunter T., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **161**, 177—184.
83. Donahue J.J., Masaracchi R.A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 435—440.
84. Katan M., McGarvey M.J., Stevely W.S., Leader D.P., (1986), *Biochem. J.*, **239**, 205—211.
85. Erikson E., Maller J.L., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 350—355.
86. Pelech S.L., Bradley B.O., Krebs E.G., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 5968—5972.
87. Matsuda V., Nakanishi N., Dickens G., Guroff G., (1986), *J. Neurochem.*, **47**, 1728—1734.
88. Matsuda Y., Guroff G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2832—2844.
89. Erikson E., Maller J.L., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**, 742—746.
90. Maller J.L., Pike L.J., Freidenberg G.R., Cordera R., Stith B.J., Olefsky J.M., Krebs E.G., (1986), *Nature*, **320**, 459—460.
91. Pouyssegur J., Chambard J.C., Franchi A., Paris J., Obberghen-Schilling E., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 3935—3939.
92. Rudland P.S., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**, 750.
93. Rudland P.S., Weil S., Hunter A.R., (1975), *J. Mol. Biol.*, **96**, 745.
94. Nielsen P.J., Duncan R., McConkey E.H., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **120**, 523—527.
95. Duncan R., McConkey E.H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 535—539.

96. Duncan R., McConkey E. H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 539.
97. Paleń E., Traugh J. A., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3518—3523.
98. Kisielevsky R., Treloar M. A., Weiler L., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 1351—1356.
99. Thomas G., Ballon L. M., Jaeggi N., Jenö P., Knesel J., Kramer Y., Krieg J., Olivier A. R., Rudkin B. B., Ziegler A., (1986), Annual Report Friedrich Miescher—Institut, str. 69—72; Basel.
100. Westermann P., Schi M. K., Arnstein H. R. V., (1986), *FEBS Lett.*, **205**, 171—174.
101. Pelletier J., Sonenberg N., (1985), *Cell*, **40**, 515—526.
102. Kozak M., (1983), *Microbiol. Rev.*, **47**, 1—45.
103. Hunt T., (1985), *Nature*, **316**, 580—581.
104. Grifo J. A., Tahara S. M., Morgan M. A., Shatkin A. J., Merrick W. C., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 5804—5810.
105. Leader D. P., Thomas A., Voorma H. O., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **656**, 69—75.
106. Comoli R., Leonardi M. G., Alberti P., Frigerio M., (1986), *Cell. Biol. Int. Rep.*, **10**, 821—831.
107. Mastropaolo W., Henshaw E. C., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **656**, 246—255.
108. Tas P. W. L., Martini O., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **163**, 561—567.

- 96 Duncan R, McCorkle J. In: *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:111-119.
- 97 Palfi E, Jurek JA, D'Alagni A. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:120-128.
- 98 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:129-137.
- 99 Thomas O, Ballon J, M. Jurek, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:138-146.
- 100 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:147-155.
- 101 Winters J, Katsisovky R, Tolson M, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:156-164.
- 102 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:165-173.
- 103 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:174-182.
- 104 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:183-191.
- 105 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:192-200.
- 106 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:201-209.
- 107 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:210-218.
- 108 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:219-227.
- 109 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:228-236.
- 110 Katsisovky R, Tolson M, Winters J, et al. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36:237-245.

120-121

122-123



124-125

126-127

128-129

130-131

132-133

134-135

136-137

138-139

LESZEK SZMIGIERO *

Topoizomeraza II jako komórkowy receptor niektórych leków przeciwnowotworowych

Topoisomerase II as a cellular target of some anticancer drugs

Aktywność biologiczna wielu leków przeciwnowotworowych wynika z ich zdolności do oddziaływania z DNA. Powstała niedawno koncepcja, że komórkowym receptorem pewnych leków wiążących się z DNA jest topoizomeraza II.

Topoizomerazy są enzymami kontrolującymi superhelikalność cząsteczki DNA [1]. Jakkolwiek występowanie w formie superhelikalnej jest typową cechą kolistych, stosunkowo niewielkich cząsteczek prokariotycznego DNA [2], to również olbrzymie cząsteczki DNA eukariotycznego zawierają takie struktury [3]. Dany odcinek superhelikalnego DNA może występować w różnych formach topologicznych (topological isomers, topoisomers). Różnią się one liczbą superhelikalnych skrętów oraz stopniem skręcenia dwuniciowego heliksu określonego tzw. liczbą wiązania (linking number) [3]. Przejściu jednego topoizomeru DNA w drugi towarzyszy obniżenie lub podwyższenie liczby wiązania. Reakcja ta, zwana przemianą topologiczną (topological change, topological interconversion), katalizowana jest przez topoizomerazy. W oparciu o sposób działania wyróżnia się topoizomerazy I oraz topoizomerazy II. Topoizomeraza I katalizuje przecięcie jednej nici DNA i przyłącza się kowalencyjnie w miejscu przecięcia. W wiązaniu tym uczestniczy grupa hydroksylowa tyrozyny białka i grupa fosforanowa końca 3' DNA [1]. Przez miejsce pęknięcia przechodzi komplementarna nić DNA, po czym enzym reperuje pęknięcie wykorzystując energię wiązania fosforoestrowego tyrozyny. Powstały topoizomer DNA uzyskuje w wyniku reakcji obniżoną o 1 liczbę wiązania. Topoizomeraza II powoduje jednoczesne pęknięcie w obu niciach DNA. Enzym, który jest homodimerem pozostaje kowalencyjnie związany w miejscu pęknięcia z obu końcami 5' komplementarnych nici DNA [1]. Połączenie enzymu z przeciętym heliksem nazywane jest w literaturze „kompleksem rozczalnym” (cleavable complex). Mimo przzerwania nici, fragmenty heliksu nie oddzielają się od siebie

Wykaz skrótów: m-AMSA — 4'-(9-akrydynoamino)metanosulfono-m-anizydyd;

VP-16 — etylideno- β -D-glukopiranozylo-4'-demetyloepipodofylotoksyna;

VM-26 — tienylideno- β -D-glukopiranozylo-4'-demetyloepipodofylotoksyna.

* Dr n. przr., Zakład Chemii Ogólnej, Instytut Fizjologii i Biochemii w Łodzi, ul. Lindego 3, 90-131 Łódź.

dzięki oddziaływaniom między podjednostkami enzymu. Kompleks ten można zdysocjować za pomocą detergentów: ulegają wówczas osłabieniu wiązania między podjednostkami enzymu, co powoduje ujawnienie pęknięć DNA [1]. Odległości między podjednostkami enzymu ulegają zwiększeniu w wyniku jego przemian konformacyjnych, które zachodzą w następnym etapie reakcji. Przez powstałą w ten sposób szczelinę przesuwają się położony dalej fragment dwuniciowego heliksu DNA (patrz Schemat 1). Etap ten nazywany jest „przejsciem nici” (strand passage) i wymaga udziału ATP. Po odtworzeniu wiązań fosfodwuestrowych, co tak jak w przypadku topoizomerazy I zachodzi kosztem kowalencyjnych wiązań enzym-DNA, powstaje topoizomer o zmienionej (podwyższonej lub obniżonej o 2) liczbie wiązania. Do obniżenia liczby wiązania dochodzi w przypadku rozluźniania struktur superspiralnych, katalizowanego przez oba typy topoizomeraz. Tworzenie struktur superhelikalnych wymaga podwyższenia liczby wiązania. Jak dotąd wykazano zdolność do katalizowania takiej reakcji tylko dla bakteryjnej topoizomerazy II (gyrase) [1].

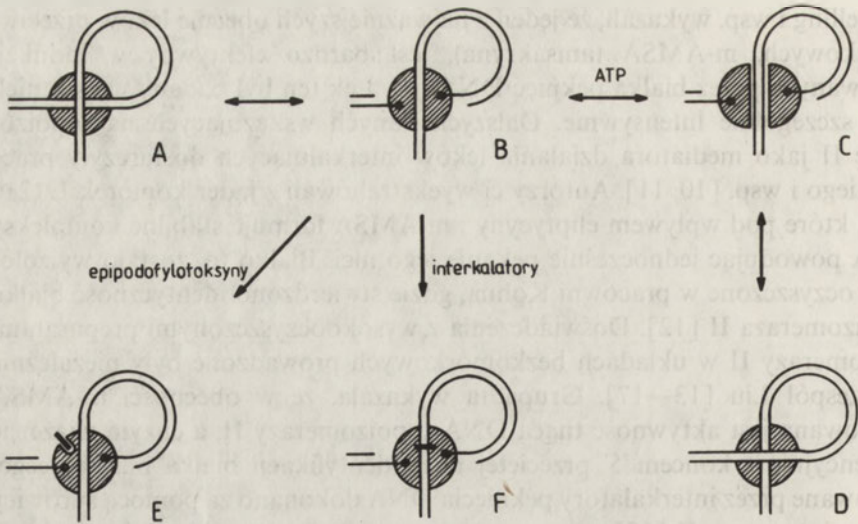
Wiele danych eksperymentalnych wykazuje, że cytotoksyczna aktywność niektórych stosowanych klinicznie leków przeciwnowotworowych wynika z ich zdolności do zaburzenia działania topoizomerazy II. Do leków tych należą czynniki interkalujące: m-AMSA, adriamycyna, aktynomycyna D oraz nie wiążące się z DNA epipodofylotoksyny. Mimo, że wymienione związki różnią się strukturalnie, ich wspólną cechą jest indukcja pęknięć DNA maskowanych przez białka (protein associated DNA breaks, lub: protein — concealed DNA breaks). Pęknięcia DNA maskowane przez białka nie są możliwe do wykrycia bez jego enzymatycznej hydrolizy. O obecności białka w miejscu pęknięcia heliksu świadczy zachowanie się DNA w trakcie alkalicznej elucji [4, 5]. Metoda ta służy do wykrywania niektórych typów uszkodzeń DNA i oparta jest o pomiar szybkości przechodzenia przez filtr zdenaturowanego alkaliem DNA [6]. Indukowane przez interkalatory (między innymi: eliptycynę, aktynomycynę D, adriamycynę, bromek etydyne) pęknięcia w DNA komórek L 1210 można było wykryć dopiero po trawieniu materiału zaadsorbowanego na filtrze za pomocą proteiny K [4, 5]. Sugerowało to, że białko połączone mocnym (kowalencyjnym?) wiązaniem z DNA, nie pozwala na rozejście się fragmentów pękniętych nici.

Jak wiadomo, czynniki interkalujące powodują rozwijanie się heliksu, co prowadzi do obniżenia liczby wiązania i przemian topologicznych DNA [7]. W pierwszych pracach na temat uszkodzeń DNA indukowanych przez interkalatory sugerowano, że pęknięcia DNA są efektem działania enzymów zmniejszających w ten sposób rozwinięcie heliksu, a białko maskujące pęknięcie, związane z DNA, może być takim właśnie enzymem [4, 5]. Ross i Bradley stwierdzili więcej pęknięć dwuniciowych niż jednoniciowych w DNA komórek L 1210 traktowanych eliptycyną i zaproponowali, że pęknięcia powoduje topoizomeraza II [8]. Zgodnie z tą koncepcją wywołane przez interkalacje zniekształcenie DNA aktywuje topoizomerazę II, a ostatni etap działania enzymu — połączenie nici DNA, blokowany jest przez obecny w miejscu pęknięcia ligand [8].

Zwelling i wsp. wykazali, że jeden z najważniejszych obecnie leków przeciwbiałczkowych, m-AMSA (amsakryna), jest bardzo efektywny w indukcji maskowanych przez białka pęknięć DNA [9]. Lek ten był badany w ostatnich latach szczególnie intensywnie. Dalszych danych wskazujących na topoizomerazę II jako mediatora działania leków interkalujących dostarczyły prace Filipskiego i wsp. [10, 11]. Autorzy ci wyekstrahowali z jąder komórek L 1210 białko, które pod wpływem eliptycyny i m-AMSA formuje stabilne kompleksy z DNA powodując jednocześnie pęknięcie jego nici. Białko to, zostało wyizolowane i oczyszczone w pracowni Kohna, gdzie stwierdzono identyczność białka z topoizomerazą II [12]. Doświadczenia z wysokooczyszczonymi preparatami topoizomerazy II w układach bezkomórkowych prowadzone były niezależnie przez zespół Liu [13—17]. Grupa ta wykazała, że w obecności m-AMSA stymulowana jest aktywność tnąca DNA topoizomerazy II, a enzym wiąże się kowalencyjnie z końcem 5' przeciętej nici. Identyfikacji białka maskującego, indukowane przez interkalatory pęknięcia DNA dokonano za pomocą surowicy antytopoizomerazy II [15].

Okazuje się, że nie tylko czynniki interkalacyjne powodują maskowane przez białka pęknięcia heliksu DNA. Epipodofylotoksyny: VP-16 oraz VM-26 — związki nie oddziałujące z DNA wywołują ten sam rodzaj uszkodzenia chromatynty. Odkrycie to zwróciło uwagę badaczy na możliwość bezpośredniej interakcji leków z topoizomerazą II.

Poglądy tłumaczące mechanizm indukcji maskowanych przez białka pęknięć przedstawiono na rycinie 1. Istotą działania interkalatorów oraz epipodofylotoksyn jest zablokowanie reakcji katalizowanej przez topoizomerazę II na etapie formowania przez enzym „kompleksu rozcinalnego”. Kompleks ten pod wpływem leków staje się stabilny, uniemożliwiając zachodzenie następnych etapów reakcji. Wydaje się, że epipodofylotoksyny działają wyłącznie na białko enzymatyczne, utrwalając kompleks enzymu z pękniętym DNA [16]. Mimo niewyjaśnionych jeszcze wielu szczegółów blokowania topoizomerazy II ssaków przez epipodofylotoksyny wydaje się prawdopodobne, że mechanizm ich działania podobny jest do mechanizmu działania kwasu nalidyksowego (składnik niektórych leków przeciwbakteryjnych). Związek ten oddziałując z bakteryjną topoizomerazą II zatrzymuje bowiem reakcję na tym samym, co epipodofylotoksyny etapie [1]. Warto w tym miejscu przypomnieć hipotezę Filipskiego [19]. Tłumaczyła ona efekty bilogiczne związków interkalujących i pokrewnych, bezpośrednim ich działaniem na enzymy odwracalnie nacinające i zamykające DNA. Badania ostatnich lat potwierdzają ten pogląd w odniesieniu do epipodofylotoksyn i topoizomerazy II [16, 18, 20]. O ile w przypadku VP-16 i VM-26 stabilizacja „kompleksu rozcinalnego” jest prawdopodobnie skutkiem efektu allosterycznego tych związków, to mechanizm działania interkalatorów jest mniej poznany. Nie wiadomo, jakie znaczenie dla zaburzenia działania topoizomerazy II, ma sam proces interkalacji ligandu, a jakie ewentualne jego oddziaływanie z białkiem enzymu. Starsze poglądy zakładające, że zniekształcenie przez interkalator heliksu DNA aktywuje topoizomerazę II [3] okazały się



Rycina 1. Schemat blokowania DNA topoiomerazy II przez niektóre leki przeciwnowotworowe. A. Wstępny kompleks enzymu z DNA; B. Kompleks „rozcinalny”: DNA z dwuniciowym pęknięciem, podjednostki enzymu związane są kowalencyjnie z końcami 5' DNA; C. Etap „przejścia nici”: Podjednostki enzymu rozsuwają się, a przez lukę między nimi przechodzi ramię pętli DNA; D. Odtworzenie wiązań fosfodwuestrowych heliksu DNA; E. Utrwalenie kompleksu „rozcinalnego” przez wiążące się z białkiem leki przeciwnowotworowe np. epipodofylotoksyny; F. Utrwalenie kompleksu „rozcinalnego” przez leki wiążące się z DNA np. interkalatory.

bledne. Wykazano bowiem niezależność formowania stabilizowanego przez leki kompleksu od stopnia superhelikalności [13, 17]. Trudno rozstrzygnąć, czy oddziaływanie między interkalatorem a topoiomerazą II zachodzi bezpośrednio [19, 20], czy też po związaniu ligandu z DNA [12, 17]. Jedną z nowszych hipotez zakłada wiązanie interkalacyjnego ligandu z fragmentem heliksu przechodzącym przez szczelinę między jednostkami enzymu [12]. W przypadku odpowiedniej struktury przestrzennej ligandu może wówczas powstać stabilny kompleks: ligand-DNA-enzym [12]. Stabilizacja takiego kompleksu może zachodzić przy przeciętej jednej lub obu niciach. Zależy to od właściwości sterycznego połączenia ligand-DNA [12]. O złożoności mechanizmu oddziaływania leków przeciwnowotworowych z topoiomerazą II świadczą też pojawiające się coraz częściej dane o wpływie leków na inne niż formowanie „kompleksu rozcinalnego” etapy reakcji [16, 20, 21].

Bardzo ważnym zagadnieniem w chemioterapii nowotworów jest zrozumienie mechanizmu zabijania komórek nowotworowych przez lek. Dla preparatów zaburzających działanie topoiomerazy II przyjmuje się istnienie związku między cytotoksycznością leków, a ich zdolnością do stabilizacji „kompleksu rozcinalnego” [19, 20, 22]. O słuszności tego poglądu świadczą wyniki doświadczeń przeprowadzonych z bromkiem etydyiny i o-AMSA. Oba te słabo cytotoksyczne interkalatory nie stabilizują „kompleksu rozcinalnego” i powodują bardzo nieznaczne pęknięcie nici DNA [9, 13, 17]. Efekt cytotoksyczny interkalatorów stabilizujących „kompleks rozcinalny” jest wielokrotnie sil-

niejszy od efektu bromku etydyny i o-AMSA oraz jest skorelowany z częstością pęknięć DNA [9, 23, 24]. Nie wiadomo dlaczego stabilizacja „kompleksu rozciąlnego” przez pewne leki przeciwnowotworowe prowadzi do śmierci komórek. Najnowsze badania wykorzystujące linie komórek zmutowanych opornych na czynniki interkalacyjne oraz epipodofylotoksyny potwierdziły pośrednictwo topoizomerazy II w cytotoksycznym działaniu leków, nie wyjaśniły jednak do końca mechanizmu ich działania. Pommier i wsp. [25] porównali ekstrakty jądrowe z komórek chomika opornych i wrażliwych na m-AMSA, stwierdzili dwukrotnie niższą zawartość topoizomerazy II w komórkach opornych i mniejszą zależność jej aktywności tnącej DNA od m-AMSA. Ponieważ oczyszczone enzymy z obu ekstraktów miały identyczne właściwości, autorzy wyrazili przypuszczenie, że w chromatynie obok topoizomerazy II znajdują się dodatkowe czynniki wpływające na ostateczny efekt działania leku [25]. Grupa Rossa używając innej linii opornych na interkalatory komórek chomika doszła do wniosku, że przyczyną oporności na leki mogą być zmiany właściwości białka enzymatycznego [20, 21]. Identyczny powód oporności zaproponowano dla komórek białaczki ludzkiej [26].

Innym niewyjaśnionym zagadnieniem pozostaje specyficzna wobec komórek nowotworowych cytotoksyczność leków blokujących topoizomerazę II. Wiadomo, że omawiane leki mają szerokie spektrum działania a ich efekty w komórkach proliferujących są silniejsze, niż w komórkach w stacjonarnej fazie wzrostu [27, 28]. Prawdopodobnie jest to wynikiem wyraźnie niższej zawartości topoizomerazy II w komórkach fazy stacjonarnej [27]. Inną możliwą przyczynę specyficzności omawianych leków wobec komórek proliferujących sugerują Wojnarowski i Beerman [29]. Autorzy ci wykazali preferencyjne powstawanie pęknięć obu nici w nowo syntezowanym (nascent) DNA pod wpływem VM-26, VP-16 i m-AMSA. Może to sugerować, że najbardziej „narażonym” na działanie leków blokujących topoizomerazę II jest replikujący DNA. Warto w tym miejscu dodać niedawno odkrytą zdolność m-AMSA, eliptycyny i adriamycyny do selektywnego blokowania jednego z etapów replikacji DNA SV-40 — rozdzielania się chromytd siostrzanych [30]. Pewne znaczenie przypisuje się również zależności efektu cytotoksycznego od fazy cyklu komórkowego. Najnowsze prace w tej dziedzinie wykazały, że zależność ta ma złożony, trudny do wyjaśnienia charakter, a dla pewnych linii komórkowych nie udaje się jej zaobserwować [28, 31].

W podsumowaniu należy stwierdzić, że topoizomeraza II rzeczywiście może być komórkowym receptorem niektórych leków przeciwnowotworowych, oraz że ich cytotoksyczne działanie polega na przechwytywaniu (trapping) enzymu, w momencie gdy jest on kowalencyjnie związany z pękniętym heliksem DNA. Utworzenie stabilizowanego przez lek kompleksu topoizomerazy II w DNA wydaje się być koniecznym warunkiem zabicia komórki nowotworowej.

*Artykuł otrzymano 22 sierpnia 1987 r.
Zaakceptowano do druku 7 marca 1988 r.*

PIŚMIENNICTWO

1. Gellert M., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 879—910.
2. Bauer W., Crick F.H.C., White J.H., (1980), *Sci. Am.*, **243**, 118—129.
3. Harland R.M., Weintraub H., Mc Knight S.L., (1983), *Nature*, **302**, 38—43.
4. Ross W.E., Glaubiger D.L., Kohn K.W., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **519**, 23—30.
5. Ross W.E., Glaubiger D., Kohn K.W., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **562**, 41—50.
6. Kohn K.W., (1979) w *Methods in Cancer Research*, (red. De Vita Jr. V.T., and Bush H.), tom 16, str. 291—345; Academic Press, New York.
7. Gniazdowski M., (1985), *Post. Biochem.*, **31**, 53—86.
8. Ross W.E., Bradley M.O., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **654**, 129—134.
9. Zwelling L.A., Michaels S., Erickson L.C., Ungerleider R.S., Nichols M., Kohn K.W., (1981), *Biochemistry*, **20**, 6553—6563.
10. Filipiński J., Kohn K.W., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **698**, 280—286.
11. Filipiński J., Yin L., Kohn K.W., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **741**, 116—122.
12. Minford J., Pommier Y., Filipiński J., Kohn K.W., Keerigan D., Mattern M., Michaelis S., Schwartz R., Zwelling L.A., (1986), *Biochemistry*, **25**, 9—16.
13. Nelson E.M., Tewey K.M., Lin L.F., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1361—1365.
14. Rowe T.C., Chen G.L., Hsiang Y.-H., Liu L.F., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 2021—2026.
15. Yang L., Rowe T.C., Nelson E.M., Liu L.F., (1985), *Cell*, **41**, 127—132.
16. Chen G.L., Yang L., Rowe T.C., Halligan B.D., Tewey K.M., Liu L.F., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13560—13566.
17. Tewey K.M., Chen G.L., Nelson E.M., Liu L.F., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9182—9187.
18. Glisson B.S., Smallwood S.E., Ross W.E., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **783**, 74—79.
19. Filipiński J., (1983), *FEBS Lett.*, **159**, 6—12.
20. Glisson B.S., and Ross W.E., (1987), *Pharmac. Ther.*, **32**, 89—106.
21. Glisson B.S., Gupta R., Smallwood-Kent S., Ross W.E., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 1934—1938.
22. Zwelling L.A., (1985), *Cancer Metast. Rev.*, **4**, 263—276.
23. Pommier Y., Zwelling L.A., Kao-Shan C.-S., Whang-Peng J., Bradley M.O., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 3143—3149.
24. Minford J., Kerrigan D., Nichols M., Shackney S., Zwelling L.A., (1984), *Cancer Res.*, **44**, 5583—5593.
25. Pommier Y., Kerrigan D., Schwartz R.E., Swack J.A., Mc Curdy A., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 3075—3081.
26. Bakic M., Beran M., Andersson B.S., Silberman L., Estey E., Zwelling L.A., (1986), *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **134**, 638—645.
27. Sullivan D.M., Latham M.D., Ross W.E., (1987), *Cancer Res.*, **47**, 3873—3979.
28. Zwelling L.A., Estey E., Silberman L., Doyle S., Hittelman W., (1987), *Cancer Res.*, **47**, 251—257.
29. Woynarowski J.M., Beerman T.A., (1987), 78th Annual Meeting of AACR, Atlanta, (1987), Proceedings p. 266.
30. Snapka R.M., (1987), *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **4**, 55—60.
31. Estey E., Adlakha R.C., Hittelman W.N., Zwelling L.A., (1987), *Biochemistry*, **26**, 4338—4334.

JANUSZ A. SIEDLECKI*

Polimerazy DNA komórek wyższych eukariontów

Eucaryotic DNA polymerases

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Zmiany poziomu polimeraz DNA w komórce w zależności od aktywności proliferacyjnej i od cyklu życiowego komórki**
- III. Występowanie polimeraz DNA w komórce**
- IV. Struktura polimeraz DNA**
 - IV-1. Polimeraza DNA α**
 - IV-2. Polimeraza DNA β**
 - IV-3. Polimeraza DNA γ**
 - IV-4. Polimeraza DNA δ**
 - IV-5. Terminalna transferaza deoksyrybonukleotydylowa**
 - IV-6. Polimerazy DNA komórek roślinnych**
 - IV-7. Wirusowe polimerazy DNA**
 - IV-7.1. Polimerazy wirusów DNA**
 - IV-7.2. Polimerazy wirusów RNA**
- V. Funkcja biologiczna polimeraz DNA**
- VI. Klonowanie genów polimeraz DNA**
- VII. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. DNA polymerases activity during cell proliferation and cell cycle**
- III. Cellular localization of DNA polymerases**
- IV. Structure of DNA polymerases**
 - IV-1. DNA polymerase α**
 - IV-2. DNA polymerase β**
 - IV-3. DNA polymerase γ**
 - IV-4. DNA polymerase δ**
 - IV-5. Terminal deoxyribonucleotidyl transferase**
 - IV-6. Plant DNA polymerases**
 - IV-7. Viral DNA polymerases**
 - IV-7.1. DNA polymerases of DNA viruses**
 - IV-7.2. DNA polymerases of RNA viruses**

*Dr, Centrum Onkologii-Instytut, Zakład Biologii Komórki i Terapii Doświadczalnej, Wawelska 15, 02-034 Warszawa tel. 23-25-49 adres prywatny: Magellana 7 m 9, 02-777 Warszawa

V. Biological role of DNA polymerases

VI. Molecular cloning of DNA polymerases

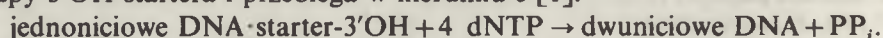
VII. Conclusion remarks

Wykaz skrótów: TdTaza — terminalna transferaza deoksyribonukleotydoma

I. Wstęp

Wraz z postępowaniem wiedzy i ilością gromadzonych informacji na temat replikacji i naprawy DNA zmieniły się poglądy na sposób realizacji tych procesów w komórce eukariotycznej. Wiemy już dziś, że zarówno replikacja jak i naprawa prowadzone są przez wieloskładnikowe kompleksy zawierające skomplikowany aparat enzymatyczny i białka nieenzymatyczne. Ciągłe jednak duże zainteresowanie towarzyszy podstawowemu elementowi tych kompleksów a mianowicie polimerazom DNA — enzymom syntetyzującym DNA.

Polimerazy DNA [E.C.2.7.7.7] katalizują reakcję syntezy DNA na drodze polikondensacji deoksyrybonukleotydo-5'-trifosforanów w obecności jednoniciowej matrycy i połączonego z nią startera. Synteza DNA rozpoczyna się od grupy 3'OH startera i przebiega w kierunku 5'[1]:



W komórkach wyższych eukariontów można wyróżnić trzy podstawowe grupy polimeraz DNA:

1. Polimerazy DNA zależne od DNA
2. Polimerazy DNA zależne od RNA
3. Polimerazy DNA niezależne od matrycy

Tabela 1

Słownictwo polimeraz DNA

Typ polimerazy	Stara nazwa	Nowa nazwa
Polimerazy DNA zależne od DNA	Cytoplazmatyczna polimeraza DNA Wysokocząsteczkowa polimeraza DNA 6—8 S polimeraza	Polimeraza DNA α Polimeraza α
	Jądrowa polimeraza DNA Niskocząsteczkowa polimeraza DNA 3,3 S polimeraza	Polimeraza DNA β Polimeraza β
	Mitochondrialna polimeraza DNA R-DNA polimeraza	Polimeraza DNA γ Polimeraza γ
	Brak	Polimeraza DNA δ Polimeraza δ
Polimerazy DNA zależne od RNA	Odwrotna transkryptaza Wirusowa R-DNA polimeraza	Rewertaza Odwrotna transkryptaza
Polimeraza DNA niezależna od matrycy	Terminalna dezoksynukleotydylo transferaza Terminalna transferaza	Terminalna transferaza deoksynukleotydoma Terminalna transferaza

Nomenklaturę tych enzymów zaproponowaną w 1975 r. [2] przedstawiono w tabeli 1.

Praca ta poświęcona jest przede wszystkim polimerazom DNA komórek prawidłowych wyższych eukariontów oraz niektórym polimerazom DNA pojawiającym się w komórce po infekcji wirusami DNA lub RNA.

II. Zmiany poziomu polimeraz DNA w komórce w zależności od aktywności proliferacyjnej i od cyklu życiowego komórki

Poziom aktywności polimerazowej w komórce zmienia się w cyklu życiowym komórki. We wczesnej fazie S obserwuje się w pierwszym rzędzie narastanie aktywności polimerazy DNA γ a następnie podążający za nim wzrost aktywności polimerazy DNA α . Polimeraza α osiąga maksimum aktywności w późnej fazie S po czym jej poziom w fazie G2 spada do wartości wyjściowej i pozostaje bez zmian aż do następnej fazy S. Wahania w poziomie aktywności polimerazy DNA β w czasie całego cyklu komórkowego są nieznaczące [3-7].

Jeżeli przyjmiemy poziom aktywności polimerazowej za 100 to względna procentowa zawartość aktywności polimeraz DNA α , β i γ w komórkach dzielących się wynosi odpowiednio 80—90%, 10—20% i 1—2% a w komórkach spoczynkowych 0—50%, 50—100% i 1—2% [8, 9]. Należy jednak pamiętać, że bezwzględna ilość aktywności polimerazowej (głównie polimeraza DNA α) w komórkach dzielących się jest kilka do kilkunastu razy większa niż w komórkach spoczynkowych [10-18].

III. Występowanie polimeraz DNA w komórce

Usytuowanie materiału genetycznego komórki w jądrze i mitochondrium (a w komórkach roślinnych dodatkowo w chloroplacie) sugerowało obecność polimeraz w obrębie tych organelli komórkowych. Tymczasem wyniki wczesnych prac były bardzo niejednoznaczne. Znaczna część autorów znajdowała polimerazę DNA α w cytoplazmie [14, 19—23], natomiast polimerazę DNA β w jądrze [19, 24, 25]. Zastosowanie w późniejszych latach innych technik izolowania organelli komórkowych wskazywało na obecność obu polimeraz w jądrze komórkowym [26—32].

Prawdziwy przełom przyniosło zastosowanie metod immunochemicznych. Stosując przeciwciała poliklonalne wykazano obecność polimerazy DNA α głównie w jądrze lecz również i w cytoplazmie [33]. W 1982 r. w laboratorium Korna wytworzono pierwsze przeciwciała monoklonalne przeciwko oczyszczonej do stanu homogennego polimerazie DNA α komórek KB [34]. Stosując te przeciwciała stwierdzono, że w komórkach WI 38, BeWo i KB 95% enzymu znajduje się w jądrze przez cały cykl komórkowy. Jedynie w trakcie mitozy wykazano jego obecność w cytoplazmie [35]. Dokładniejsze badania struktury

jądra wykazały, że polimeraza DNA α występuje w peryferyjnie ułożonych skupiskach skondensowanej chromatyny na obwodzie jądra [35]. Podobne wyniki uzyskano w dwu innych laboratoriach [36—38].

Stosując większość znanych technik frakcjonowania komórki wykazano obecność polimerazy DNA β w jądrze komórkowym [19, 24—26, 39]. Enzym ten związany jest z chromatyną [31—40] co potwierdziły również badania immunochemiczne [36]. Podobnie do polimerazy α sugeruje się przynajmniej chwilową obecność polimerazy β w cytoplazmie w czasie mitozy [41, 42].

Polimeraza DNA γ odnajdywana jest w jądrze komórkowym, cytoplazmie i mitochondrium, a w komórkach roślinnych także w chloroplastach [43]. Wydaje się, że enzym ten jest transportowany z cytoplazmy do organelli komórkowych.

IV. Struktura polimeraz DNA

IV-1. Polimeraza DNA α

W 1960 r. Bollum opisał izolowany z grasicy cielęcej enzym, który wykazywał aktywność polimerazową [44]. Początkowo nazywano go cytoplazmatyczną lub wielkocząsteczkową polimerazą DNA a później polimerazą DNA α . Dotychczas enzym ten wyizolowano z wielu różnych źródeł [11, 12, 16, 17, 19, 45, 46].

Oczyszczanie i badanie molekularnej budowy polimerazy DNA α natrafia na szereg trudności natury technicznej. Enzym wykazywał ogromną heterogenność, a oznaczana metodą wirowania w gradiencie sacharozy lub glicerolu jego stała sedymentacji wynosiła 6—8 S [8, 9, 16, 17]. Podobne rozbieżności obserwowano przy wyznaczaniu ciężaru cząsteczkowego[§] przez sączenie molekularne lub elektroforezę. C.c. wyznaczony w preparacie polimerazy α z komórek MOPC-104E wynosił 190 000, a z grasicy cielęcej 150 000 [8, 12, 45]. Porównanie promienia cząsteczki z ciężarem cząsteczkowym wyznaczonym metodą wirowania oraz zachowaniem się enzymu podczas sączenia przez Sephadex wskazuje na niesferyczny kształt cząsteczki polimerazy DNA α (18).

Elektroforeza preparatu polimerazy α na denaturującym żelu poliakryloamidowym wskazywała na podjednostkową budowę enzymu. Podobnie jednak jak w przypadku całego polipeptydu uzyskiwano różne dane o wielkości podjednostek; 47 000 i 50 000 w przypadku enzymu izolowanego z komórek MOPC-104E [45], 54 000 i 60 000 w przypadku enzymu izolowanego z regenerującej wątroby [17], 60 000 w przypadku enzymu z grasicy cielęcej [8, 12] oraz 66 000 i 76 000 w przypadku enzymu z komórek KB [16]. W 1981 r. Wilson i wsp. badając mapę trypsynową polimerazy DNA α i zestawiając ją z mapą trypsynową podjednostek sugerowali, że obserwowane na żelu podjednostki powstają wskutek proteolitycznego nacięcia polipeptydu o c.c. około 140 000 [47].

[§] porównaj odnośnik na str. 245.

Inną technikę pozwalającą na badanie budowy polimeraz DNA opracował Spanos i wsp. [48]. Technika ta pozwala na oznaczenie aktywności enzymatycznej polimeraz DNA po elektroforezie w warunkach denaturujących. Niezależnie od źródła z którego była izolowana polimeraza α obserwowano pasmo aktywności enzymatycznej odpowiadające ciężarowi cząsteczkowemu 125 000.

Zastosowanie techniki przeciwciał monoklonalnych do badania budowy enzymu pozwoliło na stwierdzenie, że w większości badanych preparatów polimerazy DNA występuje polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym około 190 000 [49]. Polipeptyd ten zawiera bardzo silnie skompleksowane dwie aktywności enzymatyczne: polimerazę DNA α (c.cz. 120 000) i tzw. primazę (c.cz. 47 000). Primaza jest polimerazą RNA mającą zdolność do budowania krótkich fragmentów RNA startera [51—58]. Dalsze badania wykazały, że kompleks ten jest częścią większego kompleksu enzymatycznego zwanego holoenzymem polimerazy α kompleksem replikacyjnym lub w skrócie replikozą. W skład kompleksu replikacyjnego wchodzi prawdopodobnie następujące aktywności enzymatyczne: topoizomeraza DNA II — enzym zdolny do rozwijania superhelikalnie zwiniętego DNA [59], helikaza DNA II — enzym rozwijający helisę DNA [60], aktywność wiążącą hipotetyczną cząsteczkę-starter Ap_4A^{\S} [61], aktywność egzonukleazy $3' \rightarrow 5'$ i $5' \rightarrow 3'$ [51] oraz cały szereg innych białek o słabo poznanej funkcji. Skład replikaz izolowanych z różnych źródeł jest zadziwiająco podobny [53, 58, 62]. Jedną z najlepiej scharakteryzowanych jest replikaza izolowana z komórek muszki owocowej. Zawiera ona polipeptydy: α — o c.cz. 182 000, β — o c.cz. 60 000, γ — o c.cz. 50 000 oraz polipeptyd o c.cz. 73 000, który zachowuje się przy rozdziale chromatograficznym tak samo jak pierwsze trzy ale antygenowo nie jest im pokrewny^{§§} [58]. Podjednostka α ma aktywność polimerazy DNA α a podjednostki β i γ wpływają na zwiększenie zdolności polimerazy α do syntezy DNA bez oddysocjowania od matrycy (ang. *processivity*).

Z przedstawionych powyżej danych wyłania się pewien ogólny obraz budowy kompleksu replikacyjnego. Podstawowym jego elementem jest tzw. kompleks rdzeniowy, który ma aktywność polimerazy α i primazy. Ciężar cząsteczkowy kompleksu rdzeniowego jest większy niż 120 000 a prawdopodobnie równy 180 000—190 000. Polipeptydy o ciężarach cząsteczkowych mniejszych niż 120 000 a większych niż 50 000 prawdopodobnie powstają wskutek proteolitycznej degradacji kompleksu rdzeniowego. Polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym około 120 000 jest prawdopodobnie odpowiednikiem kompleksu rdzeniowego pozbawionego aktywności primazy. W skład kompleksu replikacyjnego wchodzi około 10—15 białek, z których oprócz kompleksu rdzeniowego, którego

[§] Ap_4A — diadenozyno $5'5''' - P^1 - P^4$ — tetrafosfan. Związek uważany za wewnątrzkomórkową molekułę sygnałową. Wg hipotezy niektórych autorów narastanie ilości Ap_4A w fazie G1 do krytycznego poziomu ($\sim 1 \mu M$) powoduje zainicjowanie syntezy DNA i przejście komórki z fazy G1 do fazy S. Uważa się, że syntezy Ap_4A jest uzależniona od wewnątrzkomórkowego poziomu ATP.

^{§§}Wszelkie podobieństwo oznaczeń stosowanych przez autorów do nomenklatury polimeraz DNA jest całkowicie przypadkowe.

obecność stwierdzono ponad wszelką wątpliwość, obecność pozostałych aktywności enzymatycznych, jak np. topoizomerazy II, ATPazy oraz białek nieenzymatycznych takich jak białka wiążące jedno lub dwuniciowe DNA, nie jest jeszcze w pełni udokumentowana.

Istnieją również pewne dane wskazujące na potranslacyjną modyfikację polimerazy DNA α . Polipeptyd rdzeniowy ulega glikozylacji [63, 64] i fosforylacji [65]. Stopień ufosforylowania polipeptydu rdzeniowego reguluje aktywność enzymatyczną polimerazy DNA α . Zarówno fosforylacja jak i glikozylacja mogą być prawdopodobną przyczyną obserwowanej heterogenności polipeptydu rdzeniowego.

IV-2. Polimeraza DNA β

W 1971 r. Weissbach i wsp. opisali niskocząsteczkową polimerazę DNA wyizolowaną z jąder komórek *HeLa* [19]. W tym samym czasie opisano podobny enzym izolowany z jąder komórek wątroby szczura [66]. Enzym ten nazywany później polimerazą DNA β wyizolowano jak dotychczas z wielu źródeł [18—20, 67—70]. Obecności tego enzymu nie stwierdzono u pierwotniaków, wyższych roślin i grzybów [71—73] i w zarodkach owadzi [49, 88]. Chociaż, jak już wspomniano, ilość polimerazy DNA β w jądrze jest znacznie mniejsza niż ilość polimerazy DNA α , jej oczyszczanie nie było kłopotliwe. Wyizolowany z jąder komórkowych enzym ma ciężar cząsteczkowy około 40 000 [70, 74, 75]. Ciężary cząsteczkowe określone metodą sączenia przez *Sephadex* i wirowania w gradiencie sacharozowym są podobne, co wskazuje na sferyczny kształt cząsteczki enzymu.

Analiza podjednostkowej budowy enzymu zarówno na żelu poliakrylamidowym jak i metodą badania aktywności na żelu denaturującym wskazywała, że enzym zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o ciężarze cząsteczkowym około 40 000 [75, 76]. Mapa trypsynowa homogennej polimerazy β kurczęcia i szczura wykazywała bardzo dużą homologię fragmentów peptydowych wskazując na dużą ewolucyjną stałość białka enzymatycznego [74]. Potwierdzono to stosując monospecyficzne przeciwciała przeciwko homogennej polimerazie DNA β i wykazując reakcję krzyżową z polimerazami DNA β innych kręgowców [72, 77, 78].

Osobnego omówienia wymaga polimeraza DNA β izolowana z komórek wątrobiaka Novikoff'a [69, 79, 80]. Enzym ten ma ciężar cząsteczkowy 32 000. Tworzy on kompleks w stosunku 1:1 z egzonukleazą zwaną DNazą V, hydrolizującą dwuniciowy DNA w obu kierunkach 3' \rightarrow 5' i 5' \rightarrow 3' [80]. Ponadto z ekstraktu wątrobiaka Novikoff'a wydzielono pięć chromatograficznie różnych frakcji o aktywnościach ATPazowych. Jedną z nich, nazwaną ATPazą III, oczyszczoną została do stanu homogenności [81]. Enzym ten jest dimerem podjednostki o ciężarze cząsteczkowym 65 000. Nie posiada on aktywności topoizomerazy DNA II i helikazy. Za to swoiście stymuluje polimerazę DNA β . Stymulacja ta jest nawet większa w obecności białka wiążącego swoiście

jednociowy DNA [81, 82]. Podobną aktywność ATPazy opisali Boxer i Korn [83], choć w tym przypadku stymulowała ona obie polimerazy DNA α i β .

Podsumowując wydaje się wielce prawdopodobne, że podobnie jak w przypadku polimerazy DNA α , istnieje w komórce wieloskładnikowy kompleks naprawczy, zawierający oprócz polimerazy DNA β egzonukleazę $3' \rightarrow 5'$ i $5' \rightarrow 3'$, ATPazę III, białka wiążące się z jedno i dwuniciowym DNA [80, 83—86] i inne bliżej nieznanne składniki.

IV-3. Polimeraza DNA γ

W 1968 r. wyizolowano z frakcji mitochondrialnej enzym nazwany początkowo polimerazą DNA mitochondrialną [87]. Próby jego oczyszczenia nie doprowadziły jednak do otrzymania homogennego preparatu [88, 89]. W 1973 r. opisano nową izolowaną z frakcji jądrowej polimerazę DNA, którą nazwano polimerazą DNA γ [90]. Cechą szczególną tego enzymu była zdolność do syntezy z dużą wydajnością na matrycy poli(A)·oligo(dT)_{12–18}. Ze względu na tę szczególną własność enzym nazwano również komórkową R-DNA polimerazą. W 1977 r. doniesiono prawie jednocześnie, że polimeraza DNA γ jest tożsama z enzymem izolowanym z mitochondrium [91—93]. Polimerazę DNA γ wyizolowano z wielu różnych źródeł [94—98].

Badania strukturalne nad prawie homogennym preparatem polimerazy DNA γ izolowanym z embrionów kurczęcia wykazały, że jego ciężar cząsteczkowy wynosi 180 000. Enzym jest tetramerem podjednostki o c.cz. 47 000. Aktywność katalityczną wykazuje zarówno monomer, dimer jak i pełna tetrameryczna forma enzymu [97]. Inny wysokooczyszczony preparat polimerazy DNA γ izolowany z zarodków muszki owocowej, ma dwa polipeptydy; jeden o ciężarze 125 000 wykazujący aktywność polimeryzującą i drugi o c.cz. 35 000 bez aktywności enzymatycznej. Stała sedimentacji tego enzymu wynosi 7,6 S, co odpowiada ciężarowi cząsteczkowemu 180 000 i wydaje się sugerować, że białko 35 000 jest zasocjowane z podjednostką katalityczną [98]. Stosunkowo niski ciężar cząsteczkowy polimerazy DNA γ jelita cienkiego królika (105 000) może być wynikiem rozpadu multimerycznej formy enzymu do formy dimerycznej [96]. Podobny, niski ciężar cząsteczkowy obserwowano dla preparatów polimerazy DNA γ izolowanych z komórek *HeLa* [94] i ludzkich limfocytów [95]. Jeszcze niższy ciężar cząsteczkowy stwierdzono dla enzymu z komórek wątroby szczura. Oznaczony metodą wirowania ciężar cząsteczkowy wynosił 60 000 [91]. Być może w tym przypadku obserwowano aktywność formy monomerycznej.

IV-4. Polimeraza DNA δ

W 1976 r. Byrns i wsp. opisali zależną od DNA polimerazę wyizolowaną ze szpiku kostnego królika [99, 100]. Enzym ten, nazwany polimerazą DNA δ , odróżniał się od wszystkich znanych dotychczas polimeraz DNA posiadaniem dodatkowej aktywności egzonukleolitycznej $3' \rightarrow 5'$. Początkowo sądzono, że

enzym ten występuje jedynie w szpiku kostnym. Później jednak, wraz z dopracowaniem techniki oczyszczania tego enzymu znaleziono go w komórkach szpiczaka mysiego i grasicy cielęcej. Izolowany ze szpiku kostnego królika enzym, oczyszczony do stanu homogennego okazał się pojedynczym polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym 122 000 [103]. Polimeraza DNA δ wyizolowana z komórek szpiczaka miała ciężar cząsteczkowy 190 000, a na denaturującym żelu poliakryloamidowym obserwowano polipeptydy (podjednostki lub produkty proteolizy) o ciężarach cząsteczkowych 48 000 i 52 000. Enzym izolowany z grasicy cielęcej miał c.cz. 152 000, a na żelu denaturującym obserwowano polipeptydy 49 000 i 60 000. W 1986 r. opisano izolowane z grasicy cielęcej dwa typy polimerazy DNA δ wykazujące dodatkowo aktywność primazy. Polimeraza δ I ma ciężar cząsteczkowy 240 000 a polimeraza δ II c.cz. 290 000 (104). Oba enzymy były stymulowane przez wysokie stężenia ATP [105]. Również z grasicy cielęcej wyizolowano białko specyficznie stymulujące polimerazę δ [106]. Białko to, zidentyfikowane jako cyklina, bierze udział w bliżej niesprecyzowany sposób w syntezie DNA [107—109].

Ciężary cząsteczkowe różnych form molekularnych polimeraz DNA

Nazwa FORMY	Ciężar cząsteczkowy polimerazy DNA			
	α	β	γ	δ
Holoenzym	$\geq 500\ 000$	nieznany	nieznany	nieznany
Kompleks rdzeniowy	190 000	nieznany	nieznany	190 000
Polipeptyd aktywny katalitycznie	120 000	40 000	180 000	120 000
Podjednostka	Brak ostatecznych danych	nie ma	47 000	brak danych

Polimeraza DNA δ wykazuje ogromne podobieństwo w swojej charakterystyce biochemicznej do polimerazy DNA α . Oba enzymy posiadają:

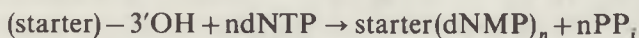
- i. wysoki zbliżony do siebie ciężar cząsteczkowy,
- ii. stowarzyszoną aktywność primazy,
- iii. podobną wrażliwość na inhibitory z wyjątkiem p-n-butylo-fenilo-dGTP (BuPdGTP), jedyne go analogu nukleotydowego różnicującego te dwa enzymy [110],
- iiii. podobną zdolność do przyłączania deoksynukleotydów bez oddysocjowywania od nici matrycy (ang. *processivity*).

Wydaje się zatem prawdopodobne, że mogą one powstawać z tego samego kompleksu enzymatycznego, od którego, w trakcie procedur oczyszczania na skutek np. proteolizy aktywność egzonukleolityczna zostaje odszczepiona. Fakt, że polimeraza DNA δ stanowi w pewnych warunkach 30—40% całkowitej

aktywności polimeryzującej w komórce grasiczej [104, 105] wydaje się potwierdzać taką hipotezę.

IV-5. Terminalna transferaza deoksyrybonukleotydylowa (TdTaza)

Terminalna transferaza (2.7.7.31) występuje w komórkach grasicy i grasiczo-zależnych [111, 112]. Jej obecność stwierdzono również w szpiku kostnym [113], komórkach linii Molt 4 [114] oraz w komórkach różnych białaczek [115, 116]. Ta szczególna polimeraza DNA nie wymaga obecności matrycy i syntetyzuje DNA przez dołączanie reszt deoksyrybonukleotydylowych do grupy 3'OH startera wg następującej reakcji:



Enzym ten może syntetyzować łańcuch polideoksyrybonukleotydyowy w obecności zarówno jednego (homopolimer), jak i w obecności dwóch, trzech i czterech deoksynukleotydów (heteropolimery).

Terminalna transferaza wydzielona z ludzkich i mysich komórek limfoblastycznych ma ciężar cząsteczkowy 58 000—60 000 [117]. Podobny ciężar cząsteczkowy enzymu obserwowano w homogenatach grasic: cielęcej, szczurzej, mysiej, kocięj i kurczęcia [118]. Tymczasem dalsze oczyszczanie enzymu do stanu homogenego prowadzi do otrzymania preparatów o ciężarze cząsteczkowym 32 000. W czasie elektroforezy na żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących polipeptyd ten rozdziela się na dwa o c.c.z. odpowiednio 26 000 i 8 000. Polipeptyd 26 000 wykazuje aktywność enzymatyczną [119]. Badania strukturalne wykazały jednak, że polipeptydy 32 000, 26 000 i 8 000, jak i obserwowane w homogenatach grasiczych polipeptydy 44 000 i 42 000 powstają w wyniku proteolitycznej degradacji polipeptydu 58 000 [118, 120].

IV-6. Polimerazy DNA komórek roślinnych

Chociaż pierwsze próby oczyszczania polimeraz DNA komórek roślinnych pochodzą z połowy lat siedemdziesiątych [121—124] ich charakterystyka ciągle jeszcze jest we wstępnej fazie. Częściowo oczyszczone preparaty otrzymano z kielków pszenicy [121], szpinaku (*Spinacia oleacea*) [124—126], grochu (*Pisum sativum*) [127], narośli guzowatej roślin (ang. *crown gall tumor*) [123] i innych. W przebadanym dotychczas materiale roślinnym wykryto obecność polimeraz DNA typu α i γ [121—126]. Obecność polimerazy DNA β w jądrach komórek roślinnych stwierdzają tylko niektórzy autorzy [128, 129].

IV-7. Wirusowe polimerazy DNA

IV-7.1. Polimerazy wirusów DNA

Małe wirusy takie jak Polyoma lub SV 40 nie mają własnej polimerazy DNA. Korzystają one z systemu replikacyjnego komórki gospodarza [130]. Ich wniknięciu do komórki towarzyszy wzrost poziomu komórkowych polimeraz

DNA [131]. Infekcji komórki przez większe wirusy takie jak adenowirus, wirus opryszczki (Herpes Simplex Virus — HSV), czy wirus ospy towarzyszy pojawienie się nowej polimerazy DNA, niezależnie od wzrostu aktywności komórkowych polimeraz DNA wywołanych infekcją [8].

W 1966 r. Keir i wsp. opisali nową polimerazę DNA pojawiającą się w komórkach zainfekowanych wirusem opryszczki typu 1 (HSV 1) [132]. Częściowo oczyszczony enzym miał ciężar cząsteczkowy 180 000—200 000 [133]. Podobny ciężar cząsteczkowy miał enzym oczyszczony z komórek zainfekowanych wirusem typu 2 (HSV 2) [131]. Dalsze badania wykazały, że polimeraza DNA wirusa opryszczki jest pojedynczym polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym 150 000 [134, 135]. Enzym jest dodatkowo zasocjowany z dwoma innymi polipeptydami o c.cz. 74 000 i 29 000, których funkcja jest nieznana. Podobnie jak polimeraza δ polimeraza wirusa HSV ma aktywność egzonukleolityczną 3' → 5' [134].

Polimeraza izolowana z komórek zainfekowanych wirusem ospy jest również pojedynczym polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym 110 000-115 000 [136, 137]. Enzym ma również aktywność egzonukleolityczną 3' → 5' [136].

Polimerazy wirusów DNA mają charakterystykę biochemiczną podobną do polimeraz komórkowych. Różnią się od nich głównie tym, że są stymulowane przez sole w bardzo wysokim stężeniu [131].

IV-7.2. Polimeryazy wirusów RNA

Infekcji wirusem RNA (retrowirusem) komórki zwierzęcej towarzyszy pojawienie się polimerazy DNA zależnej od RNA. Enzym ten nazywany jest odwrotną transkryptazą lub rewertazą. Jego budowa jest dosyć skomplikowana. Odwrotna transkryptaza wirusa AMV zbudowana jest z dwóch podjednostek α i β o ciężarach cząsteczkowych odpowiednio 65 000 i 95 000. Aktywna forma enzymu powstaje z dwóch podjednostek β . Odszczepiony od jednego z łańcuchów β silnie ufosforylowany fragment B ma ciężar cząsteczkowy 32 000 i wykazuje aktywność endonukleazy. Powstała po odszczepieniu fragmentu B podjednostka α ma dwie aktywności: polimerazy DNA i rybonukleazy H. Długotrwała proteoliza podjednostki α prowadzi do powstania tzw. fragmentu A o ciężarze cząsteczkowym 24 000, który ma jedynie aktywność rybonukleazy H. Dla maksymalnej aktywności odwrotnej transkryptazy AMV konieczny jest kompleks podjednostki α i β , chociaż sama podjednostka β ma również aktywność enzymu [1, 138].

Odwrotna transkryptaza izolowana z komórek mysich zainfekowanych wirusem MLV zbudowana jest z pojedynczej podjednostki o ciężarze cząsteczkowym 80 000 mającej aktywność polimerazy DNA i RNazy H [138, 139].

V. Funkcja biologiczna polimeraz DNA

Obecność w prawidłowej komórce ssaka różnych polimeraz DNA nasuwa pytanie w którym procesem biologicznym: replikacją jądrowego DNA, replikacją mitochondrialnego DNA i naprawą DNA związane jest działanie poszczególnych enzymów. W przeciwieństwie do komórek prokariotycznych, gdzie dostępność mutantów polimeraz DNA pozwoliła na ustalenie ich fizjologicznej roli [140, 141], w komórkach wyższych eukariontów opisano dotychczas jednego temperaturo-zależnego mutantu polimerazy DNA α [142]. Wnioski dotyczące funkcji polimeraz DNA komórek eukariotycznych muszą więc być wyciągane z badań pośrednich.

Wysoka aktywność polimeraz DNA α i γ w komórce proliferującej w porównaniu z komórką spoczynkową [8, 9] oraz wzrost poziomu tych enzymów w fazie S cyklu życiowego komórki [4, 6] skłaniają do postawienia hipotezy o udziale polimerazy DNA α w replikacji jądrowego DNA. Hipotezę tę potwierdzają następujące fakty eksperymentalne. Po pierwsze synteza replikacyjna jest hamowana prawie w 100% przez specyficzny inhibitor polimerazy DNA α — afidikolinę [143]. Po drugie polimeraza α jako jedyna z komórkowych polimeraz DNA wykazuje zdolność do przedłużania RNA startera [144]. Uważa się, że taki starter, budowany *in vivo* przez primazę, enzym silnie zasocjowany z polimerazą α w tzw. kompleksie rdzeniowym, inicjuje syntezę fragmentu Okazaki [1]. Po trzecie wykazano, że replikujące chromosomy małych wirusów DNA zawierają zasocjowaną z nimi komórkową polimerazę DNA α [145—148]. W przypadku wirusa SV40 polimeraza α stanowi 95% [146], a w przypadku adenowirusa 2 jedynie 50% [149] całkowitej aktywności polimeraz obecnych w kompleksie replikacyjnym.

Również badania immunochemiczne dostarczają faktów przemawiających na korzyść hipotezy o replikacyjnej funkcji polimerazy DNA α . Mikroiniekcja przeciwciał monoklonalnych przeciwko polimerazie DNA α do jądra komórki powoduje zahamowanie syntezy replikacyjnej. Jednoczesne wprowadzenie innych kontrolnych przeciwciał monoklonalnych nie wpływa na poziom syntezy DNA [150, 151].

Ostatnio jednak pojawiły się doniesienia o możliwej roli polimerazy δ w replikacji DNA i ewentualnej kooperacji polimeraz α i δ . Dane te wymagają jednak dalszego potwierdzenia [108, 109].

Obecność polimerazy DNA γ w jądrze komórkowym stanowi do dziś nie wyjaśniony problem. Enzym ten lokalizowany jest ponadto w mitochondrium i chloroplacie [91, 93, 125, 127, 152]. Replikacja DNA mitochondrialnego przebiega według mechanizmu przemieszczającej się pętli [1]. Synteza rozpoczyna się od utworzenia w punkcie startu (ang. origin) pętli (ang. D-loop). Następnie odpowiednia polimeraza katalizuje syntezę nowopowstającego polinukleotydu na matrycy DNA, jednocześnie powodując przemieszczanie się pętli przez odsuwanie niereplikowanej nici. Replikacja przebiega w sposób ciągły aż do powielenia znacznej części genomu. Wówczas następuje niezależna replikacja

drugiej nici. Badania nad mechanizmem działania polimerazy DNA γ wykazały, że enzym ten ma zdolność syntezy bardzo długich fragmentów DNA (nawet do 4000 nukleotydów) [153]. Zdolność katalizowania syntezy bez oddysocjowania od matrycy jest szczególną cechą polimerazy γ . Dla porównania polimerazy α i β zwykle syntetyzują odcinki od kilku do kilkuset nukleotydów. W świetle powyższych danych wydaje się, że udział polimerazy DNA γ w replikacji mitochondrialnego i chloroplastowego DNA nie podlega dyskusji. Pozostaje jednak ciągle kwestia roli tego enzymu w jądrze komórkowym. Obecność polimerazy γ w replikujących chromosomach wirusów SV40 i adenowirus 2 wydaje się wskazywać na udział w replikacji wirusowego DNA. Zarówno DNA wirusowy jak i DNA w organellach komórkowych są w postaci kołowego DNA. Można więc zaryzykować hipotezę, że polimeraza DNA γ katalizuje replikację pozachromosomalnych kołowych DNA, niezależnie od tego czy są one zlokalizowane w jądrze czy w organellach komórkowych.

Brak wyraźnych różnic w zawartości polimerazy DNA β w komórce spoczynkowej i proliferującej, a także w miarę stały poziom podczas cyklu życiowego komórki [3—7] sugerował udział tego enzymu w naprawie DNA. W limfocytach stymulowanych fitohemaglutyniną wykazano, że najwyższy poziom polimerazy β przypada na okres maksymalnej zdolności do syntezy naprawczej i minimalnej zdolności do syntezy replikacyjnej [7]. Również w jądrach neuronów 60-dniowych szczurów pobudzonych do syntezy naprawczej promieniowaniem ultrafioletowym stwierdzono obecność jedynie polimerazy DNA β [154].

W świetle powyższych danych pod koniec lat siedemdziesiątych rysował się dosyć klarowny schemat funkcji biologicznej polimeraz DNA. Polimeraza α uznana została za enzym uczestniczący w replikacji jądrowego DNA, polimeraza β uznana została za enzym uczestniczący w naprawie DNA a polimeraza γ za enzym odpowiedzialny za syntezę DNA w mitochondrium i chloroplastie. Jednak dalsze badania z lat osiemdziesiątych, głównie z zastosowaniem specyficznych inhibitorów polimeraz DNA wykazały, że w syntezie naprawczej mogą uczestniczyć polimerazy DNA α i β . O tym który z enzymów zsyntetyzuje nowopostające DNA decyduje rodzaj czynnika uszkodzającego i typ uszkodzenia [155—159]. Sugeruje się nawet, że w naprawie DNA mogą uczestniczyć obie polimerazy, działając jedna po drugiej [156]. Ta sugestia znajduje pewne oparcie w danych doświadczalnych dotyczących zdolności do katalizowania syntezy naprawczej DNA zawierającego przerwy i nacięcia w strukturze dwupasmowej. Wykazano w nich, że reakcję syntezy naprawczej mogą podjąć obie polimerazy DNA α i β w przypadku, gdy wielkość przerwy przekracza 30 nukleotydów [46]. Gdy przerwa w DNA jest mniejsza lub gdy DNA zawiera jedynie nacięcie w pojedynczej nici, syntezę naprawczą jest w stanie podjąć jedynie polimeraza DNA β [160—164]. Ponadto ustalono, że synteza prowadzona przez polimerazę DNA β na matrycy zawierającej małą przerwę nie kończy się po jej wypełnieniu, lecz biegnie dalej po odsunięciu nici niereplikowanej (ang. *displacement mechanism*). Nowopowstały produkt jest znacznie

dłuższy od przerwy w matrycy i jest komplementarny do nici matrycy poza przerwą [165]. Podobną zdolność polimerazy β obserwowano, gdy matrycą był DNA nacięty przez apurynową endonukleazę II z komórek HeLa, powodującą powstanie w DNA przerwy jednonukleotydowej [83]. Dodanie DNazy V będącej egzonukleazą $3' \rightarrow 5'$ i $5' \rightarrow 3'$ (patrz powyżej) specyficzną dla dwuniciowego DNA, znacznie zwiększyło tę syntezę i upodobiło ją do syntezy z przesuwaniem nacięcia (ang. nick translation) charakterystycznej dla polimerazy I komórek *E. coli* — enzymu o znanej reperacyjnej funkcji w komórkach prokariotycznych [84].

Na zakończenie warto wspomnieć jeszcze o pracach badających wierność kopiowania matrycy przez polimerazy DNA. W oparciu o te badania ustalono, że enzymy biorące udział w replikacji cechuje wyższa wierność kopiowania. Najwyższa jest ona tam gdzie brak jest systemu naprawczego (mitochondrium, chloroplast). Zdziwienie budzi jedynie fakt, że polimerazę β uznawaną za jeden z enzymów naprawczych cechuje bardzo niska wierność kopiowania. Ale też trzeba pamiętać, że synteza naprawcza obejmuje stosunkowo niewielkie fragmenty DNA w porównaniu z replikacją, a więc możliwość popełnienia pomyłki jest wielokrotnie mniejsza [166, 167].

Tabela 3

Białka biorące udział w tworzeniu kompleksu replikacyjnego i naprawczego

Białka kooperujące z aktywnością polimeryzującą	Polimeraza DNA			
	α	β	γ	δ
Primaza	+	—	bd	+
Egzonukleaza $5' \rightarrow 3'$	+	+	bd	—
Egzonukleaza $3' \rightarrow 5'$	+	+	bd	+
ATPaza	+	+	bd	+
Topoizomeraza DNA	+	bd	bd	bd
Helikaza DNA	+	bd	bd	bd
Białko stabilizujące jednoniciowe DNA	+	+	bd	bd
Białko stabilizujące jednoniciowe i dwuniciowe DNA	+	+	bd	bd
Aktywność wiążąca molekułę Ap_4A	+	—	—	bd

+ — stwierdzono obecność przynajmniej w jednym z badanych kompleksów

— — brak obecności

bd — brak danych

VI. Klonowanie genów polimeraz DNA

Jednym z najbardziej obiecujących podejść do badań nad biologią molekularną polimeraz DNA jest wykorzystanie technik rekombinacyjnego DNA. Pozwalają one na wyizolowanie genu polimerazy, poznanie jego struktury, a następnie otrzymanie większych ilości homogennego preparatu enzymatycznego w określonym systemie ekspresji genu.

Prace nad sklonowaniem genów polimeraz DNA rozpoczęły się we wczesnych latach osiemdziesiątych. Izolowane z komórek eukariotycznych poli(A)⁺ RNA przeprowadzano przy pomocy odwrotnej transkryptazy w cDNA. To DNA rekombinowano z DNA bakteriofaga λ szczep gt 11. W szczepie tym zrekombinowane DNA ulega ekspresji. Tak otrzymaną bibliotekę genów można więc przeszukiwać stosując odpowiednie przeciwciało. Przeszukując bibliotekę genów otrzymaną z ludzkich komórek limfoblastycznych przy pomocy przeciwciała przeciwko terminalnej transferazie deoksynukleotydów znaleziono klon bakteryjny w którym ekspresji ulegał gen TdTazy (2100 pz) [168]. Rekombinacja cDNA kodującego pełną sekwencję enzymu z plazmidem pUC 19, a następnie transformacja komórek *E. coli* tak otrzymanym rekombinacyjnym DNA, pozwoliła na otrzymanie tzw. rekombinacyjnej terminalnej transferazy [169]. Dalsze badania nad tym enzymem są w toku.

Przeszukując bibliotekę genów otrzymaną z cDNA mózgu nowonarodzonych szczurów w λ gt 11 przy pomocy poliklonalnego przeciwciała przeciwko polimerazie DNA β znaleziono klon bakteryjny w którym ekspresji ulegał gen polimerazy DNA β [170]. Zrekombinowany cDNA liczył 1197 par zasad. Ramka odczytu rozpoczynała się 44 nukleotydy od 5' końca i odpowiadała białku liczącemu 318 aminokwasów. Odpowiada to ciężarowi cząsteczkowemu 36375. Stosując ten fragment jako sondę molekularną wyizolowano z biblioteki genów ludzkich komórek teratocarcinoma klon zawierający fragment DNA liczący 1257 pz [171]. Zawierał on identyczną ramkę odczytu (318 aminokwasów) a nukleotydowa homologia pomiędzy sekwencjami obu fragmentów sięgała 95%. Dalsze badania pozwoliły na zlokalizowanie genu ludzkiej polimerazy β w chromosomie 8 w położeniu 8pter-2q22 (na krótkim ramieniu w pobliżu ramienia długiego). Badania genomowego DNA wskazują, że gen polimerazy, wielkości rzędu 25—30 kpz, występuje w pojedynczej kopii [172]. Analiza komputerowa sekwencji nukleotydowej genu polimerazy DNA β ujawniła istnienie obszaru (od 42 do 215 nukleotydu) o znacznej homologii (72%) z regionem 195—366 w genie innej komórkowej polimerazy DNA a mianowicie TdTazy [173]. Zdaniem autorów tak wyraźna homologia może sugerować istnienie wspólnego praprzodka-genu obu tych enzymów. Badania nad ekspresją genu polimerazy DNA β ujawniły istnienie przynajmniej dwu transkryptów 1,4 i 4,0 kz u szczura, lecz tylko jeden transkrypt 1,4 kz był obserwowany w komórkach teratocarcinoma i fibroblastach ludzkich [170, 171, 174]. Transkrypt 1,4 kz stanowił w komórkach fibroblastów ludzkich około 0,004% całej puli mRNA. Odpowiada to mniej więcej 6-ciu cząsteczkom mRNA na komórkę [175].

Przeszukując bibliotekę genów skonstruowaną z cDNA grasicy cielęcej w λ gt 11 przy pomocy przeciwciała przeciwko holoenzymowi polimerazy DNA α znaleziono klon produkujący białko hybrydowe, którego część stanowiła fragment holoenzymu reagujący z przeciwciałem. Zarówno żel aktywnościowy jak i eksperymenty z hamowaniem aktywności polimeryzującej białka hybrydowego przez inhibitory polimerazy DNA α potwierdziły, że klon zawierał

przynajmniej część genu polimerazy DNA α [176]. Również SenGupta i wsp. donieśli ostatnio o otrzymaniu klonu polimerazy DNA α (z biblioteki genów otrzymanych z mózgu nowonarodzonych szczurów). Insert zawierał 1183 pz i stanowił 3' końcowy fragment genu. Hybrydyzacja z poli(A)⁺RNA z mózgu szczurów ujawniła, że odpowiedni mRNA ma długość 5,6 kz [177].

VII. Uwagi końcowe

Na podstawie danych doświadczalnych zebranych z zastosowaniem tak różnych technik badawczych ukształtował się pewien obraz funkcji biologicznej polimeraz DNA. Bezspornym wydaje się pogląd, że główną rolę w replikacji DNA jądrowego w komórkach wyższych eukariontów gra polimeraza DNA α . Czy, i na ile wspomaga ją polimeraza DNA δ pozostaje otwartą kwestią. Podobnie bezspornym pozostaje pogląd, że w replikacji DNA mitochondrialnego i chloroplastowego uczestniczy polimeraza DNA γ . Udział w niej pozostałych polimeraz można całkowicie wykluczyć. Najmniej jasny jest obraz syntezy naprawczej. Wiemy już dzisiaj, że mogą w niej uczestniczyć polimerazy DNA α i β . Problem, który z tych enzymów zostanie „użyty” i dlaczego ciągle jeszcze pozostaje do rozwiązania. Ewentualny udział polimerazy DNA γ w procesach naprawczych wydaje się w obecnej chwili całkowicie poza nurtem badań.

Pytanie, na ile jedna polimeraza może zastępować inne w przypadku na przykład mutacji w obrębie genu polimerazy, pozostaje ciągle jeszcze bez odpowiedzi. I nie wydaje się by można na nie odpowiedzieć bez odpowiednich mutantów. W tym przypadku wydaje się, że odpowiedź na to pytanie przybliży zastosowanie technik rekombinacyjnego DNA, a szczególnie techniki sterowanej mutagenazy.

Artykuł otrzymano 16 czerwca 1987 r.

Zaakceptowano do druku 12 stycznia 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Kornberg A., (1980), w DNA Synthesis, str. 55—150; Freeman W. H., i Co., San Francisco.
2. Weissbach A., Baltimore D., Bollum F. J., Gallo R. C., Korn D., (1975), *Science*, **190**, 401—402.
3. Chang L. M. S., Brown M., Bollum F. J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 1—8.
4. Baril E. F., Jenkins M. D., Brown M., Laszlo J., Morris H. P., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 1187—1193.
5. Spadari S., Weissbach A., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 11—20.
6. Chiu R. W., Baril E. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7951—7957.
7. Bertazzoni U., Stefani M., Pedrolli-Noy G., Giulotto E., Nuzzo G. P., Falaschi A., Spadari S., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**, 785—789.
8. Weissbach A., (1981), w The Enzymes (red. Boyer P. D.), tom XIV, str. 67—86.
9. Weissbach A., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 386—396.
10. Chang L. M. S., Bollum F. J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 909—916.

11. Smith R.G., Gallo R.C., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2879—2884.
12. Holmes A.M., Hesslewood J.P., Johnston J.R., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **43**, 487—499.
13. Wang T.S-F., Sedwick W.D., Korn D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7040—7044.
14. Sedwick W.D., Wang T.S-F., Korn D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7045—7056.
15. Kamać J., Siedlecki J.A., Żmudzka B., (1977), *Acta Biochim. Polon.*, **24**, 65—74.
16. Fisher P.A., Korn D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6528—6535.
17. Fichot O., Pascal M., Mechali M., de Recondo A.M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **561**, 29—41.
18. Mechali O., Abadiedebat J., de Recondo A.M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2114—2122.
19. Weissbach A., Schlabach A., Friedlender B., Bolden A., (1971), *Nature New Biol.*, **231**, 167—170.
20. Chang L.M.S., Bollum F.J., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1264—1272.
21. Garret R.J.B., Bollum F.J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 45—51.
22. Craig R.K., Keir H.M., (1975), *Biochem. J.*, **145**, 225—232.
23. Roufa D.J., Moses R.E., Reed S.J., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 547—559.
24. Chang L.M.S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3789—3795.
25. Foster D.N., Gurney T.Jr., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7893—7898.
26. Lynch W.E., Surrey S., Lieberman J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8179—8183.
27. Eichler D.C., Fisher P.A., Korn D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4011—4014.
28. Knopf K.W., Weissbach A., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3190—3194.
29. Kaftory A., Fry M., (1978), *Nucleic Acid Res.*, **5**, 2679—2693.
30. Yagura T., Seno T., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **608**, 277—286.
31. Fry M., Silber J., Martin G.M., Loeb L.A., (1984), *J. Cell Physiol.*, **118**, 225—232.
32. Reddy G.B.V., Pardee A.B., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3312—3315.
33. Brown M., Bollum F.J., Chang L.M.S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3049—3052.
34. Tanaka S., Hu S-Z., Wang T.S-F., Korn D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8386—8390.
35. Bench K.G., Tanaka S., Hu S-Z., Wang T.S-F., Korn D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8391—8396.
36. Matsukage A., Yamamoto S., Yamaguchi M., Kuskabe M., Takahashi T., (1983), *J. Cell. Physiol.*, **117**, 266—277.
37. Masaki S., Shiku H., Kaneda T., Kawai O., Yoshida S., (1982), *Nucleic Acid Res.*, **10**, 4703—4714.
38. Nakamura H., Motita T., Masaki S., Yoshida S., (1984), *Exp. Cell. Res.*, **151**, 123—133.
39. Smith H.C., Berezney R., (1983), *Biochemistry*, **22**, 3042—3046.
40. Fry M., Sherman C.W., Martin G.M., Loeb L.A., (1980), *Biochemistry*, **19**, 5937—5946.
41. Hobart P.M., Infante A.A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **607**, 256—268.
42. Shioda M., Nagano H., Mano Y., (1979), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1362—1368.
43. Guilfoyle T.J., (1981), w *Biochemistry of Plants* (red. P. K. Stumpft), tom 6, str. 208—247; Academic Press, New York.
44. Bollum F.J., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 2399—2403.
45. Chen Y-C., Bohn E.W., Planck S.R., Wilson S.H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11678—11687.
46. Fisher P.A., Wang T.S-F., Korn D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6128—6137.
47. Albert W., Grummt F., Hubscher U., Wilson S.H., (1982), *Nucleic Acid. Res.*, **10**, 935—946.
48. Spanos A., Sedwick S.G., Yarranton G.T., Hubscher U., (1981), *Nucleic Acid. Res.*, **9**, 1825—1839.

49. Scovassi A.E., Torsello S., Plevani P., Badaracco G.F., Bertazzoni U., (1982), *EMBO J.*, **1**, 1161—1165.
50. Hubscher U., Spanos A., Waltraud A., Grummt F., Banks G.F., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6771—6775.
51. Skarnes W., Bonin P., Baril E.F., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 6629—6636.
52. Wong S.W., Paborsky L.R., Fisher A.P., Wang T.S-F., Korn D., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 7958—7968.
53. Hubscher U., (1984), *Trends. Biol. Sci.*, **9**, 390—393.
54. Vishwanatha J.K., Coughlin S.A., Wesolowski-Owen M., Baril E.F., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 6619—6628.
55. Vishwanatha J.K., Baril E.F., (1986), *Nucleic Acid Res.*, **14**, 8467—8487.
56. Hubscher U., (1983), *EMBO J.*, **2**, 133—136.
57. Wang T.S-F., Hu S-Z., Korn D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 1854—1865.
58. Kaguni L.S., Rossignol J-M., Conaway R.C., Lehman J.R., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2221—2225.
59. Ottiger P.H., Hubscher U., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3993—3997.
60. Hubscher U., Stalder H.P., (1985), *Nucleic Acid Res.*, **13**, 5471—5483.
61. Rapaport E., Zamecnik P.C., Baril E.F., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 838—842.
62. Villani G., Fay P.J., Bambara R.A., Lehman J.R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8202—8207.
63. Bhattacharya P., Simet I., Basa S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2683—2687.
64. Bhattacharya P., Basu S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1488—1491.
65. Donaldson R.W., Gerner E.W., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 759—763.
66. Baril E.F., Brown O.E., Jenkins M.D., Laszlo J., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1981—1982.
67. Nelson E.M., Stowers D.J., Bayne M.L., Benbow R.M., (1983), *Dev Biol.*, **96**, 11—22.
68. Furia M., Polito L.C., Locorotondo G., Grippo P., (1979), *Nucleic Acid Res.*, **6**, 3399—3410.
69. Stalker D.M., Mosbaugh D.W., Meyer R.R., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3114—3121.
70. Wang T.S-F., Sedwick W.D., Korn D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 841—850.
71. Chang L.M.S., (1976), *Science*, **191**, 1183—1185.
72. Chang L.M.S., Plevani P., Bollum F.J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 758—761.
73. McLennan M., Keir H.M., (1977), *Biochem. Soc. Symp.*, **42**, 55.
74. Yamaguchi M., Tanabe K., Taguchi Y.N., Nishizawa M., Takahashi T., Matsukage A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9942—9948.
75. Tanabe K., Yamaguchi M., Matsukage A., Takahashi T., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3098—3102.
76. Chang L.M.S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3789—3795.
77. Chang L.M.S., Bollum F.J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 494—498.
78. Yamaguchi M., Matsukage A., Takahashi T., Toshitada T., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3932—3936.
79. Mosbaugh D.W., Stalker D.M., Probst G.S., Meyer R.R., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1512—1518.
80. Mosbaugh D.W., Meyer R.R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10239—10247.
81. Thomas D.C., Meyer R.R., (1982), *Biochemistry*, **21**, 5060—5068.
82. Koerner T.J., Meyer R.R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3126—3133.
83. Boxer L.M., Korn D., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2623—2633.
84. Mosbaugh D.W., Linn S.C., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 108—118.
85. Blue W.T., Weissbach A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 603—610.
86. Duguet M., de Recondo A.M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1660—1666.

87. Kalf G.F., Chih J.J., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 4904—4916.
88. Klunk L.J., Kalf G.F., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 585—593.
89. Fujisawa T., Tanaka S., Kobayoshi M., Koide K., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **475**, 611—622.
90. Friedlender B., Fry M., Bolden A., Weissbach A., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 452—455.
91. Bolden A., Pedrolli-Noy G., Weissbach A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3351—3356.
92. Hubscher U., Kuenzlee C.C., Spadari S., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **81**, 249—258.
93. Bertazzoni U., Scovassi A.I., Brun G.M., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **81**, 237—248.
94. Knopf K.W., Yamada M., Weissbach A., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4540—4548.
95. Robert-Guroff M., Schrecker A.W., Brinkman B.I., Gallo R.C., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2866—2873.
96. Siedlecki J.A., Żmudzka B., (1979), *Acta Biochim. Polon.*, **26**, 335—347.
97. Yamaguchi M., Matsukage A., Takahashi T., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7002—7009.
98. Wernette C.M., Kagani L.S., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 14764—14770.
99. Byrnes J.J., Downey K.M., Black V.L., So A.G., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2817—2823.
100. Byrnes J.J., Black V.L., (1978), *Biochemistry*, **17**, 4226—4231.
101. Lee M.Y.W.T., Tan C.K., So A.G., Downey K.M., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2096—2101.
102. Lee M.Y.W.T., Tan C.K., So A.G., Downey K.M., (1984), *Biochemistry*, **23**, 1906—1913.
103. Goscin L.P., Byrnes J.J., (1982), *Biochemistry*, **21**, 2513—2518.
104. Crute J.J., Wahl A.F., Bambara R.A., (1986), *Biochemistry*, **25**, 26—36.
105. Wahl A.F., Crute J.J., Sabatino R.D., Bodner J.B., Marraccino R.L., Harwall L.W., Lord E.M., Bambara R.A., (1986), *Biochemistry*, **25**, 7821—7827.
106. Tan C.K., Castillo C., So A.G., Downey K.M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 12310—12316.
107. Prelich G., Kostura M., Marshak D.R., Stillman B., (1987), *Nature*, **326**, 471—475.
108. Prelich G., Tan C.K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G., Downey K.M., Stillman B., (1987), *Nature*, **326**, 517—520.
109. Bravo R., Frank R., Blundell P.A., Macdonald-Bravo H., (1987), *Nature*, **326**, 515—517.
110. Byrnes J.J., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 628—634.
111. Chang L.M.S., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 124—131.
112. Coleman M.S., Hutton J.J., Bollum F.J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 1104—1109.
113. Coleman M.S., Greenwood M.F., Hutton J.J., Bollum F.J., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 120—127.
114. Srivastava B.J., Minodava J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 529—535.
115. McCaffrey R., Harrison T.A., Packman R., Baltimore D., (1975), *New England J. Med.*, **292**, 775—780.
116. Sarin P.S., Anderson P.N., Gallo R.C., (1976), *Blood*, **47**, 11—20.
117. Bollum F.J., Brown M., (1979), *Nature*, **278**, 191—192.
118. Bollum F.J., Chang L.M.S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8767—8770.
119. Bollum F.J., (1974), w *The Enzymes* (red. Boyer P.D.), tom 10, str. 145—171; Academic Press, New York.
120. Plevani P., Cappuci L., Badaracco G., Brevierio D., Sacchi N., Ginelli P., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1196—1203.
121. Mory Y.Y., Chen D., Sarid S., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 437—442.
122. Tarrago-Litvak L., Castroviejo M., Litvak S., (1975), *FEBS Lett.*, **59**, 120-130.
123. Gardner I.M., Kado C.I., (1976), *Biochemistry*, **15**, 688—697.

124. Amileni A., Sala F., Cella R., Spadari S., (1979), *Planta*, **146**, 521—527.
125. Sala F., Amileni A.R., Parisi B., Spadari S., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **112**, 211—217.
126. Masumi M., Weissbach A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2323—2329.
127. McKown R.L., Tawari K.K., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 2354—2358.
128. Stevens C., Bryant J.A., (1978), *Planta*, **138**, 127—132.
129. Bryant J.A., Janns S.M., Francis D., (1981), *Phytochemistry.*, **20**, 13—15.
130. Tooze J., (1981), w *Molecular Biology of Tumor Viruses*, tom 2, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
131. Sarngadharan M.G., Robert-Guroff M., Gallo R.C., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **516**, 419—487.
132. Keir H.N., Hay J., Morrison I.M., Subak-Sharpe J., (1966), *Nature*, **210**, 369—371.
133. Weissbach A., Hong S-C.L., Aucker J., Muller R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6270—6277.
134. Powell K.L., Purifoy D.J.M., (1977), *J. Virol.*, **24**, 616—626.
135. Knopf K., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **98**, 231—244.
136. Citarella R.V., Muller R., Schlabach A., Weissbach A., (1972), *J. Virol.*, **10**, 721—730.
137. Challberg M.D., Englund P.T., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7812—7819.
138. Grandgenett D.P., Gerard G.F., Green M.C., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**, 230—234.
139. Wu A.M., Sarangadharan M.G., Gallo R.C., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**, 1871—1876.
140. Lehman I.R., (1981), w *The Enzymes*, (red. Boyer P.D.), tom 14, str. 16—138; Academic Press, New York.
141. Nossal N.G., (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 581—615.
142. Muraki Y., Yasuda H., Mijazawa H., Hanaoka F., Yamada M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 1761—1765.
143. Spadari S., Sala F., Pedroli-Noy G., (1983), w *Protein Involved in DNA Replication* (red. Hubscher U., Spadari S.), t. 179, str. 169—181; Plenum Press, New York.
144. Spadari S., Weissbach A., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 503—507.
145. Otto B., Fanning E., (1978), *Nucleic Acid Res.*, **5**, 1715—1728.
146. Edenberg H.J., Anderson S., DePamphilis M.L., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3273—3280.
147. Brison O., Kedinger C., Wilhelm J., (1977), *J. Virol.*, **27**, 423—435.
148. Arens M., Yamashita T., Ito K., Tsurua T., Padamawabhan A., Green M., (1978), w *DNA Synthesis. Present and Future* (red. Molineux I., Kohiyama M.), str. 1069—1092; Plenum Press, New York, London.
149. Van der Vliet P.C., Kwant M.M., (1978), *Nature*, **276**, 532—533.
150. Miller M.R., Ulrich R.G., Wang T.S-F., Korn D., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 134—138.
151. Kaczmarek L., Miller M.R., Hammond R.A., Mercer W.E., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 10802—10807.
152. Siedlecki J.A., Zimmerman W., Weissbach A., (1983), *Nucleic Acid Res.*, **11**, 1523—1536.
153. Yamaguchi M., Matsukage A., Takahashi T., (1980), *Nature*, **285**, 45—47.
154. Hubscher U., Kuenzle C.C., Spadari S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 2316—2320.
155. Miller M.R., Chinault D.N., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 46—49.
156. Licastro F., Sarafian T., Verity A.M., Walford R.L., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 929—933.
157. Collins A., (1983), *Biochem. Biophys. Acta*, **741**, 341—347.
158. Dresler S.L., Frattini M.G., (1986), *Nucleic Acid Res.*, **14**, 7093—7102.
159. Yamada K., Hanaoka F., Yamada M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10412—10417.

160. Siedlecki J.A., Szyszko J., Pietrzykowska I., Żmudzka B., (1980), *Nucleic Acid Res.*, **8**, 361—375.
161. Sołtyk A., Siedlecki J.A., Pietrzykowska I., Żmudzka B., (1981), *FEBS Lett.*, **125**, 227—230.
162. Siedlecki J.A., Nowak R., Sołtyk A., Żmudzka B., (1981), *Acta Biochim. Polon.*, **28**, 157—173.
163. Wang T.S-F., Korn D., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1782—1790.
164. Nowak R., *Dane niepublikowane.*
165. Nowak R., Kulik J., Siedlecki J.A., (1987), *Acta Biochim. Polon.*, **34**, 205—215.
166. Kunkel T.A., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12866—12874.
167. Kunkel T.A., Alexander S., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 160—166.
168. Peterson R.C., Cheung L.C., Mataliano R.J., Chang L.M.S., Bollum F.J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 4363—4367.
169. Peterson R.C., Cheung L.C., Mataliano R.J., White S.T., Chang L.M.S., Bollum F.J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10495—10502.
170. Żmudzka B.Z., SenGupta D., Matsukage A., Cobianchi F., Kumar T., Wilson S.H., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 5106—5110.
171. SenGupta D., Żmudzka B.Z., Kumar P., Cobianchi F., Skowroński J., Wilson S.H., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 341—347.
172. McBride W.O., Żmudzka B.Z., Wilson S.H., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 503—507.
173. Matsukage A., Nishikawa K., Ooi T., Seto Y., Yamaguchi M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 8960—8962.
174. Nowak R., Kaczmarek L., Siedlecki J.A., (1988), *Dane niepublikowane.*
175. Żmudzka B.Z., Mitchel J., Collins J., Wilson S.H., (1987), *Dane niepublikowane.*
176. Foster K., Luthi-Steinmann K., Barnes M., Mc Master G., Ferrari E., Eliassen K., Khan N., Brown N., Hubscher U., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**, 21—27.
177. SenGupta D.N., Kumar P., Żmudzka B.Z., Coughlin S., Vishwanatha K., Robey F.A., Parrott C., Wilson S.H., (1987), *Biochemistry*, **26**, 956—963.

ALEKSANDER SIEROŃ*, JOANNA LEWIN-KOWALIK**

Czynnik wzrostu nerwu, budowa chemiczna i znaczenie biologiczne

Nerve growth factor, chemical structure and biological function

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Geny podjednostki β czynników wzrostu nerwu i jej budowa chemiczna
 - II-1. Gen kodujący podjednostkę β mysiego i ludzkiego czynnika wzrostu nerwu
 - II-2. Metody sprawdzania biologicznej aktywności czynników wzrostu nerwu
 - II-3. Budowa cząsteczki czynnika wzrostu nerwu z mysich ślinianek podżuchwowych
- III. Receptory czynników wzrostu nerwu
- IV. Miejsca syntezy i transport czynnika wzrostu nerwu
 - V. Biologiczna rola czynników wzrostu nerwu: wpływ na morfologię i metabolizm komórek nerwowych
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Genes and chemical structure of the β subunits of nerve growth factors
 - II-1. Genes of the β subunits of the nerve growth factors in mice and human
 - II-2. Methods of testing of the biological activity of nerve growth factors
 - II-3. Structure of the nerve growth factor from the submaxillary gland of mice
- III. Receptors of nerve growth factors
- IV. Sites of synthesis and transport of nerve growth factors
 - V. Biological role of nerve growth factors: effects on morphology and metabolism of nerve cells
- VI. Concluding remarks

Wykaz skrótów i określeń stosowanych w pracy: NGF — czynnik wzrostu nerwu (ang. nerve growth factor), β NGF cDNA — komplementarny DNA podjednostki β NGF, komórki PC12 — komórki guza chromochłonnego PC12 szczura, mRNA^{NGF} — informacyjny kwas rybonukleinowy czynnika wzrostu nerwu, cAMP — cykliczny-3',5'-adenozyno-monofosforan, EGF — nabłonkowy czynnik wzrostowy (ang. epidermal growth factor), neuroblastoma — zwojak zarodkowy współczulny, melanoma — czerniak, NGFR — receptor NGF.

* Mgr, ** Dr n. med., Katedra i Zakład Fizjologii, Śląska Akademia Medyczna, Medyków 18, 40-762 Katowice.

I. Wstęp

W 1948 roku Bueker stwierdził, że komórki mięsaka myszy wszczepione do zarodków kurcząt wzmagają wzrost zwojów współczulnych i kręgowych tych zarodków [1]. Kilka lat później wykazano, że obserwowaną przez Bueker'a hipertrofię wywołuje czynnik o charakterze białkowym, uwalniany z komórek mięsaka myszy. Nazwano go czynnikiem wzrostu nerwu — NGF (ang. nerve growth factor — NGF) [2, 3]. Białka działające na neurony identycznie lub bardzo podobnie do NGF wyizolowano w czystej postaci z wielu tkanek zwierzęcych [3—21]. Obecnie mianem czynników wzrostu nerwu określa się białka pobudzające komórki nerwowe do tworzenia neurytów. Z tego powodu mówiąc o NGF, należy podać tkankę lub narząd, z których ten czynnik wyizolowano. Na przykład: czynnik wzrostu nerwu z mysich ślinianek podżuchwowych (SMG-NGF) lub czynnik wzrostu nerwu z jadu żmiji *Ipsera lebetina*.

Czysty NGF wyizolowany ze ślinianek podżuchwowych myszy ma budowę podjednostkową [4, 5, 21, 22]. W 1983 roku zsyntetyzowano komplementarny DNA, kodujący jedną z jego podjednostek (podjednostkę β NGF), oraz wykazano jego znaczne podobieństwo do ludzkiego genu NGF [23].

II. Geny podjednostki β czynników wzrostu nerwu i jej budowa chemiczna

II-1. Gen kodujący podjednostkę β mysiego i ludzkiego czynnika wzrostu nerwu

Budowę genów kodujących NGF opisano stosunkowo niedawno. Najlepiej poznano sekwencję nukleotydową mysiego komplementarnego DNA podjednostki β NGF (β NGF cDNA) i ludzkiego genu NGF. Komplementarny DNA kodujący podjednostkę β mysiego NGF składa się z 1164 nukleotydów. Zawiera on odcinek o długości 327 nukleotydów, który koduje aminokwasy od 1 do 118 podjednostki β NGF (23). Pozostała część wspomnianego łańcucha cDNA koduje aminokwasy prekursora podjednostki β NGF, o masie cząsteczkowej około 22 000, zwanego prepro- β NGF (23). Takiej sekwencji nie ma w cDNA kodującym mysią podjednostkę β NGF. Miejsca rozpoczęcia i zakończenia transkrypcji są takie same w DNA kodującym mysią podjednostkę β NGF, jak i genie ludzkiego NGF. Geny kodujące podjednostkę β ludzkiego i mysiego NGF różnią się w sekwencjach nukleotydowych kodonów 12 aminokwasów. Różnice w sekwencji aminokwasowej nie powodują jednak różnic w aktywności biologicznej kodowanych białek [23].

II-2. Metody sprawdzania biologicznej aktywności czynników wzrostu nerwu

Biologiczną aktywność czynników wzrostu nerwu bada się w hodowlach tkankowych lub komórkowych. Do testowania w hodowlach tkankowych stosuje się zwoje współczulne wypreparowane z siedmiodniowych zarodków kurzych. Aktywność biologiczną badanej substancji uznaje się za dodatnią

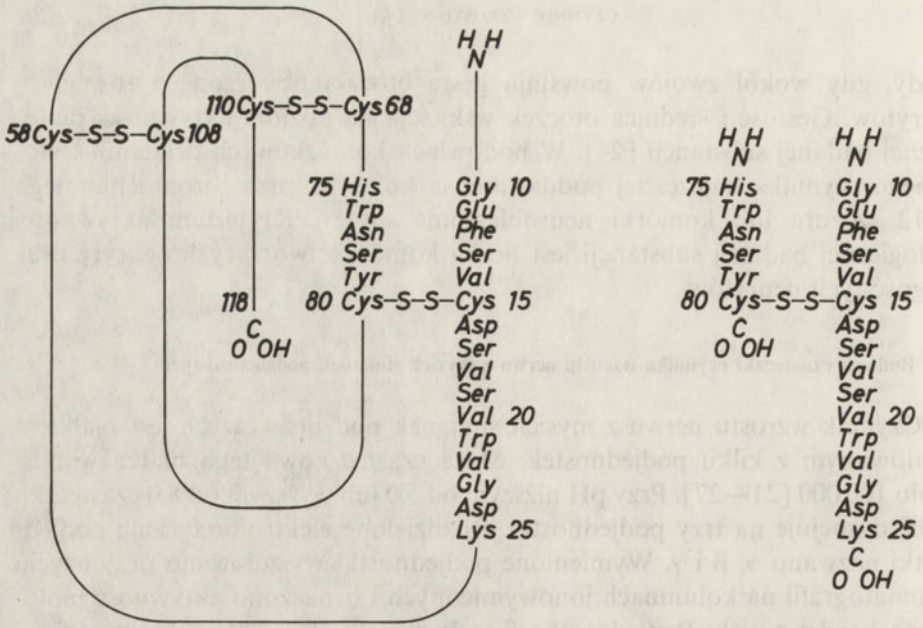
wtedy, gdy wokół zwojów powstają gęste otoczki utworzone z rosnących neurytów. Gęstość i średnica otoczek wskazują na poziom aktywności biologicznej badanej substancji [24]. W hodowlach komórkowych działaniu testowanego czynnika najczęściej poddawane są komórki guza chromochłonnego PC12 szczura lub komórki neuroblastoma myszy. Kryterium aktywności biologicznej badanej substancji jest liczba komórek tworzących neuryty oraz długość tych neurytów.

II-3. Budowa cząsteczki czynnika wzrostu nerwu z mysich ślinianek podżuchwowych

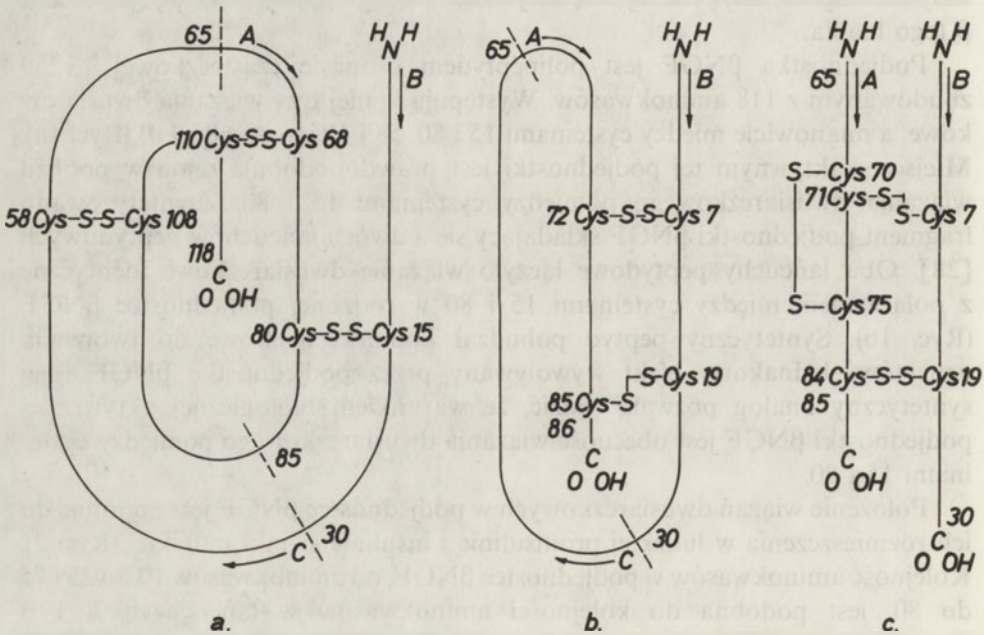
Czynnik wzrostu nerwu z mysich ślinianek podżuchwowych jest białkiem zbudowanym z kilku podjednostek. Masa cząsteczkowa tego białka wynosi około 100 000 [21—27]. Przy pH niższym od 5,0 lub wyższym od 8,0 cząsteczka NGF dysocjuje na trzy podjednostki. Rozdzielone elektroforetycznie podjednostki nazwano α , β i γ . Wymienione podjednostki wyizolowano przy użyciu chromatografii na kolumnach jonowymiennych i oznaczono aktywność biologiczną każdej z nich. Podjednostka β wykazywała 25% aktywności rodzimej cząsteczki mysiego NGF. Dwie pozostałe podjednostki nie wykazywały aktywności biologicznej takiej jak podjednostka β . Podjednostka γ wykazywała właściwości esterazy argininowej. Podjednostki α i γ są zdolne do łączenia się z podjednostką β . Kompleksy podjednostek α - β i γ - β charakteryzuje stała sedymentacji 7S; mają one wyższą aktywność biologiczną niż sama podjednostka β tego białka.

Podjednostka β NGF jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 13 259 zbudowanym z 118 aminokwasów. Występują w niej trzy wiązania dwusiarczkowe, a mianowicie między cysteinami 15 i 80, 58 i 106, oraz 68 i 110 (Ryc. 1a). Miejscem aktywnym tej podjednostki jest prawdopodobnie rejon w pobliżu wiązania dwusiarczkowego pomiędzy cysteinami 15 i 80. Zsyntetyzowano fragment podjednostki β NGF składający się z dwóch łańcuchów peptydowych [28]. Oba łańcuchy peptydowe łączyło wiązanie dwusiarczkowe identyczne z połączeniem między cysteinami 15 i 80 w rodzimej podjednostce β NGF (Ryc. 1b). Syntetyczny peptyd pobudzał komórki nerwowe do tworzenia neurytów. Jednakowy efekt wywoływany przez podjednostkę β NGF i jej syntetyczny analog pozwala sądzić, że warunkiem biologicznej aktywności podjednostki β NGF jest obecność wiązania dwusiarczkowego pomiędzy cysteinami 15 i 80.

Położenie wiązań dwusiarczkowych w podjednostce β NGF jest podobne do ich rozmieszczenia w ludzkiej proinsulinie i insulinie świnki morskiej (Ryc. 2). Kolejność aminokwasów w podjednostce β NGF, od aminokwasów 10 do 25 i 75 do 80, jest podobna do kolejności aminokwasów w łańcuchach A i B w proinsulinie. Łańcuchy te, podobnie jak łańcuchy A i B w proinsulinie, są rozdzielone odcinkiem peptydu zbudowanym z 35, tylko nieznacznie różnych aminokwasów tak, jak w łańcuchu C proinsuliny (Ryc. 2) [29]. Obecność podobnych odcinków peptydowych oraz występowanie wiązań dwusiarczko-



Rycina 1. Kolejność aminokwasów w pobliżu wiązania dwusiarczkowego decydującego o aktywności biologicznej podjednostki β mysiego NGF (a) oraz w syntetycznym peptydzie o aktywności podobnej do βNGF (b). Kolejność aminokwasów według L. Moroder i wsp. (28).



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie cząstek: (a) podjednostki β mysiego NGF, (b) ludzkiej proinsuliny i (c) insuliny świnki morskiej, z zaznaczeniem wiązań dwusiarczkowych i odcinków peptydów o podobnym składzie aminokwasowym (A, B, C) — objaśnienia w tekście. Pozycje wiązań dwusiarczkowych wyznaczono na podstawie opracowania P. U. Angeletti i wsp. (29).

wych w zbliżonych miejscach cząsteczek β NGF, ludzkiej proinsuliny i łańcuchach insuliny świnki morskiej, wskazują na podobną konformację miejsc aktywnych tych polipeptydów.

III. Receptory czynników wzrostu nerwu

NGF wykazuje dużą zdolność wybiórczego wiązania się z błoną komórkową większości neuronów współczulnych i neuronów czuciowych. Czyste receptory NGF (NGFR) wyizolowano z różnych komórek, między innymi z komórek czerniaka (melanoma A785) i komórek PC12 wykorzystując chromatografię powinowactwa [30]. Receptory z komórek PC12 są identyczne z receptorami obecnymi w błonie neuronów współczulnych i czuciowych [31—34]. Receptory NGF występujące na powierzchni różnych komórek są specyficzne wobec NGF i nie wykazują powinowactwa wobec innych czynników wzrostowych, jak na przykład nabłonkowego czynnika wzrostowego — EGF (ang. epidermal growth factor) [35—37]. Łączenie się NGF z receptorem komórek PC12 jest bardzo szybkie (około 0,2 nM w ciągu 5 minut), a połączenie to jest trwałe przy odpowiednim pH i osmolarności pożywki. Przy niskim pH i zwiększonej osmolarności pożywki następuje rozpad połączenia kompleksu NGF-NGFR [36]. We wnętrzu komórek PC12 NGF pojawia się po około 2 minutach od momentu połączenia z NGFR. Opóźnienie to jest prawdopodobnie spowodowane przemieszczaniem kompleksu NGF-NGFR w błonie komórkowej. Wysłano dwie koncepcje wyjaśniające sposób wnikania NGF do komórki. Pierwsza zakłada, że NGF wnika poprzez „odwracanie się” kompleksu NGF-NGFR do wnętrza komórki i dysocjację NGF do cytoplazmy, druga zakłada, że po połączeniu się NGF z receptorem kompleksy NGF-NGFR są wchłaniane do wnętrza komórki na drodze endocytozy [37].

Białko receptorowe z komórek czerniaka charakteryzuje masa cząsteczkowa około 200 000. Ma ono budowę podjednostkową, a jedna z podjednostek o masie cząsteczkowej około 75 000, wykazuje powinowactwo wobec NGF [38]. Białko o właściwościach receptorowych i takiej samej masie cząsteczkowej wyizolowano również z komórek PC12. Okazało się jednak, że podjednostki receptorowe tego białka mają masę cząsteczkową 80 000 do 87 000 i wykazują odmienne właściwości immunologiczne, niż podjednostka o masie cząsteczkowej 75 000 pochodząca z komórek czerniaka [30, 39, 40]. Świadczy to o różnorodności form receptora NGF. Różnorodność NGFR rozumiana jest w dwojaki sposób. Autorzy wcześniejszych prac zakładali istnienie jednego białka receptorowego o zmiennym powinowactwie wobec NGF i zmiennej szybkości przyłączania NGF do receptora [37, 38, 41]. Nowsze doniesienia sugerują występowanie w błonie komórek wrażliwych na działanie NGF receptorów o dużym (NGFR typ I) oraz receptorów o małym (NGFR typ II) powinowactwie wobec NGF [42].

IV. Miejsca syntezy i transport czynnika wzrostu nerwu

Czynnik wzrostu nerwu nagromadza się w komórkach wielu narządów kręgowców [3—16] oraz w komórkach tkanek nowotworowych [18]. Stwierdzono jego występowanie również w surowicy dzieci chorych na neuroblastoma [17], w preparatach trombiny [19] i w plazmie nasienia wołowego [20]. Miejsca nagromadzenia się NGF nie są identyczne z miejscem syntezy tego czynnika wzrostu. Bezpośrednim wskaźnikiem możliwości syntezy określonego białka w komórkach jest obecność w nich mRNA tego białka. mRNA czynnika wzrostu nerwu (mRNA^{NGF}) nie znaleziono dotąd w komórkach i tkankach gromadzących NGF. Poszukiwania mRNA^{NGF} dostarczyły jednak wyników wskazujących na miejsca syntezy NGF. Wykazano, że NGF nagromadzony w neuronach pochodzi z komórek narządów unerwianych przez te neurony. Fakt ten wykazano w obwodowym układzie nerwowym. Poziom syntezy NGF zależy od wieku zwierzęcia i gęstości unerwienia współczulnego narządu wytwarzającego NGF [43, 44]. W ośrodkowym układzie nerwowym NGF jest syntetyzowany przez komórki astrogleju w obszarach mózgu zawierających cholinergiczne zakończenia nerwowe [45—48]. Wysokie stężenie mRNA^{NGF} w mózgowiu szczura stwierdzono w korze mózgowej i hipokampie [49]. NGF natomiast jest gromadzony przez neurony podstawy przodomózgowia oraz opuszki węchowej, które wysyłają neuryty o zakończeniach cholinergicznym do kory mózgowej i hipokampa. Struktury te przy dużym stężeniu NGF prawie nie zawierają mRNA^{NGF} [49]. NGF gromadzony w zwojach współczulnych jest syntetyzowany w tkankach unerwionych przez włókna pochodzące z tych zwojów [43, 44]. Z miejsca syntezy do komórki nerwowej NGF jest przenoszony za pośrednictwem wstecznego transportu aksonalnego. Zablockowanie wstecznego transportu aksonalnego przy pomocy kolchicyny lub winblastyny prowadzi do 3—4-krotnego wzrostu stężenia NGF w unerwionym narządzie, a nieznacznego obniżenia w porównaniu z kontrolą stężenia NGF w komórkach zwojowych, których włókna nerwowe unerwiają ten narząd [50, 51]. Transport aksonalny nie jest jednak jedynym sposobem przenoszenia NGF z miejsca syntezy do miejsca działania. Może on się odbywać również poprzez krew. W ten sposób NGF wytworzony w komórkach ślinianek podżuchwowych myszy jest przenoszony do rdzenia nadnerczy [52].

V. Biologiczna rola czynników wzrostu nerwu — wpływ na morfologię i metabolizm komórek nerwowych

Podczas hodowli zwojów współczulnych w pożywce z dodatkiem NGF wzrasta ich wielkość oraz liczba wyrastających z nich neurytów. Obserwowane powiększenie zwojów współczulnych jest wynikiem zarówno większej liczby komórek w zwojach, jak i większych rozmiarów tych komórek [29].

Obrazy komórek (z hodowli w pożywce z dodatkiem NGF) uzyskane w mikroskopie elektronowym wykazały wyraźne zmiany w ich ultrastrukturze [53, 54]. Obserwowano powiększenie takich struktur, jak siateczka śródplazmatyczna i aparat Golgi'ego oraz zwiększenie ilości mikrotubuli i mikrofilamentów. Zmianom morfologicznym i ultrastrukturalnym towarzyszył wzrost intensywności metabolizmu komórkowego. Przejawiał się on większym nasileniem utlenienia glukozy na drodze fosforylacji oksydacyjnej [50], modyfikacją fosforylacji niektórych białek cytoplazmatycznych i jądrowych [56—61], zwiększonym wbudowywaniem urydyny do RNA i aminokwasów do białek [62], zwiększoną acetylacją lipidów [63] oraz modyfikacją glikozylacji białek [64]. Komórki hodowane w obecności NGF charakteryzowało podwyższone, w porównaniu z kontrolą, stężenie Na^+ [65] oraz wzmożona aktywność acetyltransferazy cholinowej [66]. Obecność NGF w pożywce indukuje w komórkach PC12 wzrost stężenia cyklicznego 3', 5'—adenozyno-monofosforanu (cAMP), poprzez zwiększenie aktywności cykazy adenylowej [64]. Dodatni wpływ NGF na aktywność cykazy adenylowej jest silniejszy, gdy jest ona wcześniej zaktywowana przez adenozyne [64].

W jądrach komórek PC12 hodowanych w pożywce z dodatkiem NGF, zachodzi fosforylacja specyficznych niehistonowych białek o masie cząsteczkowej około 30 000 i małej ruchliwości elektroforetycznej [61]. Donorem fosforu w procesie fosforylacji tych białek był ATP. Wydajność fosforylacji pobudzanej przez NGF zależała od obecności Mg^{2+} . Zbyt wysokie stężenie tego kationu, oraz obecność innych kationów dwuwartościowych, hamowały jednak fosforylację białek jądrowych w komórkach PC12 [58]. Enzymami fosforylującymi białka są kinazy. Nie wiadomo, jednak dotychczas, który z enzymów katalizujących fosforylację białek jądrowych jest aktywowany przez NGF. Badania, w których używano różnych substancji pobudzających i hamujących aktywność kinaz wykazały, że kinaza katalizująca fosforylację białek jądrowych pod wpływem NGF nie jest podobna do kinazy białkowej C ani do kinazy kazeinowej [58].

Zmiany metabolizmu komórek nerwowych wywołane obecnością NGF są modyfikowane przez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Inne kationy dwuwartościowe takie jak Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} i Ni^{2+} nie są potrzebne do działania NGF i nie wpływają na przebieg reakcji wewnątrzkomórkowych wzbudzanych przez NGF [60]. Obecność Mg^{2+} w pożywce komórek PC12 hodowanych w obecności NGF jest jednym z warunków fosforylacji niehistonowych białek jądrowych. Od obecności Ca^{2+} zależy natomiast fosforylacja rozpuszczalnego białka cytoplazmatycznego o masie cząsteczkowej około 100 000 (Nsp100), którego synteza jest również pobudzana przez NGF [61]. Do prawidłowego wzrostu neurytów pod wpływem NGF potrzebna jest obecność obu kationów. Przy przewadze Mg^{2+} powstają neuryty długie i cienkie, odwrotnie niż w przypadku gdy w pożywce przeważa Ca^{2+} [59, 60]. Zmiany w morfologii neurytów są spowodowane wpływem Mg^{2+} i Ca^{2+} na szybkość polimeryzacji mikrotubuli, która zachodzi szybciej w obecności Mg^{2+} , a jest hamowana przez Ca^{2+} [62, 63].

VI. Uwagi końcowe

Czynniki wzrostu nerwu są produkowane w tkankach narządów unerwionych czuciowo i współczulnie, natomiast w mózgu są one najprawdopodobniej wytwarzane przez komórki glejowe obszarów zawierających cholinergiczne zakończenia nerwowe. Największe z dotychczas stwierdzonych stężenie NGF występuje w śliniankach podżuchwowych myszy. Ilość NGF w śliniankach i osoczu samców myszy jest wyższa niż u samic. Jest to spowodowane dodatnim wpływem androgenów na syntezę NGF. Różnic poziomu NGF zależnych od płci nie obserwowano w innych tkankach myszy, ani w tkankach wytwarzających NGF u innych gatunków ssaków.

Wykazano dwa sposoby transportu NGF z miejsc syntezy do narządów i tkanek gromadzących czynniki wzrostu nerwu. Jednym z nich jest wsteczny transport aksonalny, a drugim przenoszenie przez krew. NGF wnika do komórki nerwowej za pośrednictwem specyficznego receptora błonowego. W komórce nerwowej NGF występuje jako związany z frakcją mikrosomalną i stanowi 0,1—0,2 mg% białek tej frakcji. Czynniki wzrostu nerwu nie są specyficzne tkankowo ani gatunkowo. NGF z tkanek różnych ssaków i z jadu żmiji są strukturalnie i funkcjonalnie bardzo podobne i wykazują tylko nieznaczne różnice immunologiczne. Różnią się one jedynie ilością potrzebną do wywołania identycznego efektu. Czynniki wzrostu nerwu są pod względem ewolucyjnym białkami konserwatywnymi, co znajduje potwierdzenie w podobnej budowie genów kodujących mysz i ludzki NGF.

Badania nad czynnikami wzrostu nerwu prowadzone są od ponad 40 lat. W 1986 roku za całokształt badań nad NGF Rita Levi-Montalcini otrzymała nagrodę Nobla z dziedziny medycyny i fizjologii [69—70]. Badania nad czynnikami wzrostu nerwu są obecnie kontynuowane przez wiele zespołów badawczych na całym świecie. Mimo rosnącej liczby faktów dotyczących tych czynników, ciągle jeszcze pozostaje wiele pytań, na które nie znamy odpowiedzi.

Artykuł otrzymano 24 września 1987 r.

Przekazano do druku 6 marca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Bueker E. D., (1948), *Anat. Record*, **102**, 369—390.
2. Levi-Montalcini R., (1952), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **55**, 330—343.
3. Levi-Montalcini R., Hamburger V., (1953), *J. Exp. Zool.*, **123**, 233—388.
4. Cohen S., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 1129—1137.
5. Schenkein I., (1971), w *Handbook of Neurochemistry* (red. Lajtha A.), tom 5, str. 503—524; Plenum Press, New York, London.
6. Bueker E. D., (1950), *Year Book Am. Phil. Soc.*, 185—186.
7. Bueker E. D., Hilderman H. L., (1953), *Cancer*, **6**, 397—415.
8. Bueker E. D., (1957), *Cancer Res.*, **17**, 190—199.

9. Cohen S., Levi-Montalcini R., Hamburger V., (1954), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **40**, 1014—1018.
10. Levi-Montalcini R., Hamburger V., (1951), *J. Exp. Zool.*, **116**, 321—362.
11. Banks B.E.C., Banthorpe D.V., Berry A.R., Davies H.S., Doonnan S., Lamont D., Shipolini R., Vernon C.A., (1968), *Biochem. J.*, **108**, 157—158.
12. Cohen S., Levi-Montalcini R., (1956), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **42**, 571—574.
13. Cohen S., (1960), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 302—311.
14. Levi-Montalcini R., Booker B., (1960), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 384—394.
15. Bueker E.D., Schenkein I., Bane J., (1960), *Cancer Res.*, **20**, 1220—1228.
16. Winick M., Greenberg R., (1965), *Pediatrics*, **35**, 221—228.
17. Burdman J.A., Goldstein M.N., (1964), *J. Natl. Canc. Inst.*, **33**, 123—133.
18. Levi-Montalcini R., Booker B., (1960), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **42**, 384—391.
19. Hoffman H., McDougall J.M., (1968), *Exp. Cell Res.*, **51**, 485—503.
20. Harper G.P., Thoenen H., (1984), w *Chemistry of peptides and proteins* (red. Voelter W., Bayer E., Ovchinnikov Y.A., Wunsch E.), tom 2, str. 171—177; Walter de Gruyter and Co., Berlin—New York.
21. Varon S., Nomura J., Shooter E.M., (1967), *Biochemistry*, **6**, 2202—2209.
22. Greene L.A., Shooter E.M., (1980), *Ann. Rev. Neurosci.*, **3**, 353—402.
23. Ullrich A., Gray A., Berman C., Dull T.J., (1983), *Nature*, **303**, 821—825.
24. Levi-Montalcini R., Angeletti P.U., (1968), *Physiol. Rev.*, **48**, 534—569.
25. Smith A.P., Varon A., Shooter E.M., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3259—3268.
26. Varon S., Nomura J., Shooter E.M., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 1782—1789.
27. Varon S., Nomura J., Shooter E.M., (1968), *Biochemistry*, **7**, 1296—1303.
28. Moroder L., Romani S., Wunsch E., Harper G., Thoenen H., (1983), Praca wygłoszona na 8-th American Peptide Symposium, May 22—27, Tucson, listowna informacja od autora.
29. Angeletti P.U., Angeletti R.H., Frazier W.A., Bradshaw R.A., (1973), w *Proteins of the nervous system* (red. Johnson Schneider D.), str. 133—154; Raven Press, New York.
30. Puma P., Buxer S.E., Watson L., Kelleher D.J., Johnson G.L., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3370—3375.
31. Bradshaw R.A., (1978), *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 191—216.
32. Greene L.A., Shooter E.M., (1980), *Ann. Rev. Neurosci.*, **3**, 353—402.
33. Yanker B.A., Shooter E.M., (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 845—868.
34. Greene L.A., Tischler A.S., (1982), *Adv. Cell. Neurobiol.*, **3**, 373—414.
35. Massague J., Buxer S.E., Johnson G.L., Czech M.P., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **693**, 205—212.
36. Massague J., Czech M.P., Iwata K., Delerce J.E., Todaro G.J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6822—6826.
37. Bernd P., Greene L.A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 15509—15516.
38. Ross A.H., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6681—6685.
39. Grob P.M., Berlot C.H., Bothwell M.A., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6819—6823.
40. Massague J., Guilette B.J., Czech M.P., Morgan C.J., Brodshaw R.A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9419—9424.
41. Schechter A.L., Bothwell M.A., (1981), *Cell*, **24**, 867—874.
42. Godfrey E.W., Shooter E.M., (1986), *J. Neurosci.*, **6**, 2543—2550.
43. Neumann R., Korsching S.J., Thoenen H., (1984), *EMBO J.*, **3**, 3183—3189.
44. Shelton D.L., Reichardt L.F., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7951—7955.
45. Lindsay R., (1979), *Nature*, **282**, 80—82.
46. Wien D., Barrand P., Dicou E., Scott J., Brachet P., (1985), *FEBS Lett.*, **189**, 37—41.
47. Furukawa S., Furukawa Y., Satoyoshi E., Hayashi K., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **136**, 57—63.

48. Korsching S., Auburger G., Heumann R., Scott J., (Scott I.), Thoenen H., (1985), *EMBO J.*, **4**, 1389—1393.
49. Large T.H., Bodary S.C., Clegg D.O., Weskamp G., Otten U., Reichardt L.F., (1986), *Science*, **234**, 352—355.
50. Csillic B., Schwab M.E., Thoenen H., (1985), *Brain Res.*, **331**, 11—15.
51. Korsching S., Thoenen H., (1985), *J. Neurosci.*, **5**, 1058—1061.
52. Aloe L., Alleva E., Böhm A., Levi-Montalcini R., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6184—6187.
53. Angeletti P.U., Levi-Montalcini R., Caramia F., (1971), *Brain Res.*, **27**, 343—355.
54. Levi-Montalcini R., Caramia F., Angeletti P.U., (1969), *Brain Res.*, **12**, 54—73.
55. Angeletti P.U., Liuzzi A., Levi-Montalcini R., Gandini-Attardi D., (1964), *Biochem. Biophys. Acta*, **90**, 445—450.
56. Halegoua S., Patrick J., (1980), *Cell*, **22**, 571—581.
57. Yu M.W., Tolson N.W., Guroff G., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10481—10492.
58. Nakanishi N., Guroff G., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7791—7799.
59. Togari A., Guroff G., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 3804—3811.
60. Por S.B., Huttner W.B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6526—6533.
61. Hashimoto S., Iwasaki C., Kuzuya H., Guroff G., (1986), *J. Neurochem.*, **46**, 1599—1604.
62. Angeletti P.U., Gandini-Attardi D., Toschi G., Salvi M.L., Levi-Montalcini R., (1965), *Biochem. Biophys. Acta*, **95**, 111—120.
63. Angeletti P.U., Liuzzi A., Levi-Montalcini R., (1964), *Biochem. Biophys. Acta*, **84**, 778—781.
64. Race H.M., Wagner J.A., (1985), *J. Neurochem.*, **44**, 1588—1592.
65. Amy C.M., Bennett E.L., (1983), *J. Neurosci.*, **3**, 1547—1553.
66. Heumann R., Schwab M., Merkl R., Thoenen H., (1984), *J. Neurosci.*, **4**, 3039—3050.
67. Rush R.A., (1986), *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 493.
68. Brachet P., (1986), *La Recherche*, **17**, 1854—1856.
69. Olson L., (1987), *Trends Neur. Sci.*, **2**, 36—38.
70. Klein A., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 125—150.

ZOFIA PAWŁOWSKA*, CZESŁAW CIERNIEWSKI**, JOLANTA KRZESŁOWSKA***,
WIKTOR KOZIÓŁKIEWICZ****

Glikoproteiny błony płytkowej i ich rola w aktywności receptorowej płytek krwi

Glycoproteins of platelet membrane and their role in receptor activity of blood platelets

Spis treści

- I. Budowa i własności najważniejszych glikoprotein błony płytkowej
 - I-1. Glikoproteina Ia (GPIa)
 - I-2. Glikoproteina Ib (GPIb)
 - I-2.1. Budowa i własności
 - I-2.2. GPIb jako receptor czynnika von Willebranda
 - I-2.3. GPIb jako receptor trombiny
 - I-3. Glikoproteina Ic (GPIc)
 - I-4. Glikoproteiny IIb i IIIa (GPIIb i GPIIIa)
 - I-4.1. Budowa i właściwości heterodimeru GPIIb/IIIa
 - I-4.2. Heterodimer GPIIb/IIIa jako receptor fibrynogenu
 - I-4.2.1. Oddziaływanie fibrynogenu z płytkami krwi aktywowanymi różnymi agonistami
 - I-4.2.2. Kompleks GPIIb/IIIa jako receptor fibrynogenu
 - I-4.2.3. Regiony cząsteczki fibrynogenu bezpośrednio oddziaływujące z receptorem płytkowym
 - I-4.3. Heterodimer GPIIb/IIIa jako receptor innych białek adhezywnych
 - I-4.3.1. GPIIb/IIIa jako receptor fibronektyny
 - I-4.3.2. Kompleks GPIIb/IIIa jako receptor czynnika von Willebranda
 - I-4.4. GPIIb/IIIa jako przedstawiciel cytoadhezyn
 - I-5. Glikoproteina V (GPV)
 - I-6. Glikoproteina IX (GPIX)
- II. Inne glikoproteiny
 - II-1. Receptory ADP

Contents

- I. Structure and properties of major platelet membrane glycoproteins
 - I-1. Glycoprotein Ia (GPIa)
 - I-2. Glycoprotein Ib (GPIb)
 - I-2.1. Structure and properties

* Dr, ** doc. dr hab., *** mgr, **** mgr, Zakład Biofizyki Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź.

- I-2.2. GPIb as a von Willebrand Factor receptor
- I-2.3. GPIb as a thrombin receptor
- I-3. Glycoprotein Ic (GPIc)
- I-4. Glycoprotein IIb and IIIa (GPIIb and GPIIIa)
 - I-4.1. Structure and properties of a heterodimer GPIIb/IIIa
 - I-4.2. Heterodimer GPIIb/IIIa as a fibrinogen receptor
 - I-4.2.1. Interaction of fibrinogen with blood platelets activated by different agonists
 - I-4.2.2. Complex GPIIb/IIIa as a fibrinogen receptor
 - I-4.2.3. Regions of fibrinogen molecule directly interacting with the platelet receptor
 - I-4.3. Heterodimer GPIIb/IIIa as a receptor of other adhesive proteins
 - I-4.3.1. GPIIb/IIIa as a fibronectin receptor
 - I-4.3.2. Complex GPIIb/IIIa as a von Willebrand Factor receptor
 - I-4.4. GPIIb/IIIa as a member of cytoadhesins family
- I-5. Glycoprotein V (GPV)
- I-6. Glycoprotein IX (GPIX)
- II. Other glycoproteins
 - II-1. Receptors of ADP

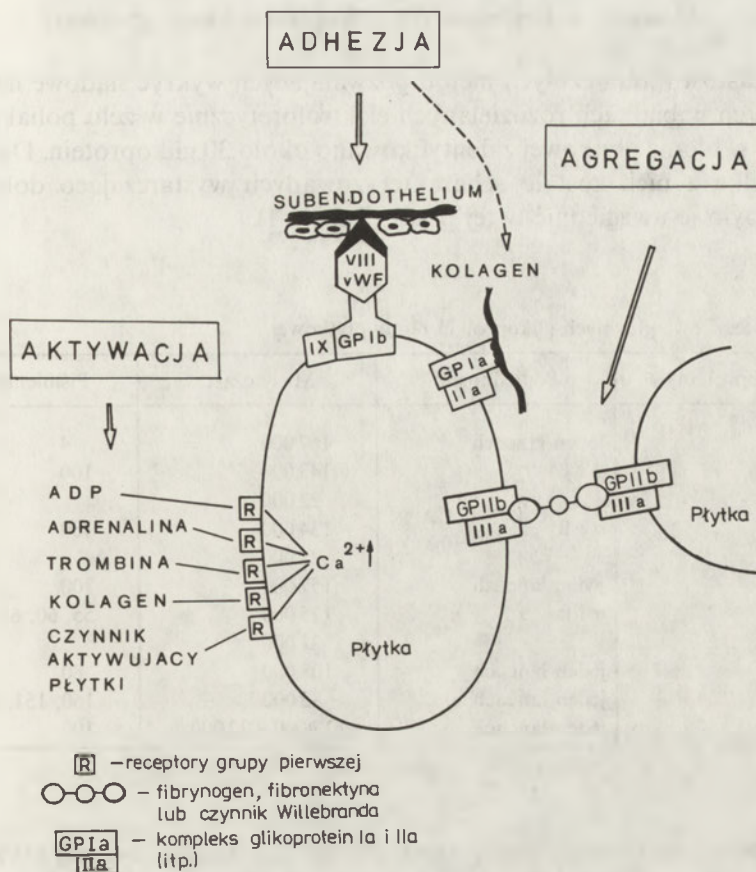
Wykaz stosowanych skrótów: K_D — pozorna stała dysocjacji; K_A — pozorna stała asocjacji; SDS — siarczan dodecylu sodu; EDTA — sól sodowa kwasu etylenodiaminoczerooctowego; EGTA — kwas etylenoglikolo-bis(β -amino-etylowy eter)-N,N'-czterooctowy; ADP — adenylozodifosforan; Fg — fibrynogen; Fn — fibronektyna; GP — glikoproteina.

Zewnętrzna błona płytek krwi zawiera liczne systemy receptorowe, swoiście wiążące różne nisko- i wysoko-cząsteczkowe substancje. Ze względu na funkcję jak i mechanizm działania receptory te możemy podzielić na dwie grupy.

Pierwszą grupę stanowią receptory substancji będących aktywatorami płytkowymi (Ryc. 1). Skompleksowanie cząsteczek takich substancji z receptorami jest sygnałem inicjującym aktywację płytek, przesyłanym do ich wnętrza na drodze dwóch ciągów reakcji zachodzących w błonie komórkowej. W jednym z nich bierze udział cyklaza adenylowa i wiadomość o zadziałaniu swego bodźca przekazywana jest za pośrednictwem zmiany wewnątrzpłytkowego stężenia cAMP. Warto tu wspomnieć, że w płytkach krwi wzrost poziomu cAMP towarzyszy zahamowaniu ich zdolności do agregacji. W drugim natomiast bodziec przekazywany jest poprzez produkty działania fosfolipazy na fosfatydyloinozylol, tj. diacyloglicerol oraz trifosfoinozylol. W efekcie pobudzenia następuje gwałtowna zmiana kształtu płytek, ich agregacja i wydzielanie różnorodnych składników z wewnątrzpłytkowych ziarnistości.

Do drugiej grupy receptorów zaliczyć możemy te, które — dzięki swoistemu kompleksowaniu białek adhezywnych, głównie fibrynogenu i czynnika von Willebranda — umożliwiają agregację i adhezję płytek krwi. Receptory te są nieczynne w płytkach będących w stanie spoczynku. Mechanizm ich aktywacji nie jest do tej pory poznany. Wiadomo, że wymagają one wcześniejszej aktywacji któregoś z receptorów grupy pierwszej (receptor fibrynogenu), bądź też zadziałania jakiegoś innego czynnika (receptor czynnika von Willebranda).

W prawidłowym przebiegu poszczególnych etapów aktywacji płytek niezwykle istotną rolę odgrywają liczne białka zwłaszcza glikoproteiny, występujące



Ryc. 1. Schemat płytki krwi ukazujący typy receptorów, które uczestniczą w poszczególnych funkcjach płytek. Receptory pierwszej grupy reagują z aktywatorami płytkowymi (ADP, adrenalina, trombina, kolagen, czynnik aktywujący płytki). Reakcji tej towarzyszy wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} . Drugą grupę receptorów stanowią kompleksy glikoprotein takich jak: GPIb/IX, GPIa/IIa oraz GPIIb/IIIa, które mają zdolność wiązania wysokocząsteczkowych białek. Kompleks GPIb/IX jest receptorem czynnika von Willebranda (VIII vWF), za pośrednictwem którego, płytki krwi mogą przylegać do włókien kolagenowych (subendothelium) po uszkodzeniu komórek śródbłonna. W procesie adhezji płytek prawdopodobnie zachodzi również oddziaływanie kompleksu GPIa/IIa z włóknami kolagenowymi. Kompleksy GPIIb/IIIa są receptorami fibrynogenu (Fg), fibronektyny (Fn) oraz czynnika von Willebranda (VIII vWF). Oddziaływanie GPIIb/IIIa z tymi białkami umożliwia agregację płytek krwi.

zarówno w zewnętrznej błonie plazmatycznej jak i w błonach wewnątrzpłytkowych ziarnistości [1—3]. Szczególna rola glikoprotein błon płytek krwi polega na tym, że są one receptorami licznych substancji, w tym wielu białek biorących udział w różnych etapach procesu krzepnięcia krwi i fibrynolizy, np. plazminogenu, wysokocząsteczkowego kininogenu czy czynnika V. Struktura i funkcje tych ostatnich receptorów nie jest jeszcze dobrze poznana.

I. Budowa i własności najważniejszych glikoprotein błony płytkowej

Po zastosowaniu czułych metod pozwalających wykryć śladowe ilości reszt cukrowych w białkach rozdzielanych elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym, w błonie płytkowej zidentyfikowano około 30 glikoprotein. Do tej pory tylko kilka z nich zostało scharakteryzowanych wystarczająco dobrze, aby można było je uwzględnić w tej pracy (Tabela 1).

Tabela 1

Masy cząsteczkowe głównych glikoprotein błony płytkowej

Glikoproteiny	Podjednostki	Masy cząst.	Piśmiennictwo
GPIa	jeden łańcuch	167 000	4
GPIb	α i β	143 000	100
GPIc	α i β	22 000	100
		134 000	
GPIIa	jeden łańcuch	27 000	100
		157 000	
GPIIb	α i β	125 000	55, 60, 61
		21 000	
GPIIIa	jeden łańcuch	108 000	80
GPV	jeden łańcuch	82 000	150, 151, 163
GPIX	jeden łańcuch	17 000—22 000	100

Znaczenie niektórych glikoprotein dla funkcji hemostatycznej płytek krwi jednoznacznie wykazały wrodzone anomalie płytek, w których obniżenie zawartości glikoprotein lub ich całkowity brak w błonie manifestuje się niezdolnością płytek do adhezji i agregacji.

I-1. Glikoproteina Ia (GPIa)

GPIa zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie 167 000, który zawiera liczne wewnątrzłańcuchowe mostki dwusiarczkowe [4]. Znaczna część GPIa ułożona jest na powierzchni płytek krwi [5, 6, 7], ale białko to kontaktuje się również z elementami cytoszkieletu [8]. Przypuszcza się, że GPIa uczestniczy w pierwszych etapach aktywacji płytek krwi indukowanej kolagenem i trombiną [9, 10]. Przemawiają za tym następujące obserwacje:

a) u chorych wykazujących zaburzenia w odpowiedzi płytek na kolagen występuje niedobór GPIa w błonie płytkowej;

b) przeciwciała specyficzne dla GPIa silnie hamują trombinową agregację płytek [10].

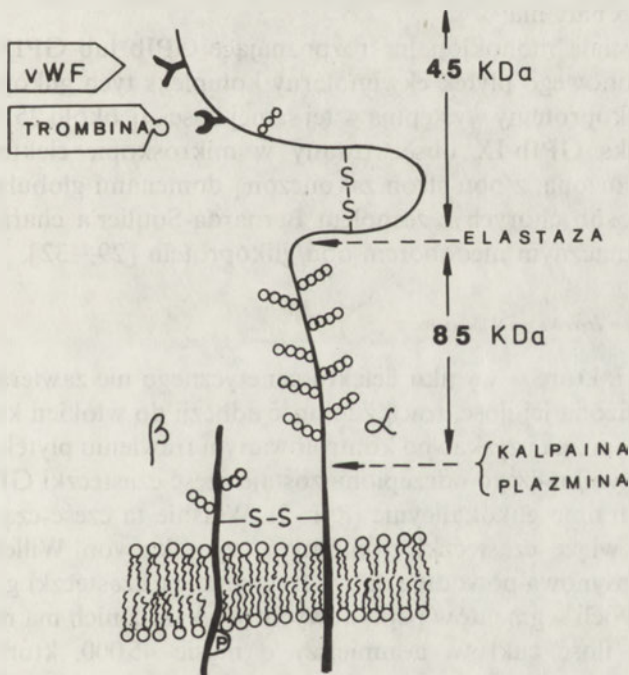
Ostatnie obserwacje pozwalają sądzić, że GPIa może być receptorem dla kolagenu [11, 12].

1-2. Glikoproteina Ib (GPIb)

1-2.1. Budowa i własności

Cząsteczka GPIb zbudowana jest z dwóch podjednostek polipeptydowych (GPIb α i GPIb β) połączonych mostkami dwusiarczkowymi [13, 14]. Masa cząsteczkowa większej podjednostki wynosi 143 000, a mniejszej 22 000. GPIb wyróżnia się znaczną zawartością kwasu sjałowego [15]. Obie podjednostki polipeptydowe GPIb są glikozylowane. Z cząsteczki GPIb pochodzi jednołańcuchowy fragment peptydowy o masie cząsteczkowej 148 000 [16] nazywany glikokalicyną, który jest uwalniany z błony płytkowej w wyniku działania endogennej kalpajny płytkowej [15]. GPIb przejawia cechy charakterystyczne dla białka amfifilnego [17, 18], podczas gdy jej fragment — glikokalicyna dzięki dużej zawartości cukrów (40—60%), zachowuje się jak typowe białko hydrofilowe [19, 16]. Stężenie glikokalicyny w osoczu wzrasta podczas procesu aktywacji i krzepnięcia krwi [20].

Cząsteczka GPIb przebija dwuwarstwę lipidową błony płytkowej i jej grupy reaktywne znajdują się zarówno na zewnętrznej jak i wewnętrznej powierzchni błony [21] (Ryc. 2). Transbłonowe ułożenie GPIb potwierdzają liczne obserwacje:



Ryc. 2. Schemat cząsteczki GPIb działającej jako receptor czynnika von Willebranda oraz trombiny. Obie podjednostki, α i β , zakotwiczone są w dwuwarstwie lipidowej.

- a) jako jedyna glikoproteina błony ulega endogennej fosforylacji na wewnętrznej powierzchni błony [22];
- b) kontaktuje się z cytoszkieletem poprzez białko wiążące aktynę [23];
- c) jej duży NH_2 — końcowy fragment — glikokalicyna, jest ułożony na zewnętrznej powierzchni błony płytkowej i łatwo ulega uwolnieniu w wyniku ograniczonej proteolizy;
- d) funkcjonuje jako receptor czynnika von Willebranda i trombiny [24, 25].

GPIb znajduje się w bezpośrednim kontakcie z elementami cytoszkieletu płytkowego [23, 21]. Niektórzy uważają, że kompleksowanie GPIb z cytoszkieletem ma miejsce dopiero po zaktywowaniu płytek krwi, np. pod wpływem estru forbolu (phorbol-12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate; TPA) [26] lub trombiny. Aktywacji płytek indukowanej tymi czynnikami towarzyszy również fosforylacja GPIb spowodowana prawdopodobnie działaniem kinazy białkowej C. Inni sądzą, że GPIb wiąże się również z elementami cytoszkieletu także w płytkach krwi będących w stanie spoczynku [8, 21, 23], a czynnikiem limitującym oddziaływanie GPIb z cytoszkieletem jest kalpaina. Zaobserwowano bowiem, że GPIb jest połączona tylko z nierozpuszczalnym w Tritonie X-100 cytoszkieletem nieaktywnych płytek wówczas, gdy płytka kalpaina jest nieczynna.

W błonie płytkowej cząsteczki GPIb występują prawdopodobnie w kompleksie stechiometrycznym 1:1 z GPIX [27].

Dowodzą tego badania:

- a) przeciwciała monoklonalne rozpoznające GPIb lub GPIX wytrącają z ekstraktu tritonowego płytek ekwimolarny kompleks tych glikoprotein,
- b) obie glikoproteiny występują w tej samej ilości, tj. około 25 000 na płytkę,
- c) kompleks GPIb-IX obserwowany w mikroskopie elektronowym ma strukturę wydłużoną, z obu stron zakończoną domenami globularnymi (28),
- d) płytki osób chorych z zespołem Bernarda-Soulier'a charakteryzują się brakiem lub znacznym niedoborem obu glikoprotein [29—32].

I-2.2. GPIb jako receptor czynnika von Willebranda

Płytki krwi, które w wyniku defektu genetycznego nie zawierają GPIb, lub zawierają obniżoną jej ilość, tracą zdolność adhezji do włókien kolagenowych. Ten sam efekt można uzyskać po kontrolowanym trawieniu płytek trypsyną lub plazminą, w wyniku czego odcepiona zostaje część cząsteczki GPIb odpowiadająca strukturalnie glikokalicynie (Ryc. 2). Właśnie ta część cząsteczki GPIb bezpośrednio wiąże cząsteczki trombiny i czynnika von Willebranda [24]. Hydroliza trypsynowa powoduje dalszą fragmentację cząsteczki glikokalicyny i utworzenie dwóch segmentów peptydowych. Większy z nich ma masę 120 000 i zawiera dużą ilość cukrów, a mniejszy o masie 45 000, który jest słabiej glikozyłowany występuje w postaci pętli z jednym wewnątrzłańcuchowym wiązaniem dwusiarczkowym. Ten ostatni fragment stanowi zewnątrzkomórkową część GPIb i zawiera miejsca wiążące trombinę i czynnik von Willebranda [9, 33]. Oddziaływanie formy polimerycznej czynnika von Willebranda z

płytkami *in vivo* pośredniczy w adhezji płytek krwi do włókien kolagenowych odsłoniętych przez uszkodzenie komórek endotelialnych. Wyodrębniony czynnik von Willebranda nie wiąże się bezpośrednio z płytkami, które są w spoczynku. Przyłączanie tego białka do receptorów płytkowych wymaga obecności ristocetyny lub innej niefizjologicznej substancji kationowej, neutralizującej silnie ujemny ładunek powierzchniowy płytek. Bezpośrednie wiązanie czynnika von Willebranda z płytkami obserwuje się wówczas, gdy doświadczenie prowadzone jest w układzie heterologicznym, tzn. czynnik von Willebranda wyodrębniony został z osocza wołowego, a płytki z krwi ludzkiej. Wykazano, że ludzki czynnik von Willebranda po odszczepieniu kwasu sjałowego oraz patologiczne odmiany czynnika von Willebranda również wiążą się z GPIb. Kompleksowanie czynnika von Willebranda z płytkowym GPIb w obecności ristocetyny prowadzi do biernej aglutynacji płytek [34]. Zdolność płytek do zlepiania się w takich warunkach zostaje zniesiona po ograniczonej proteolizie plazminowej GPIb [35—37]. Przyłączanie swoiste czynnika von Willebranda do płytek krwi można również spowodować przyłączeniem cząsteczki jednego z aktywatorów płytkowych, zwłaszcza trombiny lub ADP, do receptorów grupy pierwszej (Ryc. 1). Ten drugi mechanizm prowadzi jednak do kompleksowania czynnika von Willebranda z płytkami poprzez receptor fibrynogenu. Obecność dwóch różnych mechanizmów wiązania czynnika von Willebranda przez płytki [25] wykazano jednoznacznie w doświadczeniach, w których zastosowano przeciwciała monoklonalne przeciw GPIb i GPIIb/IIIa. W ten sposób stwierdzono, że płytki krwi z zespołem Bernarda-Soulier'a *in vitro* mają zdolność wiązania czynnika von Willebranda mechanizmem drugim, tj. poprzez receptory fibrynogenowe wówczas, gdy zostaną zaktywowane trombiną lub ADP.

Uważa się, że oddziaływanie czynnika von Willebranda z GPIb ma pierwszorzędowe znaczenie we wstępnych etapach aktywacji płytek krwi, nie tylko dlatego, że umożliwia adhezję płytek do subendotelium, ale także uaktywnia receptory fibrynogenu. Odgrywa w ten sposób również rolę w następnych etapach prowadzących do formowania skrzepu w miejscu uszkodzenia naczyń [29, 33, 38].

1-2.3. GPIb jako receptor trombiny

Jednym z centralnych problemów w badaniach oddziaływania trombiny z płytkami było wyjaśnienie, czy mechanizm działania trombiny indukujący agregację i reakcję uwalniania uwzględnia proteolizę określonego substratu w błonie, czy też jest podobny do oddziaływania typu hormon—receptor [39]. Dotychczasowe obserwacje pozwalają przypuszczać, że zmiany zachodzące w płytkach aktywowanych trombiną nie wynikają z jej proteolitycznego działania, a są efektem kompleksowania jej cząsteczki z powierzchniowym receptorem błony płytkowej. Do chwili obecnej natura oddziaływania trombiny z receptorem płytkowym nie została w pełni wyjaśniona. Cząsteczka trombiny

nie przenika przez dwuwarstwę lipidową błony i aktywuje płytki nawet wówczas, gdy jest kowalencyjnie związana ze złożem agarozowym [40]. Badania nad identyfikacją receptora płytkowego trombiny wykazały, że najprawdopodobniej funkcję taką spełnia GPIb [41, 42]. Częsteczka trombiny przyłącza się do tej części GPIb, która stanowi glikokalicynę (Ryc. 2). Przeciwciała monoklonalne i poliklonalne specyficzne dla tej części GPIb hamują kompleksowanie trombiny z płytkami. W ich obecności płytki krwi stają się niewrażliwe na działanie trombiny, tj. nie wiążą tego enzymu i nie agregują. W przeciwieństwie do innej glikoproteiny — GPV, też proponowanej jako receptor trombiny, GPIb nie jest wrażliwa na działanie proteolityczne tego enzymu.

Badania ilościowego oddziaływania trombiny z płytkami wykazały, że jej cząsteczki reagują z receptorami, które ze względu na powinowactwo wiązania należą do dwóch klas. W błonie płytkowej znajduje się 200—500 miejsc wiążących trombinę o wysokim powinowactwie ($K_D = 1 \text{ nM}$) oraz 2 000—20 000 miejsc o niskim powinowactwie ($K_D = 1 \mu\text{M}$) [43, 44]. Pomiar wiązania wykonany w sposób pozwalający na szybkie oddzielenie związanej od niezwiązanej trombiny wykazały, że przyłączanie trombiny do powierzchni płytek odbywa się bardzo szybko (5—15 s). Zgodne to jest ze znaną szybkością i silną aktywacją płytek pod wpływem trombiny. Przyłączanie trombiny do receptorów płytkowych może być całkowicie zablokowane hirudyną, która jest swoistym inhibitorem trombiny. Hirudyna dodana w odpowiednim czasie, tj. przed rozpoczęciem sekrecji składników płytkowych, powoduje uwolnienie trombiny z kompleksu, jaki tworzy ona z receptorem błony płytkowej. Dzięki zastosowaniu hirudyny do badań oddziaływania trombiny z receptorem udało się częściowo wyjaśnić mechanizm, poprzez który następuje generacja sygnału pobudzającego płytki [45, 46]. Ustalono, że trombina powoduje określone modyfikacje w płytkach krwi po skompleksowaniu z receptorem. Zmiany te pojawiają się w określonej sekwencji: a) rozpad fosfatydyloinozytolu, b) wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , oraz c) fosforylacja dwóch białek wewnątrzkomórkowych — lekkiego łańcucha miozyny i białka o masie 47 000. Na podstawie tych obserwacji można sądzić, że sygnał o pobudzeniu po skompleksowaniu trombiny z receptorem przesyłany jest do wnętrza płytek głównie za pośrednictwem produktów rozkładu fosfatydyloinozytolu, tj. diacyloglicerolu i trifosfoinozytolu.

I-3. Glikoproteina Ic (GPIc)

GPIc zbudowana jest z dwóch podjednostek polipeptydowych (GPIc α i GPIc β) o masach cząsteczkowych odpowiednio 134 000 i 27 000, które powiązane są mostkami dwusiarczkowymi. Białko to występuje w niewielkich ilościach w błonie płytkowej, słabo uwidacznia się w żelu poliakryloamidowym po rozdziale elektroforetycznym nawet wówczas, gdy żele barwione są srebrem. GPIc może być usunięta z powierzchni płytek po ekstrakcji 0.1 M roztworem NaOH [47]. Przypuszcza się, że GPIc jest białkiem peryferyjnym [4, 5]. Ostatnie badania

wykazały, że GPIc występuje w kompleksie z GPIIa. Przypuszcza się, że kompleks GPIc-IIa stanowi receptor dla fibronektyny na niestymulowanych płytkach [48].

I-4. Glikoproteiny IIb i IIIa (GPIIb i GPIIIa)

I-4.1. Budowa i właściwości heterodimeru GPIIb/IIIa

Podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym zawierającym SDS, GPIIb i GPIIIa wędrują jako odrębne białka. Istnieje jednak wiele danych przemawiających za tym, że mogą to być dwie podjednostki jednej i tej samej cząsteczki białkowej, które w błonie płytkowej są niekowalencyjnie powiązane ze sobą. Wskazują na to: a) występowanie GPIIb i GPIIIa w kompleksie 1:1 po rozpuszczeniu płytek w buforach zawierających detergenty niejonowe, b) tworzenie kompleksu GPIIb i GPIIIa w błonie płytek będących w stanie spoczynku, c) uzależnienie aktywności receptorowej od występowania obu glikoprotein w kompleksie, d) równoczesny brak GPIIb i GPIIIa w płytkach krwi osób chorych na trombastenię Glanzmanna [49—57].

GPIIb i GPIIIa są głównymi i najlepiej scharakteryzowanymi składnikami błon płytkowych, stanowią one około 18% całkowitej zawartości białek błonowych [4, 58, 59]. Cząsteczka GPIIb o m.c. 136 000 składa się z łańcucha alfa (m.c. 125 000), który jest połączony mostkami dwusiarczkowymi z mniejszą podjednostką beta (m.c. 21 000) [55, 60, 61] (Ryc. 3). GPIIIa jest zbudowana z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, który zawiera wiele wewnętrznych mostków dwusiarczkowych [9]. Redukcja GPIIIa powoduje zatem znaczną modyfikację kształtu cząsteczki, co uzewnętrznia się obniżeniem ruchliwości elektroforetycznej. Stąd, wyznaczona na drodze elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS m.c. GPIIIa przed redukcją wynosi 95 000, a po redukcji 105 000 [61]. Skład aminokwasowy GPIIb i IIIa wykazuje duże podobieństwo [62—64], jednakże mapy peptydowe tych glikoprotein są kompletnie różne. Z tego wynika, że GPIIIa nie jest fragmentem powstałym podczas proteolizy GPIIb [65—67], a obie glikoproteiny są produktami odrębnych genów. Ostatnio podano sekwencje aminokwasowe kilku fragmentów peptydowych GPIIb i GPIIIa [67, 68], które także nie wykazały żadnych homologii strukturalnych. Również badania immunologiczne z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych przeciw GPIIb i GPIIIa wykluczały podobieństwo antygenowe tych białek. Pełna sekwencja aminokwasowa endotelialnej GPIIIa została już wyznaczona. Poznane sekwencje aminokwasowe fragmentów płytkowych i endotelialnych GPIIIa wykazują całkowitą homologię. Na podstawie badań współczynnika hydrofobowości poszczególnych regionów GPIIIa podatności na proteolizę trypsynową nienaruszonych płytek oraz morfologii kompleksów GPIIb/IIIa wbudowanych w liposomy wnioskuje się, że cząsteczka GPIIIa zawierająca 762 aminokwasy składa się z:

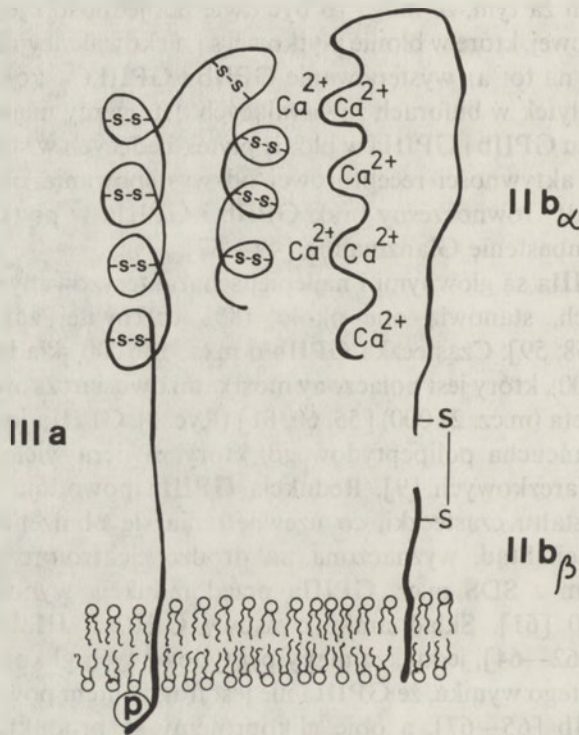
- 1) długiego NH_2 — końcowego, zewnątrzkomórkowego segmentu zawie-

rającego powtarzające się domeny bogate w cysteinę, składające się z około 40 aminokwasów każda;

2) silnie hydrofobowego fragmentu transbłonowego zawierającego 29 aminokwasów (poz. 693—721);

3) krótkiej COOH — końcowej domeny cytoplazmatycznej zawierającej 41 aminokwasów.

Struktura GPIIb i GPIIIa przedstawiona jest schematycznie na Ryc. 3. Wewnątrzkomórkowy fragment GPIIIa zawiera potencjalne miejsce fosforylacji tyrozyny (w pozycji 747). Nie wiadomo jednak, czy GPIIIa jest fosforylowana *in vivo*.



Ryc. 3. Schemat cząsteczki kompleksu GPIIb/IIIa. GPIIb składa się z dwóch podjednostek połączonych mostkiem dwusiarczkowym. Podjednostka α dzięki obecności struktur zbliżonych do kalmoduliny, kompleksuje jony Ca^{2+} , które również są niezbędne do utrzymania GPIIb i IIIa w kompleksie. Łańcuch polipeptydowy GPIIIa tworzy liczne wewnątrzłańcuchowe pętle stabilizowane mostkami dwusiarczkowymi.

Kompleksowanie GPIIb i GPIIIa zachodzi wyłącznie w obecności jonów wapnia lub magnezu [69]. Obie glikoproteiny wiążą jony Ca^{2+} [70, 71] i występują w kompleksie w błonach natywnych płytek krwi tak długo, jak stężenie jonów wapnia utrzymuje się powyżej 10^{-6} mol/l [72, 73]. Związki chelatujące jony dwuwartościowe powodują rozbitcie kompleksu GPIIb/IIIa [58, 61, 74—76], a następnie nieodwracalną polimeryzację GPIIb i IIIa [73].

GPIIb agreguje znacznie szybciej niż GPIIIa co sugeruje, że obie glikoproteiny mogą polimeryzować niezależnie od siebie. Dysocjacja kompleksu w płytkach będących w stanie spoczynku wywołana obecnością EDTA jest zależna od temperatury oraz pH [73, 76—79].

Obserwacje w mikroskopie elektronowym preparatów GPIIb i IIIa — wyodrębnionych z błon płytek ludzkich, a następnie wbudowanych w liposomy [80] — wykazały, że pojedyncze kompleksy GPIIb/IIIa przyjmują formę, w której można wyróżnić dwie domeny. Jedna z nich ma kształt spłaszczonej globuli („głowa”) o wymiarach 8×10 nm. Od niej odchodzą dwie nici („ogony”) rozciągające się na długości od 14 do 17 nm. Pod wpływem EDTA obie domeny dysocjowały i po ich rozdzieleniu na drodze ultrawirowania w gradencie sacharozy zostały zidentyfikowane jako poszczególne składniki kompleksu GPIIb/IIIa. Porównując obserwowane w mikroskopie elektronowym obrazy izolowanych GPIIb i GPIIIa oraz heterodimeru GPIIb/IIIa stwierdzono, że głowę tej struktury stanowi GPIIb, a „prętopodobnymi” ogonami jest GPIIIa. GPIIb/IIIa w środowisku pozbawionym detergentu agregują tworząc „klastery” lub „rozety” zawierające od 2—20 kopii kompleksu. W poszczególnych agregatach heterodimeru GPIIb/IIIa oddziaływały za pośrednictwem GPIIIa, a globularne formy GPIIb skierowane były na zewnątrz. Przypuszcza się, że heterodimeru GPIIb/IIIa powstają w obecności Ca^{2+} w wyniku połączenia globularnej GPIIb z częścią środkową wydłużonej cząsteczki GPIIIa. W nieobecności detergentu agregacja heterodimerów pośredniczona jest oddziaływaniem końcowych regionów fibrylarnej formy GPIIIa. Przypuszcza się, że właśnie te regiony GPIIIa są miejscami przyłączenia heterodimeru do dwuwarstwy lipidowej błony [80]. Z taką koncepcją ułożenia GPIIb i GPIIIa w błonie zgodne są ostatnie obserwacje wykazujące, że większość cząsteczki GPIIb znajduje się na zewnętrznej powierzchni błony płytkowej [69]. Kompleks GPIIb/IIIa jest zatem połączony z błoną płytkową hydrofobowym końcem cząsteczki GPIIIa, z którą związana jest GPIIb wystająca ponad zewnętrzną powierzchnię błony płytkowej. Nie wiadomo jeszcze w jaki sposób cząsteczka GPIIb zakotwiczona jest w dwuwarstwie błony. Połączenie takie musi także istnieć, ponieważ po dysocjacji heterodimeru spowodowanej EGTA obie glikoproteiny pozostają w błonie. Przypuszcza się, że albo GPIIb łączy się z błoną fosfolipidową zarówno w kompleksie z GPIIIa jak i w stanie zdysocjowanym, czego nie uwidoczniły obserwacje w mikroskopie elektronowym. Być może dysocjacja heterodimeru GPIIb/IIIa powoduje odsłonięcie nowych miejsc hydrofobowych na cząsteczce GPIIb, poprzez które może ona oddziaływać z błoną płytkową.

Kompleks GPIIb/IIIa wiąże się selektywnie z cytoszkieletem otrzymanym z płytek agregowanych trombiną [81—85]. Przyłączanie się heterodimeru GPIIb/IIIa do cytoszkieletu sugeruje jego specyficzne oddziaływanie z białkami kurczliwymi płytek [84, 86]. Aktywacja płytek innymi czynnikami, np. kwasem arachidonowym, również powoduje inkorporację heterodimeru do cytoszkieletu w ilościach sięgających 26% całej puli tego białka [81].

I-4.2. Heterodimer GPIIb/IIIa jako receptor fibrynogenu

I-4.2.1. Oddziaływanie fibrynogenu z płytkami krwi aktywowanymi różnymi agonistami

Podstawową reakcją, która umożliwia agregację płytek i w rezultacie utworzenie czopu hemostatycznego, jest przyłączenie dimerycznych cząsteczek fibrynogenu do receptorów pobudzonych płytek krwi. Fibrynogen kompleksując następnie z innymi białkami adhezywnymi, tj. czynnikiem von Willebranda, trombospondyna i fibronektyna, które również są dwu i więcej wartościowe, tworzy spoiwo zlepiające zagregowane płytki. Z wczesnych badań nad mechanizmem agregacji płytek krwi stymulowanej ADP wynikało, że podczas tej reakcji różne ilości radiojodowego fibrynogenu przyłączają się do powierzchni płytek. Najwięcej fibrynogenu wiąże się wówczas, gdy osiągnięte zostaje maksimum agregacji. Liczne późniejsze badania wykazały, że oddziaływanie fibrynogenu z płytkami zachodzi tylko wówczas, gdy ulegają one aktywacji. Inkubacja płytek krwi przez 30 min. w temperaturze 22°C w nieobecności aktywatora prowadzi do zaadsorbowania na powierzchni pojedynczej płytki mniej niż 1000 cząsteczek fibrynogenu. W tym samym czasie płytki inkubowane w obecności 10 μM ADP wiążą około 40 000 (20 000 do 50 000) cząsteczek fibrynogenu z pozorną stałą asocjacji równą $3.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Oddziaływanie fibrynogenu z płytkami krwi jest specyficzne i wymaga obecności jonów Ca^{2+} . W pięciu różnych laboratoriach wykazano, że w wiązaniu fibrynogenu uczestniczą receptory jednej klasy [74, 87–90]. W trzech innych laboratoriach na podstawie kształtu krzywej Scatcharda zaproponowano zaangażowanie w tej reakcji receptorów dwóch klas, różniących się powinowactwem wiązania [75, 78, 91]. Określono je receptorami fibrynogenu o wysokim powinowactwie wiązania ($K_A = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$; 1300 miejsc) oraz o niskim powinowactwie wiązania ($K_A = 1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; 80 000 miejsc). Występowanie receptorów fibrynogenu dwóch klas w płytkach krwi jest trudne do pogodzenia z ostatnimi badaniami, w których opisano przeciwciała monoklonalne hamujące całkowicie wiązanie fibrynogenu z płytkami.

Prawie wszystkie badania mechanizmu oddziaływania fibrynogenu z płytkami krwi przeprowadzone były na preparatach płytek wymytych z osocza krwi. Metody izolowania płytek krwi prowadzą zwykle do częściowej ich aktywacji. Z tego powodu niezwykle ważnym było wykazanie, że również ten sam mechanizm wiązania działa wówczas, gdy płytki krwi występują w naturalnym środowisku, tj. w osoczu. Tego typu doświadczenia zostały przeprowadzone po zawieszeniu płytek w osoczu uzyskanym od pacjenta z afibrynogenemią [92]. Również w takich warunkach wiązanie fibrynogenu do płytek krwi było specyficzne, zależne od jonów Ca^{2+} i opisane stałą asocjacji $K_A = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (32 000 miejsc).

Obecnie wiadomo, że inne aktywatory — adrenalina, trombina, kolagen, kwas arachidonowy, pewne pochodne prostaglandyn — PGH_2 , czynnik aktywujący płytki (PAF), a także jonofor wapniowy A 23187 mogą pobudzić wiązanie fibrynogenu do receptorów płytkowych. Wszystkie wyżej wymienione substancje

stymulują receptory fibrynogenowe prawdopodobnie według tego samego mechanizmu. Wynika to z następujących obserwacji: a) wiązanie fibrynogenu zależy od jonów dwuwartościowych (Ca^{2+} , Mg^{2+}), b) stała asocjacji opisująca to oddziaływanie mieści się w zakresie $(2 \div 4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, c) ilość miejsc wiążących fibrynogen wyznaczona w płytkach aktywowanych poszczególnymi agonistami wynosi od 20 000 do 80 000. Fibrynogen wiąże się bardzo szybko z płytkami aktywowanymi ADP, trombiną, jonoforem wapniowym oraz PAF, podczas gdy kinetyka wiązania fibrynogenu przez kolagen i adrenalinę jest znacznie wolniejsza. Większość z aktywatorów reagujących z receptorami grupy pierwszej (Ryc. 1) powoduje uwolnienie ADP z płytek krwi. Początkowo sądzono, że aktywacja receptorów fibrynogenu wywołana tymi aktywatorami zachodzi za pośrednictwem działania na płytki uwolnionego ADP [93]. Ostatnie obserwacje dowodzą funkcjonowania również mechanizmów aktywacji receptorów fibrynogenu, które są niezależne od ADP. Adrenalina jak i kwas arachidowy powodowały indukcję receptorów fibrynogenu w obecności apyrazy lub CP/CPK, tj. enzymów rozkładających ADP [88, 94].

Funkcjonowanie receptorów fibrynogenowych wydaje się być pod kontrolą szlaku prostagladynowego. Wskazuje na to fakt, że oddziaływanie fibrynogenu z płytkami jest hamowane przez indometacynę i aspirynę. Zgodny z taką koncepcją jest także z jednej strony hamujący wpływ PGE_1 i PGI_2 na agregację płytek krwi i wiązanie fibrynogenu do płytek aktywowanych ADP i trombiną, a z drugiej aktywujący wpływ nadtlenku PGH_2 na te same reakcje.

1-4.2.2. Kompleks GPIIb/IIIa jako receptor fibrynogenu

Na trop GPIIb/IIIa jako potencjalnego receptora płytkowego fibrynogenu naprowadziły analizy budowy i funkcji płytek pochodzących z krwi osób chorych na trombastenię Glanzmanna [95—97]. Płytki te nie są wrażliwe na działanie aktywatorów agregacji tj. ADP, adrenalina, trombina czy kolagen. Nie wiążą też fibrynogenu, a równocześnie w wyniku defektu genetycznego charakteryzują się brakiem lub znacznie obniżoną zawartością glikoprotein IIb i IIIa [54—57]. Funkcjonowanie kompleksu GPIIb/IIIa, jako płytkowego receptora fibrynogenu w błonie płytkowej, wskazane zostało później przez liczne doświadczenia, w których również stwierdzono, że kompleks ten jest także receptorem pozostałych białek adhezywnych [13, 14]. Heterodimer GPIIb/IIIa pełni więc centralną rolę w agregacji i adhezji płytek, a tym samym w procesie hemostazy i krzepnięcia krwi.

Ostatecznych danych na to, że GPIIb i IIIa są receptorami fibrynogenu dostarczyły prace, w których zbadano oddziaływanie fibrynogenu z kompleksami tych glikoprotein wyodrębnionymi z błon płytkowych, a następnie wbudowanymi w liposomy [98, 99]. Bardzo dużo informacji na temat ekspresji heterodimeru GPIIb/IIIa w płytkach dostarczały badania, w których użyto specyficznych przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych [55, 74, 98—104]. Już w jednych z pierwszych prac w tej serii wykazano, że przeciwciała

monoklonalne reagujące swoiście z GPIIb rozpoznają na pojedynczej płytce u zdrowych ludzi 39 000 miejsc, podczas gdy płytka chorych na trombastenię zawiera tylko 2000 takich miejsc [55]. Przeciwciała te nie hamowały wiązania fibrynogenu z płytkowym receptorem ani też agregacji płytek. W licznych późniejszych badaniach w tym samym celu zastosowano przeciwciała monoklonalne reagujące selektywnie z epitopem charakterystycznym tylko dla heterodimeru GPIIb/IIIa. W badaniach tych potwierdzono występowanie około 40 000 kopii tego kompleksu na pojedynczej płytce [105]. Przeciwciała dla GPIIb/IIIa silnie hamowały wiązanie fibrynogenu z receptorem płytkowym, a także agregację płytek [51, 106—113]. Taką samą liczbę kopii receptora fibrynogenu w normalnych płytkach stwierdzono w doświadczeniach, w których badano wiązanie radiojodowanego fibrynogenu do płytek aktywowanych trombiną, ADP, epinefryną, kolagenem i kwasem arachidonowym [62, 90, 107, 108, 114]. Wiązanie fibrynogenu zachodzi wyłącznie wówczas, gdy GPIIb i IIIa są skompleksowane [49, 115]. Płytki w spoczynku, mimo że zawierają taką samą liczbę kopii heterodimeru GPIIb/IIIa wykrywaną immunologicznie praktycznie nie wiążą fibrynogenu [50—53, 116]. Warunkiem wiązania fibrynogenu przez płytki jest więc nie tylko występowanie GPIIb i IIIa w kompleksie, ale również jego odpowiednia konformacja.

Bezwzględny warunkiem wiązania fibrynogenu jest obecność w środowisku płytek krwi jonów Ca^{2+} lub Mg^{2+} , przy czym maksymalne wiązanie zachodzi przy stężeniu jonów Ca^{2+} wynoszącym 0.5 mmol/l lub Mg^{2+} równym 2.5 mmol/l i zmniejsza się powyżej i poniżej tych wartości [117]. Początkowo sądzono, że uwolnienie wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} jest niezbędne na to, aby podtrzymać tworzenie kompleksów GPIIb/IIIa w błonie stymulowanych płytek. Ostatnie badania z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych rozpoznających epitopy, które występują tylko na kompleksie wykazały, że również w błonach płytek będących w spoczynku GPIIb i GPIIIa są powiązane ze sobą [50, 51, 53, 116]. W wyniku zastosowania odpowiednich przeciwciał monoklonalnych wykazano, że około 90% GPIIb i IIIa występuje w kompleksach zarówno w płytkach niestymulowanych jak i stymulowanych trombiną [73, 108]. Rozważano trzy mechanizmy reorganizacji GPIIb i GPIIIa w błonach niestymulowanych płytek oraz zmian, jakim ulegają podczas aktywacji [73, 118]. Są to: 1) Zmiany w zdysocjowanych podjednostkach, 2) tworzenie się kompleksu GPIIb/IIIa podczas stymulacji płytek, 3) zmiany konformacyjne kompleksów GPIIb/IIIa, które istnieją już na nieaktywnych płytkach. Obecnie przyjmuje się, że najbliższy prawdzie jest mechanizm, według którego aktywacja płytek wywołuje bardzo subtelne zmiany konformacyjne w cząsteczce heterodimeru GPIIb/IIIa, w wyniku których staje się on receptorem fibrynogenu [51].

Innym sposobem przekształcania kompleksu GPIIb/IIIa w receptor fibrynogenu jest ograniczona proteoliza płytek krwi chymotrypsyną, pronazą lub elastazą [91, 119]. Mechanizm tej reakcji nie jest do końca wyjaśniony. Przypuszcza się, że ograniczona proteoliza GPIIb/IIIa powoduje: a) zmiany konformacyjne cząsteczki, b) inne ich rozmieszczenie w błonie lub c) mo-

dyfikuje ich oddziaływanie z innymi białkami cytoplazmatycznymi lub błonowymi. Trawienie płytek chymotrypsyną, pronazą lub elastazą prowadzi do pojawienia się na powierzchni błony polipeptydu o masie cząsteczkowej 66 000 pochodzącego z rozkładu GPIIIa [119—122]. Zaobserwowano bezpośredni związek między pojawieniem się fragmentu o masie 66 000 i zdolnością płytek do agregacji indukowanej samym fibrynogenem.

I-4.2.3. Regiony cząsteczki fibrynogenu bezpośrednio oddziaływujące z receptorem płytkowym

W poszukiwaniu struktur, poprzez które fibrynogen wiąże się z GPIIb/IIIa wykazano we wstępnych badaniach, że podjednostki polipeptydowe gamma i alfa po wyodrębnieniu z cząsteczki macierzystej zachowują zdolność oddziaływania z płytkami [123]. Łańcuchy te hamowały wiązanie radiojodowanego fibrynogeny z płytkami, ale nie zastępowały fibrynogeny podczas agregacji. Aktywności kofaktorowej nabierały dopiero wówczas, gdy występowały w postaci agregatów wielocząsteczkowych [124]. W badaniach, w których zastosowano całą serię fragmentów peptydowych, wyodrębnionych z produktów rozkładu łańcucha gamma lub zsyntetyzowanych wykazano, że aktywność tego łańcucha pozostaje we fragmencie His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val odpowiadającym segmentowi gamma₄₀₀₋₄₁₁ [125]. Peptyd ten jest silnym inhibitorem wiązania fibrynogeny z receptorem płytkowym, jednak stała dysocjacji regulująca jego oddziaływanie z płytkami jest 10-krotnie wyższa od tej, która opisuje wiązanie fibrynogeny przez płytki.

Kolejnym fragmentem peptydowym, tym razem pochodzącym z łańcucha alfa fibrynogeny, który jest inhibitorem wiązania fibrynogeny z płytkami okazał się być Arg-Gly-Asp-Ser. Peptyd ten pochodzi z fragmentu łańcucha alfa₅₇₂₋₅₇₅, a w skróconej wersji jako Arg-Gly-Asp znajduje się też w alfa₉₅₋₉₇. Arg-Gly-Asp-Ser występuje również w innych białkach adhezywnych, tj. fibronektyna, vitronektyna i czynnik von Willebranda [126—128]. Oba peptydy hamują nie tylko wiązanie fibrynogeny z receptorami płytkowymi, ale także fibronektyny i czynnika von Willebranda. Te trzy białka hamują również wzajemnie swoje oddziaływanie z receptorami w płytkach aktywowanych trombiną, co wskazuje, że wiążą się z tym samym receptorem [129—134]. Ostatnie badania ujawniły, że oba peptydy — gamma₄₀₀₋₄₁₁ oraz Arg-Gly-Asp-Ser mogą wiązać się z tym samym miejscem kompleksu GPIIb/IIIa [126]. Sądzi się, że oddziaływanie peptydów, a także cząsteczki fibrynogeny, z kompleksem GPIIb/IIIa ma naturę elektrostatyczną i bardzo istotnym warunkiem jest nie tyle charakter bocznych reszt aminokwasowych budujących miejsce wiążące, co występowanie w odpowiedniej odległości zdysocjowanej grupy dodatniej i ujemnej. Wykazano również ostatnio [135], że zarówno peptyd pochodzący z łańcucha gamma fibrynogeny, jak i RGDS powodują zmianę konformacji oczyszczonego heterodimeru GPIIb/IIIa. Zmiany konformacyjne heterodimeru GPIIb/IIIa określano poprzez zmiany w podatności na proteolizę trombinową oraz właściwości hydrodynamicznych. Interesujące jest, że peptyd

Arg-Gly-Asp-Ser oraz Ser-Asp-Gly-Arg mają podobny wpływ hamujący na oddziaływanie makrocząsteczek z receptorami, co wykazano w doświadczeniach nad wiązaniem fibronektyny z fibroblastami [126].

Również inny krótki peptyd, Gly-Pro-Arg-Pro, który jest analogiem fragmentu Gly-Pro-Arg-Val odsłanianego w NH_2 — końcowym regionie łańcucha alfa przez trombinę podczas konwersji fibrynogenu we włóknik, jest inhibitorem agregacji [136].

I-4.3. Heterodimer GPIIb/IIIa jako receptor innych białek adhezywnych

I-4.3.1. GPIIb/IIIa jako receptor fibronektyny

Kompleks GPIIb/IIIa, który rozpoznaje sekwencję Arg-Gly-Asp, jest również receptorem fibronektyny [126, 137]. Wynika to między innymi z: a) braku wiązania fibronektyny z płytkami chorych na trombastenię Glanzmanna, b) zależności wiązania fibronektyny do zdrowych płytek aktywowanych trombiną od zawartości jonów wapnia, c) hamowania wiązania fibronektyny przez przeciwciała monoklonalne reagujące z GPIIb/IIIa, fibrynogen oraz przez krótkie peptydy (RGDS, $\gamma_{400-411}$), d) kompleksowania fibronektyny z heterodimerem GPIIb/IIIa wbudowanym w liposomy. Te ostatnie badania ostatecznie wykazały, że ^{125}I -Fn specyficznie przyłącza się do GPIIb/IIIa [137]. Fibronektyna nie wiąże się natomiast z płytkami aktywowanymi ADP czy adrenaliną.

Można sądzić, że kompleksowanie fibronektyny z heterodimerem GPIIb/IIIa odbywa się poprzez to samo miejsce co fibrynogen. Wynika to z następujących obserwacji: a) peptyd syntetyzowany w oparciu o sekwencję łańcucha γ fibrynogenu ($\gamma_{400-411}$) hamuje wiązanie fibrynogenu i fibronektyny z receptorem błon płytkowych; b) tetrapeptyd otrzymany w oparciu o sekwencję Arg-Gly-Asp-Ser pierwotnie wykrytą w cząsteczce fibronektyny, również hamuje wiązanie obu białek do płytek; c) niektóre przeciwciała przeciw kompleksowi GPIIb/IIIa hamują wiązanie zarówno fibronektyny jak i fibrynogenu [129]. ^{125}I -Fn wiąże się z heterodimerem GPIIb/IIIa w znacznie większych ilościach w obecności Mg^{2+} niż Ca^{2+} . Po aktywacji trombiną płytka krwi zawiera około 26 000 miejsc wiążących fibronektynę [129]. Znaczenie fizjologiczne przyłączenia fibronektyny do receptorów aktywowanych płytek nie jest wyjaśnione. Przeciwciała dla fibronektyny hamują adhezję płytek do subendotelium, a także agregację indukowaną trombiną czy jonoforem wapniowym A23187. Przypuszcza się, że fibronektyna ułatwia rozplaszczanie się płytek krwi na włóknach kolagenowych.

I-4.3.2. Kompleks GPIIb/IIIa jako receptor czynnika von Willebranda

Czynnik von Willebranda jest glikoproteiną osoczną biorącą udział w adhezji płytek do ściany uszkodzonego naczynia. W wielu pracach wykazano, że peptydy zawierające sekwencję RGDS hamują również wiązanie tego białka do płytek. Analiza sekwencji aminokwasowej czynnika von Willebranda wskazuje,

że zawiera on fragment RGDS w swojej strukturze. Przy pomocy przeciwciał rozpoznających różne epitopy czynnika von Willebranda zidentyfikowano fragmenty cząsteczki, które bezpośrednio kompleksują z receptorem płytkowym. I tak np. domena wiążąca cząsteczkę z płytkami aktywowanymi trombiną znajduje się w COOH — końcowym fragmencie czynnika von Willebranda. Właśnie w tej części cząsteczki występuje sekwencja Arg-Gly-Asp (poz. 1744—1747) [127] i prawdopodobnie pośredniczy w kompleksowaniu czynnika von Willebranda z powierzchnią płytki. Peptydy zawierające sekwencję RGDS, a także dekapeptyd pochodzący z COOH — końca łańcucha γ cząsteczki fibrynogenu, oddziałując prawdopodobnie z tym samym miejscem w kompleksie GPIIb/IIIa (127, 131) hamują wiązanie tego białka z płytkami.

Badania roli ADP i fibrynogenu w wiązaniu czynnika von Willebranda z płytkami *in vitro* wykazały, że wiąże się on specyficznie w sposób zależny od czasu i stężenia, osiągając równowagę w ciągu 20 min. [131] oraz nasycenie przy stężeniu 12 $\mu\text{g/ml}$. Płytki aktywowane trombiną wiążą około 50 ng ^{125}I -vWF na 10^8 płytek (129). Wiązanie czynnika von Willebranda było hamowane przez EDTA i prostacyclinę I_2 — znany aktywator płytkowej cykazy adenylowej. Apyraza oraz w znacznie silniejszym stopniu FSBA (analog ADP) hamują wiązanie czynnika von Willebranda do płytek pobudzonych trombiną, jonoforem A23187 lub kolagenem [131]. Ani fibrynogen, ani też przeciwciała dla kompleksu GPIIb/IIIa nie mają wpływu na ilość przyłączonego czynnika von Willebranda do powierzchni niepobudzonych płytek lub do płytek aktywowanych w nieobecności jonów Ca^{2+} . Przeciwciała przeciw GPIIb/IIIa hamują natomiast w około 72% wiązanie czynnika von Willebranda z płytkami aktywowanymi trombiną w obecności 5 mmol/L Ca^{2+} . Wówczas przeciwciała dla GPIb (6D1) nie mają żadnego wpływu na wiązanie czynnika von Willebranda z powierzchnią płytek, co oznacza, że w takich warunkach, tj. do płytek aktywowanych trombiną lub ADP w obecności jonów Ca^{2+} , białko to przyłącza się poprzez kompleks GPIIb/IIIa.

1-4.4. GPIIb/IIIa jako przedstawiciel cytoadhezyn

GPIIb i GPIIIa syntetyzowane są przez megakariocyty [141—143]. Poza zewnętrznymi błonami płytkowymi obecność ich wykazano również w błonach ziarnistości typu alfa. Ostatnie badania wykazały, że białka reagujące krzyżowo z przeciwciałami dla GPIIb i GPIIIa występują również w błonach innych komórek, np. komórek endotelialnych [144], HELA, fibroblastach i klonach komórek nowotworowych [60, 144—147]. Cząsteczki tych białek są immunologicznie, strukturalnie i prawdopodobnie funkcjonalnie zbliżone do płytkowego kompleksu GPIIb/IIIa. Przemawiają za tym następujące obserwacje: a) wszystkie są białkami powierzchniowymi, co wykazano przez immunofluorescencję oraz metodę znakowania powierzchniowego, b) ich masy cząsteczkowe są bardzo zbliżone, c) ruchliwości elektroforetyczne podjednostek odpowiadających GPIIIa maleją po redukcji, d) obie podjednostki analogiczne do

GPIIb i GPIIIa występują w kompleksie [60], e) dają się wyodrębnić z homogenatu komórkowego na drodze chromatografii powinowactwa używając złoża z kowalencyjnie związanym peptydem Arg-Gly-Asp-Ser. Częsteczki białek pochodzących z komórek różnych typów nie są jednak identyczne, co wynika z odmiennego oddziaływania z odpowiednimi przeciwciałami. Sądzi się, że mogą one pośredniczyć podczas oddziaływania komórek różnego typu ze sobą jak i z tkanką łączną. Przemawiają za tym dane, zgodnie z którymi: a) receptory fibroblastów reagujące z fibronektyną należą do tej samej grupy co płytkowe GPIIb/IIIa, tj. rozpoznają sekwencję Arg-Gly-Asp-Ser, b) GPIIb odgrywa rolę w adhezji płytek do włókien kolagenu [148], a więc jest możliwe, że GPIIb występująca, np. w komórkach endotelialnych może odgrywać ważną rolę w przyłączaniu tych komórek do włókien kolagenowych ściany naczynia. Ostatnie badania wykazały, że kompleks GPIIb/IIIa występujący w komórkach endotelialnych tak samo jak w płytkach, jest receptorem powierzchniowym białek adhezywnych [149]. Zaproponowano nazwanie całej rodziny cząsteczek podobnych do GPIIb/IIIa — cytoadhezynami [144].

I-5. Glikoproteina V (GPV)

GPV jest zbudowana z jednego łańcucha polipeptydowego o masie 82 000 i ma typowy charakter hydrofobowy. Cukry stanowią około 48% całkowitej masy tej glikoproteiny. GPV jest białkiem peryferyjnym, może być eluowane z płytek buforami o wysokiej sile jonowej. GPV jest substratem trombiny w niestymulowanych płytkach [15]. Przypuszczano więc, że może być receptorem tego enzymu. W wyniku działania trombiny następuje fragmentacja GPV z równoczesnym uwolnieniem z płytek produktu o masie 69 500. Hydroliza tej glikoproteiny obserwowana jest dla wyższych stężeń trombiny niż wartość progowa wymagana do wywołania agregacji płytek. Pomiary szybkości hydrolizy GPV wykazują, że rozkład tej glikoproteiny poprzedza agregację płytek aktywowanych trombiną [152], nie ma miejsca natomiast podczas stymulacji innymi czynnikami, np. ADP czy adrenaliną. GPV ulega również łatwo trawieniu przez inne proteazy, m.in. chymotrypsynę oraz elastazę dając hydrofilowe produkty rozkładu [15]. Proteazy, które nie aktywują płytek, np. kalpaina i chymotrypsyna, powodują usuwanie większych fragmentów z GPV niż proteazy, które są aktywatorami płytkowymi (trombina, trypsyna). Płytki pacjentów z zespołem Bernarda-Soulier'a nie zawierające powierzchniowej GPV, wykazują zredukowaną odpowiedź na działanie trombiny [5, 153]. Znaczenie hydrolizy GPV dla aktywacji płytek pozostaje w dalszym ciągu nie w pełni wyjaśnione.

I-6. Glikoproteina IX (GPIX)

Badania nad funkcją GPIX, czasami określanej też jako GP 17, rozpoczęły się w ostatnich latach [5, 6, 27, 34, 153]. Różni autorzy podają wartości masy cząsteczkowej GPIX w zakresie od 17 000 do 22 000. GPIX występuje w

kompleksie z GPIb w stosunku 1:1, w liczbie 25 000 kopii/płytkę [154]. Obserwuje się brak tej GP w płytkach pacjentów z zespołem Bernarda-Soulier'a [30, 31].

II. Inne glikoproteiny

II-1. Receptory ADP

Płytki krwi mają na swojej powierzchni receptory adenosynodifosforanu (ADP), który oprócz trombiny jest głównym fizjologicznym czynnikiem indukującym agregację płytek [155]. ADP jest wydzielany w dużych ilościach z płytek krwi podczas reakcji uwalniania i na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego wzmacnia agregację płytek [156]. Przypuszcza się, że ADP łączy się z określonymi miejscami receptorowymi, obecnymi na powierzchni nieaktywowanych płytek. Dokładny mechanizm, jakim ADP indukuje agregację nie jest dotychczas poznany [157]. Wiadomo, że na powierzchni płytki występuje 100 000 [158] do 200 000 [156] miejsc wiążących ADP. Zaobserwowano ścisłą zależność przyłączania tego nukleotydu do miejsc receptorowych od temperatury i obecności jonów dwuwartościowych (Ca^{2+} , Mg^{2+}) [156]. Najefektywniej proces ten zachodzi w temperaturze 37°C i słabnie w miarę obniżania temperatury. W celu zlokalizowania oraz zbadania struktury receptorów ADP posłużono się w badaniach znakowanym ^{14}C -ADP, jak również radioaktywnie znakowanymi analogami ADP z podstawnikami w pozycji drugiej np. 2-chloro, 2-thio, 2-metylo ADP oraz β - ^{32}P -2-azido-ADP. Wszystkie analogi silnie indukowały agregację płytek [159]. Analog ^{32}P -2-azido-ADP jest 5-krotnie silniejszym czynnikiem agregującym niż ADP i 10—20-krotnie silniejszym inhibitorem PGE_1 [159]. Na to, że analog ten reaguje z receptorem ADP wskazuje fakt, że ADP hamuje kompetycyjnie wiązanie 2-azido-ADP z płytkami. Inny analog ADP, tj. PMBS (p-mercuribenzenesulfonate) również w 100% hamuje przyłączanie ADP do płytek. Blokuje on też działanie ADP na cyklazę adenylową, lecz nie znosi zdolności ADP do wywoływania zmiany kształtu płytki. Opisano białko błony płytkowej o masie cząsteczkowej 61 000, które wiąże ADP i odpowiedzialne jest za hamujący wpływ tego nukleotydu na cyklazę adenylową. Białko to wyodrębnione zostało z płytkowej cyklazy adenylowej [160], która pośredniczy w aktywującym działaniu niektórych aktywatorów. Wiadomo, że wysoki poziom cAMP hamuje agregację płytek i wszystkie niemal czynniki indukujące agregację płytek, w tym ADP i trombina, odznaczają się zdolnością do obniżania poziomu cAMP [160]. PMBS odznacza się również zdolnością hamowania innego enzymu błony płytkowej, nukleozydodifosfoesterazy. Enzym ten katalizuje konwersję ADP do ATP, jak również innych difosforanów do trifosforanów, które podobnie jak ATP są silnymi czynnikami hamującymi proces agregacji płytek [155]. Podobnie jak w przypadku cyklazy adenylowej, także z nukleozydo difosfoesterazy wyodrębniono białko o m.cz 61 000, które najprawdopodobniej stanowi płytkowy receptor dla ADP. Badania wykazały, że

również w tym przypadku receptor ten nie jest odpowiedzialny za indukcję zmiany kształtu płytki [160]. Przypuszcza się, że są dwa rodzaje receptorów ADP w płytkach krwi [155]: a) białko o m.c. 61 000 odpowiedzialne za hamowanie cyklazy adenylowej stymulowanej przez PGE_1 i PGI_2 oraz b) odpowiedzialny za indukcję zmiany kształtu płytki. Z uwagi na to, że płytka zawiera dużą ilość białek kurczliwych: aktynę i miozynę, przypuszczano, że receptory dla ADP odpowiedzialne za zmianę kształtu płytki mogą być związane z systemem kurczliwym płytki. W celu potwierdzenia tej hipotezy, prowadzono badania z użyciem znakowanej ^{14}C 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl-adenozyny (5'FSBA), analogu ADP [155, 161, 162]. Związek ten poprzez grupę fluorosulfonową tworzy trwałe wiązanie kowalencyjne z resztami aminokwasowymi Tyr, Lys i His [155]. 5'FSBA hamuje częściowo zmianę kształtu płytki wywołaną przez ADP poprzez oddysocjowanie fibrynogenu od jego miejsc wiążących na płycie. Aktywacja płytek ADP lub trombiną w obecności 5'FSBA nie prowadzi do wbudowywania się tego związku do polipeptydów błony płytkowej [161]. Inkubacja całych płytek lub błon płytkowych z 5'FSBA przed dodaniem ADP niemal w 100% hamuje wiązanie się ADP do płytek, co świadczy o występowaniu wspólnych miejsc wiążących dla ADP i 5'FSBA. W przypadku użycia do badań całych płytek, 5'FSBA znakuje tylko polipeptyd o masie 100 000, zaś w przypadku błon płytkowych polipeptydy — 200 000, 135 000, 100 000 i 43 000. Te ostatnie zidentyfikowano odpowiednio jako ciężki łańcuch miozyny, winkulinę, glikoproteinę płytkową i aktynę [161]. Na podstawie tych badań zasugerowano, że specyficznym receptorem płytkowym ADP, odpowiedzialnym za zmianę kształtu płytki podczas aktywacji może być glikoproteina o masie 100 000. Łączy się ona z aktyną (43 000) i miozyną (200 000), białkami cytoszkieletarnymi występującymi po wewnętrznej stronie błony płytkowej. Przyłączenie ADP do tego receptora powodowałoby transbłonowe pobudzenie białek kurczliwych, skutkiem czego płytka zmienia kształt z dyskowatej na sferyczną [156, 161].

Na powierzchni płytki funkcjonują zatem dwa różne mechanizmy odpowiedzialne za interakcję płytki z ADP. Jeden z nich odpowiedzialny za indukowanie zmiany kształtu płytki i związany z polipeptydem o masie cząsteczkowej 100 000, zaś drugi związany jest z hamowaniem aktywności enzymatycznej cyklazy adenylowej i nukleozydodifosfoesterazy. Polipeptyd o masie cząsteczkowej 61 000 wydaje się być odpowiedzialny za te oddziaływania [155, 161].

Artykuł otrzymano 24 września 1987 r.

Zaakceptowano do druku 6 marca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Bubis J., Isern X., (1983), *Comp. Biochem. Physiol.*, **75B**, 245—253.
2. Chambers D.A., Salzman E.W., Neri L.L., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 173—178.

3. Gluccione M.A., Packham M.A., Kinlough-Rathbone R.L., (1971), *Blood*, **37**, 542—551.
4. Phillips D.R., Agin P.P., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2121—2126.
5. Clemetson K.J., Mc Gregor J.L., James E., (1982), *J. Clin. Invest.*, **70**, 304—311.
6. Phillips D.R., Agin P.P., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 940—947.
7. Sixma J.J., Schiphorst M.E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **603**, 70—83.
8. Rotman A., Heldman J., Linder S., (1982), *Biochemistry*, **21**, 1713—1719.
9. Nurden A.T., (1987), w *Thrombosis Haemostasis* (red. Verstraete M., Vermynen J., Lijnen R., Arnout J.), str. 93—125; Leuven University Press.
10. Jenkins C.S.P., Clemetson K.J., Ali-Briggs E.F., (1983), *Br. J. Haemat.*, **53**, 491—501.
11. Nieuwenhuis H.K., Akkerman J.W., Houdijk W.P., Sixma J.J., (1985), *Nature*, **318**, 470—472.
12. Nieuwenhuis H.K., Sakariassen K.S., Houdijk W.P.M., Nievelstein P., Sixma J.J., (1986), *Blood*, **68**, 692—703.
13. Solum N.O., Hagen I., Peterka M., (1977), *Thromb. Res.*, **10**, 71—79.
14. Dooper H.A., Clemetson K.J., Luscher E.F., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1069—1073.
15. Wicki N., Clemetson K.J., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **153**, 1—11.
16. Okumura T., Lombart C., Jamieson G.A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5950—5955.
17. Solum N.O., Hagen I., Filion-Myklebust C., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 235—246.
18. Solum N.O., Hagen I., Sletbakk T., (1980), *Thromb. Res.*, **18**, 773—785.
19. Korrel S.A.M., Clemetson K.J., Van Halbeck H., Kamerling J.P., Sixma J.J., Vliegenthart J.F.G., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **140**, 571—576.
20. Collier B.S., Kalomiris E.L., Steinberg M., Scudder L.E., (1983), *Blood*, **62**, 253a (suppl. 1).
21. Solum N.O., Olsen T.M., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **799**, 209—220.
22. Marchesi S.L., Chasis J.A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 442—459.
23. Fox J.E.B., Baughan A.K., Phillips D.R., (1983), *Blood*, **62**, 255a (suppl. 1).
24. Clemetson K.J., (1983), *Blood Cells*, **9**, 319—329.
25. Marco L., Girolami A., Russel S., Ruggeri Z.M., (1985), *J. Clin. Invest.*, **75**, 1198—1203.
26. Bourguignon L.Y.W., Walker G., Bourguignon G.J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11775—11780.
27. Berndt M.C., Gregory C., Kabral A., Castaldi P.A., (1985), *Thromb. Haemost.*, **54**(1), 1—372.
28. Berndt M.C., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 256.
29. Carnahan G.E., Cunningham L.W., (1983), *Biochemistry*, **22**, 5384—5389.
30. Tschopp T., Weiss H.J., Baumgartner H.R., (1974), *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 296—299.
31. Jamieson G.A., Okumura T., Fishback B., Johnson M., Egan J.J., (1979), *J. Lab. Clin. Med.*, **93**, 652—658.
32. Jenkins C.S.P., Phillips D.R., Clemetson K.J., Meyer D., Larrieu M.J., Luscher E.F., (1976), *J. Clin. Invest.*, **57**, 112—124.
33. Taki M., Sato K., Ikeda Y., Yamamoto M., Watanabe K., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 193.
34. Collier B.S., Peerschke E.I., Scudder L.E., Sullivan C.A., (1983), *Blood*, **61**, 99—110.
35. Adelman B., Michelson A.D., Handin R.I., Ault K.A., (1985), *Blood*, **66**, 423—427.
36. Adelman B., Michelson A.D., Loscalzo J., Greenberg J., Handin R.I., (1985), *Blood*, **65**, 32—40.
37. Collier B.S., Peerschke E.I., Scudder L.E., Sullivan C.A., (1983), *Blood*, **61**, 99—110.

38. Solum N.O., Hagen I., Peterka M., Gjerdal T., (1979), *Thromb. Haemost.*, **42**, 1626.
39. Wyler B., Clemetson K.J., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 34.
40. Workman E.F., White II G.C., Lundblad R.L., (1976), *Thromb. Res.*, **9**, 491—503.
41. Ganguly P., (1977), *Br. J. Haemat.*, **37**, 47—51.
42. Ganguly P., Gould N.L., (1979), *Br. J. Haemat.*, **42**, 137—145.
43. Tollefsen D.M., Feagler J.R., Majerus P.W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2646—2651.
44. Martin B.M., Wasiewski W.W., Fenton II J.W., Detwiler T.C., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4886—4893.
45. Phillips D.R., Jennings L.K., Berndt M.C., Prasanna H.R., Fox J.E.B., Edwards H.H., (1980) w *Platelets: Cellular Response Mechanisms and their Biological Significance.*, (red. Rotman A., Meyer F.A., Gitler C., Silberberg A.), str. 131—141; John Wiley & Sons Ltd., New York.
46. Detwiler T.D., Tam S.W., (1980) w *Platelets: Cellular Response Mechanisms and their Biological Significance* (red. Rotman A., Meyer F.A., Gitler C., Silberberg A.), str. 143—150; John Wiley & Sons Ltd., New York.
47. Sixma J.J., Schiphorst M.E., Verhoeck C., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 333—344.
48. Piotrowicz R.S., Yamada K.M., Kunicki T.J., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 304.
49. Rosa J.P., Kieffer N., Didry D., Pidard D., Kunicki T.J., Nurden A.T., (1984), *Blood*, **64**, 1246—1253.
50. Newman P.J., Allen R.W., Kahn R.A., Kunicki T.J., (1985), *Blood*, **65**, 227—232.
51. Peerschke E.I.B., (1985), *Semin. Hematol.*, **22**, 241—259.
52. Coller B.S., Peerschke E.I., Nurden A.T., (1983), *Thromb. Res.*, **50**, 314a.
53. Montgomery R.R., Kunicki T.J., Taves C., (1983), *J. Clin. Invest.*, **71**, 385—389.
54. Phillips D.R., Jenkins C.S.P., Luscher E.F., Larrieu M.J., (1975), *Nature*, **257**, 599—560.
55. McEver R.P., Baenziger N.L., Majerus P.W., (1980), *J. Clin. Invest.*, **66**, 1311—1318.
56. Phillips D.R., Agin P.P., (1977), *J. Clin. Invest.*, **60**, 535—545.
57. Shulman S., Karpatkin S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4320—4327.
58. Kunicki T.J., Pidard D., Rosa J.P., (1981), *Blood*, **58**, 268—278.
59. Newman P.J., Knipp M.A., Kahn R.A., (1982), *Thromb. Res.*, **27**, 221—224.
60. Newman P.J., Kawai Y., Montgomery R.R., Kunicki T.J., (1986), *J. Cell. Biol.*, **103**, 81—86.
61. Jennings L.K., Phillips D.R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10458—10466.
62. McEver R.P., Baenziger J.U., Majerus P.W., (1982), *Blood*, **59**, 80—85.
63. Calvete J.J., Gonzalez-Rodriguez J., (1986), *Biochem. J.*, **240**, 155—161.
64. Eirin M.T., Calvete J.J., Gonzalez-Rodriguez J., (1986), *Biochem. J.*, **240**, 147—153.
65. Leung L.L.K., Kinoshita T., Nachman R.L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1994—1997.
66. McGregor J.L., Clemetson K.J., James E., Clezardin P., Dechavanne M., Luscher E.F., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 513—522.
67. Hiraiwa A., Matsukage A., Shiku H., Takahashi T., Naito K., Yamada K., (1987), *Blood*, **69**, 560—564.
68. Fitzgerald L.A., Steiner B., Rall Jr. S.C., Lo Shanshan, Phillips D.R., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3936—3939.
69. Parise L.V., Phillips D.R., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1750—1756.
70. Brass L.F., Shattil S.J., (1984), *J. Clin. Invest.*, **73**, 626—632.
71. Brass L.F., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 2231—2236.
72. Fujimura K., Phillips D.R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 10247—10252.

73. Fitzgerald L. A., Phillips D. R., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11366—11374.
74. Hawiger J., Parkinson S., Timmons S., (1980), *Nature*, **283**, 195—197.
75. Di Minno G., Thiagarajan P., Perussia B., (1983), *Blood*, **61**, 140—148.
76. Gogstad G. O., Hagen I., Krutnes M. B., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 21—30.
77. Collier B. S., Peerschke E. I., Seligsohn U., Scudder L. E., Nurden A. T., Rosa J. P., (1986), *J. Lab. Clin. Med.*, **107**, 384—392.
78. Peerschke E. I., Zucker M. B., Grant R. A., Egan J. J., Jonson M. J., (1980), *Blood*, **55**, 841—847.
79. Marguerie G. A., Plow E. F., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1074—1080.
80. Carrel N. A., Fitzgerald L. A., Steiner B., Erikson H. P., Phillips D. R., (1985); *J. Biol. Chem.*, **260**, 1743—1749.
81. Wheeler M. E., Cox A. Ch., Carroll R. C., (1984), *J. Clin. Invest.*, **74**, 1080—1084.
82. Tuszyński G. P., Daniel J. L., Stewart G., (1985), *Semin. Hematol.*, **22**, 303—312.
83. Painter R. G., Ginsberg M., (1982), *J. Cell. Biol.*, **92**, 565—573.
84. Phillips D. R., Jennings L. K., Edwards H. H., (1980), *J. Cell. Biol.*, **86**, 77—86.
85. Fox J. E. B., (1987) w *Thrombosis Haemostasis* (red. Verstraete M., Vermynen J., Lijnen R., Arnout J.), str. 175—225; Leuven University Press.
86. Tuszyński G. P., Kornecki E., Cierniewski C., Knight L. C., Koshy A., Srivastova S., Niewiarowski S., Walsh P., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5247—5254.
87. Bennett J. S., Vilaire G., Burch J. W., (1981), *J. Clin. Invest.*, **68**, 981—987.
88. Harfenist E. J., Guccione M. A., Packham M. A., Kinlough-Rathbone R. L., Mustard J. F., (1982), *Blood*, **59**, 956—962.
89. Pasqua J. J., Pizzo S. V., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **757**, 282—287.
90. Marguerie G. A., Edgington T. S., Plow E. F., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 154—161.
91. Niewiarowski S., Budzyński A. Z., Morinelli T. A., Brudzyński T., Stewart G. J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 917—925.
92. Marguerie G. A., Plow E. F., (1982), w *Fibrinogen — Recent Biochemical and Medical Aspects*, (red. Henschen A., Graeff H., Lattspeich F.), str. 369—375; de Gruyter, Berlin.
93. Plow E. F., Marguerie G. A., (1980), *Blood*, **56**, 553—555.
94. Plow E. F., Marguerie G. A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10971—10977.
95. Hagen I., Nurden A. T., Bjerrum O. J., (1980), *J. Clin. Invest.*, **65**, 722—731.
96. Nurden A. T., Caen J. P., (1979), *Semin. Hematol.*, **16**, 234—250.
97. Degos L., Dautigny A., Brouet J. C., Colombani M., Ardailou N., Caen J. P., Colombani J., (1975), *J. Clin. Invest.*, **56**, 236—240.
98. Nachman R. L., Leung L. L. K., (1982), *J. Clin. Invest.*, **69**, 263—269.
99. Parise L. V., Phillips D. R., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10698—10707.
100. Solum N. O., (1985), *Semin. Hematol.*, **22**, 289—302.
101. Marguerie G. A., Thomas-Maisons N., Ginsberg M. H., Plow E. F., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **139**, 5—11.
102. Yamamoto N., Kitagawa H., Tanoue K., Yamazaki H., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 561.
103. Marguerie G. A., Plow E. F., Edgington T. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5357—5663.
104. Mustard J. F., Packham M. A., Kinlough-Rathbone R. L., (1978), *Blood*, **52**, 453—466.
105. Brass L. F., Sanford J. S., Kunicki T. J., Bennett J. S., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7875—7881.
106. Rybak M. E., (1986), *Thromb. Haemost.*, **55**, 240—245.
107. Bennett J. S., Hoxie J. A., Leitman S. F., Vilaire G., Cines D. B., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2417—2421.
108. McEver R. P., Bennett E. M., Martin M. N., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 5269—5275.
109. Collier B. S., Peerschke E. I., Scudder L. E., (1983), *J. Clin. Invest.*, **72**, 325—338.
110. Di Minno G., Thiagarajan P., Perussia B., Martinez J., Shapiro S., Thrinchieri G., Murphy S., (1983), *Blood*, **61**, 140—148.

111. Pidard D., Montgomery R.R., Kunicki T.J., (1982), *Blood*, **60**, (suppl. 1), 203a.
112. Woods V.L. Jr., Ginsberg M.H., Kunicki T.J., (1982), *Blood*, **60**, 205a.
113. Trapani Lombardo V., Hodson E., Roberts J.R., Kunicki T.J., Zimmerman T.S., Ruggeri Z.M., (1985), *J. Clin. Invest.*, **76**, 1950—1958.
114. Pidard D., Montgomery R.R., Bennett J.S., Kunicki T., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12582—12586.
115. Gogstad G.O., Brosstad F., Krutnes M.B., Hagen I., Solum N.O., (1982), *Blood*, **60**, 663—671.
116. Bennett J.S., (1985), w *Platelet Membrane Glycoproteins* (red. George J.N., Nurden A.T., Phillips D.R.), str. 193—214; Plenum Publishing Corporation, New York.
117. Bennett J.S., Vilaire G., (1979), *J. Clin. Invest.*, **64**, 1393—1401.
118. Collier B.S., (1985), *J. Clin. Invest.*, **76**, 101—108.
119. Kornecki E., Ehrlich Y.H., De Mars D.D., Lenox R.H., (1986), *J. Clin. Invest.*, **77**, 750—756.
120. Kornecki E., Niewiarowski S., Morinelli T.A., Kłoczewiak M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5696—5701.
121. Kornecki E., Si-Yiu Chung, Holt J.C., Cierniewski C.S., Tuszyński G.P., Niewiarowski S., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **818**, 285—290.
122. Kornecki E., Tuszyński G.P., Niewiarowski S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9348—9356.
123. Gartner T.K., Bennett J.S., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11891—11894.
124. Kłoczewiak M., Timmons S., Lukas T.J., Hawiger J., (1984), *Biochemistry*, **23**, 1767—1774.
125. Lam S., Plow E.F., Smith M.A., Andrieux A., Ryckwaert J.J., Marguerie G., Ginsberg M.H., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 947—950.
126. Haverstick D.M., Cowan J.F., Yamada K.M., Santoro S., (1985), *Blood*, **66**, 946—952.
127. Houdijk W.P.M., Girma J.P., Van Mourik J.A., Sixma J.J., Meyer D., (1986), *Thromb. Haemost.*, **56**, 391—396.
128. Shelton-Inloes B.B., Titani K., Sadler J.E., (1986), *Biochemistry*, **25**, 3164—3174.
129. Plow E.F., McEver R.P., Collier B.S., Woods V.L., Marguerie Jr. G.A., Ginsberg M.H., (1985), *Blood*, **66**, 724—727.
130. Plow E.F., Srouji A.H., Meyer D., Marguerie G., Ginsberg M.H., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5388—5391.
131. Timmons S., Kłoczewiak M., Hawiger J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4935—4939.
132. Pytela R., Pierschbacher M.D., Ginsberg M.H., Plow E., Ruoslahti E., (1986), *Science*, **231**, 1559—1562.
133. Hawiger J., Timmons S., Kłoczewiak M., Strong D.D., Doolittle R.F., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2068—2071.
134. Ginsberg M., Pierschbacher M.D., Ruoslahti E., Marguerie G., Plow E.F., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 3931—3936.
135. Parise L.V., Steiner B., Nannizzi L., Phillips D.R., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 243.
136. Plow E.F., Marguerie A.G., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3711—3715.
137. Parise L.V., Phillips D.R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 14011—14017.
138. Plow E.F., Ginsberg M.H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9477—9482.
139. Fujimoto T., Hawiger J., (1982), *Nature*, **297**, 154—156.
140. Wolff R., Plow E.F., Ginsberg M.H., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 6840—6846.
141. Rabellino E.M., Nachman R.L., Williams N., Winchester R.J., Ross G.D., (1979), *J. Exp. Med.*, **149**, 1273—1278.
142. Rabellino E.M., Levene R.B., Leung L.L.K., Nachman R.L., (1981), *J. Exp. Med.*, **154**, 88—100.

143. Vinci G., Tabilio A., Deschamps J.E., Van Haeke D., Henri A., Guichard A., Tetteroo P., Landsdorp P.M., Hercend T., Vainchenker W., Breton-Gorius J., (1984), *Br. J. Haemat.*, **56**, 589—593.
144. Plow E.F., Loftus J.C., Levin E.G., Fair D.S., Dixon D., Forsyth J., Ginsberg M.H., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6002—6006.
145. Thiagarajan P., Shapiro S.S., Levine E., DeMarco L., Yalcin A., (1985), *J. Clin. Invest.*, **75**, 896—901.
146. Fitzgerald L.A., Charo I.F., Phillips D.R., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10893—10896.
147. Leeksa O.C., Zandbergen-Spaargaren J., Giltay J.C., Van Mourik J.A., (1986), *Blood*, **67**, 1176—1180.
148. Shadle P.J., Ginsberg M.H., Plow E.F., Barondes S., (1984), *J. Cell. Biol.*, **99**, 2056—2060.
149. Charo I.F., Fitzgerald L.A., Meyer D., Bekeart L.S., Phillips D.R., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 5.
150. Berndt M.C., Phillips D.R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 59—65.
151. Berndt M.C., Phillips D.R., (1981), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **370**, 87—95.
152. McGowan E.B., Ding A., Detwiler T.C., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11243—11248.
153. Berndt M.C., Gregory C., Chong B.H., Zola H., Castaldi P., (1983), *Blood*, **62**, 800—807.
154. Berndt M.C., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 256.
155. Colman R.W., (1986), *Semin. Hematol.*, **23**, 119—128.
156. Nachman R.L., Ferris B., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 704—710.
157. Timmons S., Kłoczewiak M., Hawiger J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4935—4939.
158. Born G.V., (1962), *Nature*, **194**, 927—929.
159. Macforeane D.E., Mills D.C.B., Strivastova C., (1982), *Biochemistry*, **21**, 544—549.
160. Adler J.R., Handin R.J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3866—3872.
161. Bennett J.S., Vilaire G., Colman R.F., Colman R.W., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1185—1190.
162. Figures W.R., Niewiarowski S., Morinelli T.A., Colman R.F., Colman R.W., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7789—7785.
163. Knupp Ch.L., White II G.C., (1985), *Blood*, **65**, 578—583.

- 143. Vined O, Tardif A, Gagnon L, Veitch R, A. ...
- 144. Bostrom G, ...
- 145. ...
- 146. ...
- 147. ...
- 148. ...
- 149. ...
- 150. ...
- 151. ...
- 152. ...
- 153. ...
- 154. ...
- 155. ...
- 156. ...
- 157. ...
- 158. ...
- 159. ...
- 160. ...
- 161. ...
- 162. ...

JEREMIASZ J. TOMASZEWSKI *, HELENA DONICA **

Struktura i funkcja proteoglikanów

Proteoglycans: Structure and Function

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Proteoglikany chondroityno-siarczanowe
 - II-1. Agregujące proteoglikany chondroityno-siarczanowe
 - II-2. Nieagregujące proteoglikany chondroityno-siarczanowe
- III. Proteoglikany dermatano-siarczanowe
 - III-1. Bogato-iduronowe proteoglikany dermatano-siarczanowe
 - III-2. Ubogo-iduronowe proteoglikany dermatano-siarczanowe
- IV. Proteoglikany keratano-siarczanowe
- V. Proteoglikany heparano-siarczanowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Chondroitin-sulfate proteoglycans
 - II-1. Aggregating chondroitin-sulfate proteoglycans
 - II-2. Nonaggregating chondroitin-sulfate proteoglycans
- III. Dermatan-sulfate proteoglycans
 - III-1. High iduronic dermatan-sulfate proteoglycans
 - III-2. Low iduronic dermatan-sulfate proteoglycans
- IV. Keratan-sulfate proteoglycans
- V. Heparan-sulfate proteoglycans

Wykaz stosowanych skrótów: CS—chondroityno-siarczany, DS—siarczan dermatanu, Fuc—fukoza, GAG—glikoaminoglikany, Gal—galaktoza, GaINAc—N-acetylo-galaktozamina, GlcN—glukozaamina, GlcNAc—N-acetyloglukozoamina, GlcUA—kwas glukuronowy, HA—kwas hialuronowy, HS—siarczan heparanu, IdUA—kwas iduronowy, KS—siarczan keratanu, Man—mannoza, NeuAC—kwas neuraminowy, PG—proteoglikany, Xyl—ksyloza.

I. Wstęp

Termin proteoglikany (PG) pojawił się w piśmiennictwie biochemicznym u progu lat siedemdziesiątych dla określenia połączeń glikoaminoglikano-białkowych, opisanych między innymi przez Hascalla i Sajdera [1] oraz Muir

* Prof. dr hab., ** Dr, Zakład Biochemii Klinicznej i Toksykologii Środowiska Akademii Medycznej, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin.

i wsp. [2]. Pierwszych informacji o ich skomplikowanej strukturze przestrzennej dostarczyły elektronomikroskopowe badania Rosenberga i wsp. [3]. Obecnie wiadomo, że PG obejmują grupę wysoce zróżnicowanych związków wysoko-cząsteczkowych, zbudowanych z centralnie położonego łańcucha polipeptydowego nazywanego rdzeniem białkowym, do którego wiązaniem O- lub N-glikozydowym przyłączony jest jeden lub wiele łańcuchów glikozoaminoglikanowych (GAG), a także w niektórych przypadkach przyłączone są i inne oligosacharydy. Jak wynika z licznych badań, w budowie PG uczestniczą monomery białkowe o m.c.z. od 20.000 do 400.000, a wielkość poszczególnych łańcuchów polisacharydowych waha się od kilku tysięcy do około 100.000 [4]. Różnorodność strukturalną PG zwiększają zmiany w składzie i sekwencji aminokwasowej centralnego łańcucha polipeptydowego oraz różnice w budowie bocznych łańcuchów GAG i podstawników oligosacharydowych.

Obecność PG wykazano niemal we wszystkich tkankach, szczególnie wiele uwagi poświęcając tkance łącznej. Ich synteza opisana w licznych opracowaniach naukowych [5, 6, 7], rozpoczyna się od rdzenia białkowego, w którym następnie dochodzi do glikozylowania określonych grup hydroksylowych lub aminowych seryny i asparaginy, formowania odpowiednich łańcuchów poli i oligosacharydowych oraz dalszych zmian posttranslacyjnych. PG błon komórkowych i PG wydzielane do przestrzeni pozakomórkowej warunkują szereg metabolicznych i mechanicznych właściwości komórek i tkanek. Prawdopodobnie zależy od nich proliferacja, różnicowanie i dojrzewanie komórek. Silnie anionowy ładunek łańcuchów GAG sprawia, że PG biorą udział w selektywnej przepuszczalności błon granicznych, w regulacji stopnia uwodnienia tkanki, a przez interakcję z białkami włóknkowymi zabezpieczają strukturę i własności mechaniczne substancji międzykomórkowej tkanki łącznej. Szereg badań wskazuje również na udział PG w wielu procesach metabolicznych, takich jak kalcyfikacja kości oraz krzepnięcie krwi.

Niejednorodność strukturalna oraz liczne funkcje biologiczne przypisywane PG stwarzają duże trudności w ich systematyce i klasyfikacji. Z kilku możliwych kryteriów klasyfikacji, niewątpliwie najbardziej jednoznaczne byłyby oparte na genetycznie uwarunkowanych różnicach i homologiach w sekwencjach aminokwasowych rdzenia białkowego lub jego form prekursorowych. Trudności metodyczne w izolowaniu natywnych PG sprawiają jednak, że dotychczas opisano kompletną sekwencję aminokwasową tylko łańcucha polipeptydowego jednego typu PG [8]. W przedstawionym opracowaniu przyjęto klasyfikację opartą na rodzaju składnika GAG dominującego w strukturze PG. Zasadnicze elementy struktury GAG uczestniczących w budowie PG przedstawiono w tabeli 1, pamiętając, iż w rzeczywistości budowa natywnych proteoglikanów jest bardziej skomplikowana.

Rodzaj GAG	Powtarzające się sekwencje trórcucha polisacharydowego	Region wiązania GAG z rdzeniem białkowym PG
CS	$\begin{array}{c} \beta 1,4 \text{ GicUA} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GalINac} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GicUA} \xrightarrow{\beta 1,3} \\ \\ \text{4(6) - SO}_3^- \end{array}$	$\beta 1,4 \text{ GicUA} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{Xyl} \xrightarrow{\beta 1,0} \text{Ser}$
DS	$\begin{array}{c} \beta 1,4 \text{ IdUA} \xrightarrow{\alpha 1,3} \text{GalINac} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GicUA} \xrightarrow{\beta 1,3} \\ \\ \text{(2 - SO}_3^-) \quad \text{4(6) - SO}_3^- \end{array}$	$\alpha 1,3 \text{ GalINac} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GicUA} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{Xyl} \xrightarrow{\beta 1,0} \text{Ser}$
KS	$\begin{array}{c} \beta 1,4 \text{ GicNac} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GicNac} \xrightarrow{\beta 1,3} \\ \\ \text{6 - SO}_3^- \end{array}$	$\begin{array}{c} \beta 1,3 \text{ Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GicNac} \xrightarrow{\beta 1,6} \text{GalINac} \xrightarrow{\alpha 1,0} \text{Ser} \\ \\ \text{NeuAc} \xrightarrow{\alpha 2,3} \text{Gal} \\ \beta 1,3 \text{ Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GicNac} \xrightarrow{\beta 1,2} \text{Man} \xrightarrow{\alpha 7,6} \text{Man} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GlcNac} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GlcNac} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{Asn} \\ \\ \text{1,3 Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GlcNac} \xrightarrow{1,2} \text{Man} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{Man} \\ \\ \beta 1,4 \text{ GicNac} \xrightarrow{\alpha 1,4} \text{GicUA} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{Xyl} \xrightarrow{\beta 1,0} \text{Ser} \end{array}$
HS	$\begin{array}{c} \beta 1,4 \text{ IdUA} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GlcN} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GicUA} \xrightarrow{\beta 1,4} \\ \\ \text{6 - SO}_3^- \\ \\ \text{SO}_3^- (\text{Ac}) \end{array}$	$\beta 1,4 \text{ GicNac} \xrightarrow{\alpha 1,4} \text{GicUA} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{Xyl} \xrightarrow{\beta 1,0} \text{Ser}$

II. Proteoglikany chondroityno-siarczanowe

Najwięcej informacji na temat proteoglikanów chondroityno-siarczanowych (PG-CS) dostarczyły badania preparatów izolowanych z chrząstki [9, 10]. Okazało się, że występują również w innych tkankach, między innymi w kościach [11], ścięgnach [12], ścianie naczyniowej [13, 14], mięśniach szkieletowych [15], mózgu [16] i skórze [17]. Stanowią niezwykle heterogenną grupę związków, różniących się masą cząsteczkową oraz rodzajem i zawartością składnika węglowodanowego. Wyróżnikiem umożliwiającym podział na dwie podgrupy jest zdolność do tworzenia kompleksów z kwasem hialuronowym (HA). W tabeli 2 przedstawiono orientacyjną charakterystykę PG-CS agregujących i nieagregujących z kwasem hialuronowym.

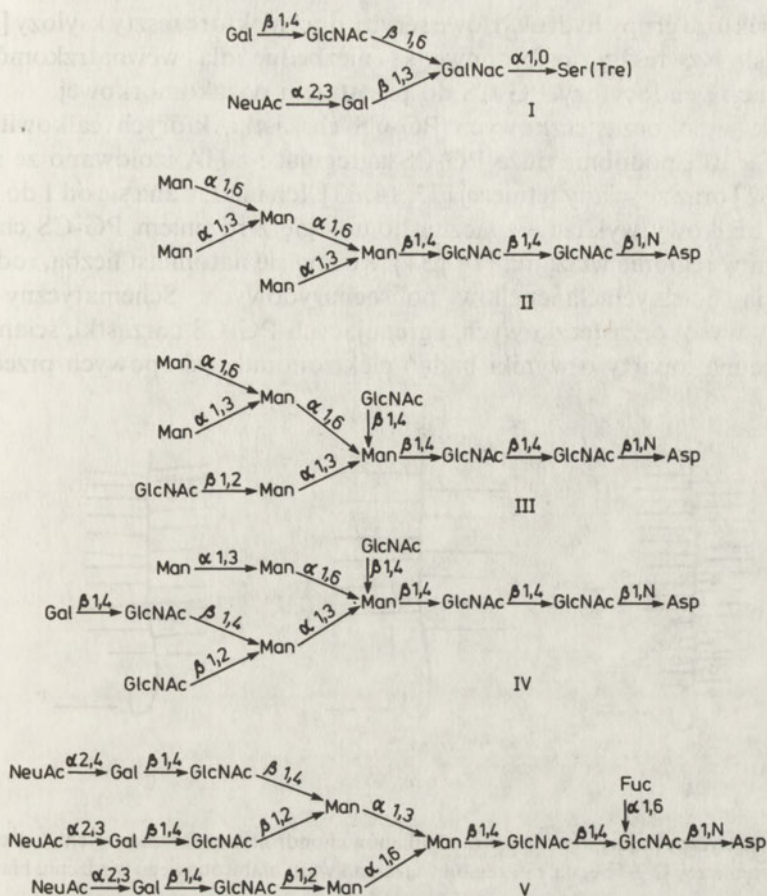
Tabela 2

Niektóre właściwości proteoglikanów chondroityno-siarczanowych

Tkanka	Względna masa cząsteczkowa			Liczba łańcuchów GAG	Piśmienictwo
	PG	Rdzeń białkowy	GAG		
Agregujące z kwasem hialuronowym					
Chrząstka	$\sim 2,5 \times 10^6$	~ 200.000	~ 20.000	~ 100	10, 20
Ściana naczyniowa	$\sim 1-2 \times 10^6$	~ 200.000	~ 43.000	~ 12	11, 36
Ścięgna	$\sim 1-2 \times 10^6$	~ 200.000	~ 17.000	~ 50	14, 29
Nieagregujące z kwasem hialuronowym					
Mięśnie szkieletowe	$2,5 \times 10^6$?	~ 70.000	?	15
Skóra	$\sim 1,0 \times 10^6$	~ 50.000	~ 20.000	~ 50	17, 50
Przynasadowy odcinek kości	$\sim 1,0 \times 10^6$	~ 200.000	~ 40.000	~ 20	51
Chrząstka	$75-120 \times 10^3$	~ 42.000	~ 35.000	2-3	4
Kości	$\sim 70 \times 10^3$	~ 35.000	~ 35.000	1-2	12, 28

II-1. Agregujące proteoglikany chondroityno-siarczanowe

Cechą wspólną PG agregujących z kwasem hialuronowym jest obecność w części N-końcowej centralnego łańcucha polipeptydowego regionu wykazującego powinowactwo do HA i białek wiążących [18]. W PG-CS izolowanych z chrząstki, których rdzeń białkowy ma masę cząsteczkową około 200.000 i długość rzędu 400 nm, na region wiązania HA przypada 25—30% łańcucha polipeptydowego [19]. Około 10% długości łańcucha stanowi region wiązania kilkudziesięciu reszt keratano-siarczanowych, podczas gdy pozostały odcinek C-końcowy jest miejscem wiązania właściwych łańcuchów chondroityno-4- i -6-siarczanowych [20]. Liczba tych łańcuchów może sięgać 100, a ponadto w cząsteczce PG występuje 50—60 reszt oligosacharydowych, występujących



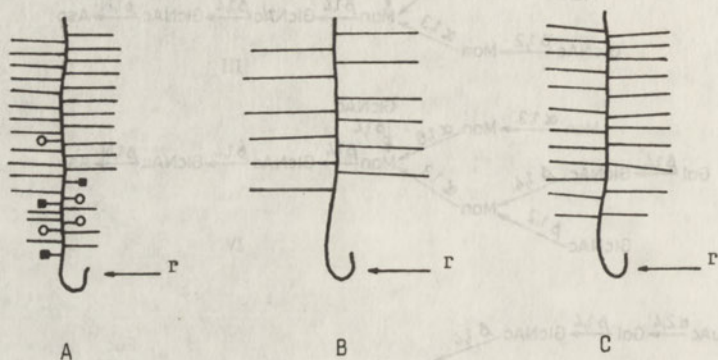
Ryc. 1 Struktura niektórych oligosacharydów uczestniczących w budowie PG. I — pentasacharyd połączony z peptydem wiązaniem O-glikozydowym utworzonym między grupą N-acetylogalaktozozaminy a grupą hydroksylową seryny lub treoniny; oligosacharydy: II — bogatomannozowy, III i IV — hybrydowe, V — pentadecasacharyd złożony — połączone z łańcuchem polipeptydowym wiązaniem N-glikozydowym utworzonym między grupą N-acetylglukozyaminy i grupą aminową asparaginy.

głównie w regionie wiązania HA [21, 22]. Przykładową strukturę oligosacharydów uczestniczących w budowie PG-CS przedstawia rycina 1.

Wielkość agregujących monomerów PG-CS chrząstki, rodzaj i liczba bocznych łańcuchów poli- i oligosacharydowych, wykazuje pewne zróżnicowanie gatunkowe, anatomiczne, a także zależne od stopnia dojrzałości tkanki [23, 24, 25, 26]. W chrząstce embrionalnej obserwuje się wysoką zawartość oligosacharydów uważanych przez niektórych za formę prekursorową siarczanu keratanu [27]. W miarę starzenia rośnie zawartość siarczanu keratanu, skróceniu ulegają łańcuchy CS, w których puli zwiększa się udział chondroityno-6-siarczanów [28]. Zmienna jest również liczba reszt fosforanowych estryfikacji

jących niektóre grupy hydroksylowe seryny oraz niektóre reszty ksylozy [29, 30]. Uważa się, że reszty fosforanowe są niezbędne dla wewnątrzkomórkowej translokacji i endocytozy PG-CS do przestrzeni pozakomórkowej.

Obok wysokocząsteczkowych PG-CS chrząstki, których całkowita m.c.z. sięga 2.5×10^6 , podobnie duże PG-CS agregujące z HA izolowano ze ścięgien [12, 31, 32] oraz ze ściany tętniczej [13, 14, 33]. Ich m.c.z. waha się od 1 do 2×10^6 , a rdzeń białkowy wykazuje znaczną homologię z rdzeniem PG-CS chrząstki, zwłaszcza w regionie wiązania HA [34]. Różnią się natomiast liczbą, rodzajem i wielkością bocznych łańcuchów polisacharydowych. Schematyczny model struktury wysokocząsteczkowych, agregujących PG-CS chrząstki, ściany tętniczej i ścięgna, oparty o wyniki badań elektronomikroskopowych przedstawia rycina 2.



Ryc. 2 Schematyczny model struktury proteoglikanów chondroityno-siarczanowych: A — chrząstki, B — ściany tętniczej, C — ścięgna; r — region wiązania kwasu hialuronowego w rdzeniu białkowym.

W warstwie środkowej i wewnętrznej ściany aorty PG-CS stanowią około 20% całkowitej puli PG i występują prawdopodobnie w kilku postaciach różniących się liczbą i długością łańcuchów CS [35]. Z aorty wołu izolowano agregujące PG-CS, których monomery o m.c.z. około 1×10^6 mają zawierać 19—25 łańcuchów CS o m.c.z. około 40.000 [36]. Nieco inne monomery agregujących PG-CS otrzymano ze ściany aorty świni [37] i ludzi [13, 38]. Nieliczne dane na temat agregujących PG-CS ścięgna pozwalają przypuszczać, że stanowią one tylko część PG tej tkanki i charakteryzują się podobnie wysokim ciężarem cząsteczkowym [12, 31]. W tkance nerwowej znaleziono PG-CS agregujące z HA o m.c.z. zaledwie około 150.000, w których do rdzenia białkowego o m.c.z. około 70.000 przyłączone są 1—2 polisacharydowe łańcuchy CS.

Agregujące PG-CS *in vivo* tworzą z HA makrocząstki zawierające od kilku, nawet do 100 monomerycznych podjednostek PG-CS, o łącznej m.c.z. dochodzącej do setek milionów [3, 4, 39]. W niekowalencyjnym wiązaniu udział bierze globularny fragment N-końcowego odcinka łańcucha polipeptydowego oraz 2—5 dwucukrowcowych podjednostek łańcucha polisacharydowego HA [40].

Odległość pomiędzy przyłączonymi monomerami determinuje wzajemne oddziaływanie sąsiadujących łańcuchów CS, a wiązanie stabilizują białka wiążące [41, 42]. Są to glikoproteiny o m.cz. 41—48.000 i powinowactwie zarówno do regionu wiązania w rdzeniu białkowym PG, jak i polisacharydowego łańcucha HA. Szczególnie duże agregaty PG-CS z HA obecne są w chrząstce stawowej.

Struktura agregatów PG-CS, powodująca przestrzenne zagęszczenie ujemnych ładunków polianionów GAG, zabezpiecza szczególne właściwości makrocząstek. Są one w stanie wiązać wewnątrzcząsteczkowo ilości wody kilkudziesięciokrotnie przekraczające suchą masę. W chrząstce, której struktura usztywniona jest siatką włókien kolagenowych, powstające ciśnienie hydratacyjne zabezpiecza znaczną wytrzymałość na ściskanie oraz zdolność przejmowania zmiennych obciążeń w czasie ruchu stawów [43, 44]. Duże zagęszczenie PG-CS w warstwach chrząstki podlegających kalcyfikacji pozwala przypuszczać, że biorą one pośredni lub bezpośredni udział w inicjacji tego procesu i depozycji fosforanów wapnia w substancji podstawowej kości [45].

Proteoglikanowe agregaty ściany naczyniowej lub ścięgien, zawierające jak się wydaje mniej podjednostek monomerycznych, spełniają nieco odmienne funkcje biologiczne. Wykazując powinowactwo do włókien kolagenu i elastyny, a także do błon plazmatycznych komórek mięśni gładkich, integrują strukturę substancji międzykomórkowej, zabezpieczając w ten sposób wytrzymałość na zmienne obciążenie hydrodynamiczne, lub umożliwiając przenoszenie znacznych sił fizycznych [46]. Podobną rolę strukturalną, integrującą takie elementy tkanki nerwowej jak włókna nerwowe, neurony i astrocyty, wydają się spełniać agregaty niskocząsteczkowych PG-CS mózgu. Wiele prac poświęconych interakcji PG-CS ze związkami o mniejszej masie cząsteczkowej pozwala przypuszczać, że biorą one również udział w procesach metabolicznych, uczestnicząc w selektywnym transporcie substratów i produktów przemian komórkowych, lub w procesach powierzchniowych, takich jak np. krzepnięcie krwi [47, 48, 49].

II-2. Nieagregujące proteoglikany chondroityno-siarczanowe

Wysokocząsteczkowe PG-CS o m.cz. rzędu 1×10^6 , nie wykazujące jednak powinowactwa do HA, izolowano ze skóry [50], międzybełczkowej tkanki mezenchymalnej przynasadowych odcinków kości [51], a o m.cz. powyżej 2.5×10^6 z mięśni szkieletowych [52]. Ich centralny łańcuch polipeptydowy, różniący się m.cz., charakteryzuje się wspólnym dla wszystkich PG-CS niekompleksujących, brakiem cysteiny i metioniny. Uważa się, że obecność tych aminokwasów w sekwencji regionu wiązania determinuje pofałdowanie łańcucha niezbędne dla wiązania HA [53]. Proteoglikany izolowane ze skóry, zawierają liczne (około 50) łańcuchy GS, o m.cz. rzędu 20.000, w których prawdopodobnie występują dwusacharydowe sekwencje charakterystyczne dla siarczanu dermatanu. Proteoglikany przynasadowej tkanki kostnej mają większy rdzeń białkowy i około 20 łańcuchów CS o m.cz. około 40.000. Izolowane z mięśni kurczęcia PG-CS nieagregujące z HA, charakteryzują się

wysoką m.cz. i obecnością długich łańcuchów CS, o m.cz. około 70.000, których 80—90% stanowią chondroityno-6 siarczany.

Niskocząsteczkowe PG-CS nieagregujące z HA otrzymano z chrząstki i z kości. Z kości płodowych cieląt i szczurów izolowano monomery PG-CS o m.cz. 80—120.000, zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o m.cz. około 38.000 i 1—2 różnych łańcuchów CS o przeciętnej m.cz. około 40.000 [54, 55]. Wykazano również obecność oligosacharydów związanych wiązaniem O- lub N-glikozydowym z rdzeniem białkowym PG, którego własności immunologiczne okazały się odmienne od niskocząsteczkowych, nieagregujących PG-CS chrząstki. Z kości osobników dojrzałych izolowano PG-CS o m.cz. około 90.000, zawierające łańcuchy CS o m.cz. rzędu 25—35.000 [11]. W PG-CS kości dominują chondroityno-4-siarczany stanowiące około 90% polisacharydowego składnika PG. Analogiczne niskocząsteczkowe PG-CS chrząstki mają podobną m.cz. [76—120.000], a do rdzenia białkowego o m.cz. około 42.000 przyłączone są 2—3 łańcuchy CS z przewagą chondroityno-4 siarczanów [56]. Centralny łańcuch polipeptydowy niskocząsteczkowych PG-CS wykazuje pewne homologie z łańcuchem polipeptydowym PG rogówki i twardówki oraz z rdzeniem białkowym niskocząsteczkowych PG-DS tkanki kostnej i chrząstki [4, 57].

Biologiczna funkcja nieagregujących PG-CS nie jest w pełni wyjaśniona. Mogą mieć one pewne znaczenie strukturalne, warunkowane powinowactwem do białek włókiennych [58]. Niektóre doniesienia wskazują na ich rolę w różnicowaniu i rozwoju komórek mięśni poprzecznie prążkowanych, w starzeniu się tkanki oraz w regulacji procesów kalcyfikacji, oparte głównie na obserwacji różnic ilościowych i jakościowych w tkankach płodowych i dojrzałych [4, 20].

III. Proteoglikany dermatano-siarczanowe

Proteoglikany w których reszty serynowe centralnego łańcucha polipeptyduowego podstawione są polisacharydowymi łańcuchami siarczanu dermatanu (DS), występują w przestrzeni pozakomórkowej wielu tkanek, między innymi w ścianie naczyniowej [59, 60], skórze [61, 62, 63, 64], ścięgnach [12, 65], twardówce i rogówce [66, 67] oraz w chrząstce [68]. Obecność PG-DS wykazano również w łożysku [69, 70], płynie pęcherzyków jajnikowych [71] oraz w niektórych tkankach patologicznych [72, 73]. Podobnie jak PG-CS stanowią one niejednorodną grupę związków, różniących się m.cz., liczbą i długością łańcuchów polisacharydowych oraz budową rdzenia białkowego. Cechą szczególną jest zmienna zawartość reszt kwasu iduronowego i obecność kwasu glukuronowego w podjednostkach łańcuchów polisacharydowych. W tabeli 3 przedstawiono charakterystykę lepiej poznanych PG-DS, wprowadzając umowny podział na bogato i ubogo-iduronowe.

Tabela 3

Niektóre właściwości proteoglikanów dermatano-siarczanowych

Tkanka	Masa cząsteczkowa			Liczba łańcuchów	Zawartość IA* (%)	Piśmiennictwo
	PG	Rdzeń białkowy	GAG			
Bogato-iduronowe						
Skóra	~ 130 × 10 ³	~ 56.000	~ 17.000	2-3	50-85	61, 62, 64
Aorta	~ 190 × 10 ³	~ 50.000	~ 39.000	1-2	?	81
Ścięgna	70-100 × 10 ³	~ 40.000	~ 20.000	1-2	35-75	13, 65
Chrząstka	80-140 × 10 ³	~ 46.000	?	?	~ 48	68
Ubogo-iduronowe						
Płyn pęcherzyków jajnikowych	~ 2,3 × 10 ⁶	~ 500.000	~ 56.000	~ 20	~ 9	71
Komórki glejowe	~ 2,5 × 10 ⁶	~ 200.000	~ 40.000	~ 50	~ 8	72
Fibroblasty	~ 1,0 × 10 ⁶	~ 400.000	?	?	~ 25	4, 62
Chrząstka embrionalna	~ 500 × 10 ³	~ 43.000	~ 52.000	~ 8	~ 7	85
Twardówka	160-410 × 10 ³	~ 100.000	?	?	~ 20	80
Rogówka	100-150 × 10 ³	~ 40.000	~ 55.000	1	~ 10	91

*) — kwas iduronowy

III-1. Bogato-iduronowe proteoglikany dermatano-siarczanowe

Proteoglikany, w których reszty kwasu iduronowego stanowią 35—85% reszt kwasów uronowych łańcuchów polisacharydowych, występują w większych ilościach w substancji międzykomórkowej tkanki łącznej skóry, ściany tętniczej, ścięgien, chrząstki i twardówki. Ich m.c.z. waha się od 70.000 do 140.000, a m.c.z. łańcuchów polisacharydowych od 15.000 do 24.000. Do centralnego łańcucha polipeptydowego PG-DS przyłączonych jest 1—2 łańcuchy GAG oraz niekiedy 2—3 reszty oligosacharydowe związane wiązaniem O- lub N-glikozydowym [74].

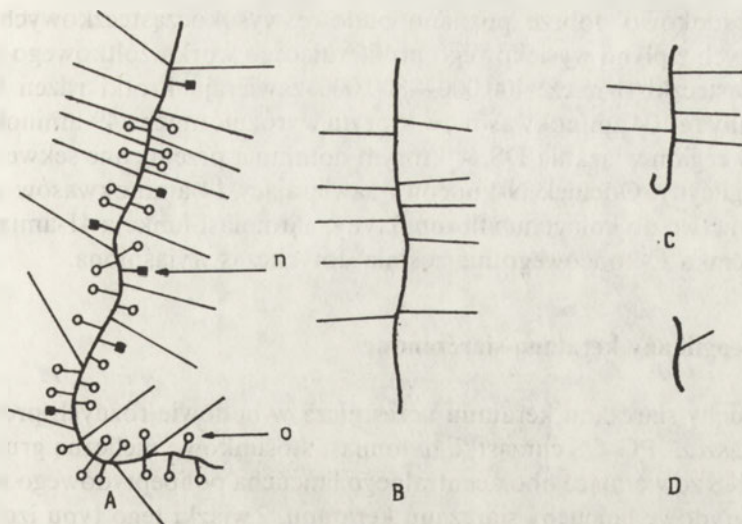
Badania składu aminokwasowego oraz własności immunologicznych składnika białkowego PG-DS wykazały, że mają one zbliżoną budowę łańcuchów polipeptydowych, z kwasem asparaginowym w pozycji N-końcowej i glikozylowaną seryną w pozycji 4 [75]. Centralny łańcuch polipeptydowy PG-DS tej grupy wykazuje znaczną homologię z rdzeniem białkowym PG-CS o niskiej m.c.z. oraz znaczne różnice w składzie aminokwasowym w porównaniu z łańcuchem polipeptydowym wysokocząsteczkowych PG-CS.

Informacji na temat ewentualnych funkcji biologicznych PG-DS dostarczają prowadzone ostatnio badania histochemiczne i immunohistochemiczne [76, 77]. Wykazano, że *in vivo* bogato-idurowane PG-DS wiążą kolagen typu I i II, regulując być może fibrylogenezę i zabezpieczając, podobnie do agregujących PG-CS, prawidłową strukturę i biochemiczne właściwości tkanki [78]. W chrząstce bogato-iduronowe PG-DS zlokalizowane w warstwach powierzchniowych orientują włókna kolagenowe równoległe do powierzchni i być może poprzez swój ładunek ujemny hamują procesy kalcyfikacji [79]. Zdolność do samoasocjacji i tworzenia kompleksów dermatano-siarczanowych [80] pozwala przypuszczać, że w skórze, ścięgnach i ścianie tętniczej integrują one struktury włókienkowe i stabilizują siatkę przestrzenną. Duże powinowactwo PG-DS do lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) pozwala przypuszczać, że od zawartości tej frakcji zależy penetracja LDL do ściany tętniczej i związana z tym inicjacja procesu miażdżycowego [81].

III-2. Ubogo-iduronowe proteoglikany dermatano-siarczanowe

Proteoglikany zawierające w swojej strukturze GAG dermatano-siarczanowe, jednak z mniejszą zawartością kwasu iduronowego, występują również w wielu tkankach i reprezentują jeszcze bardziej zróżnicowane formy molekularne.

Na rycinie 3 schematycznie przedstawiono proponowaną strukturę PG-DS ubogo-iduronowych, płynu pęcherzyków jajnikowych, fibroblastów, twardówki, rogówki i chrząstki. Niektóre z tych PG-DS zawierają w centralnym łańcuchu polipeptydowym odcinki wykazujące powinowactwo do HA i odpowiadające w przybliżeniu regionowi wiązania HA łańcucha polipeptydowego agregujących PG-CS [82]. Niskocząsteczkowe PG-DS rogówki zawierają oprócz rdzenia



Ryc. 3 Schematyczny model struktury proteoglikanów dermatano-siarczanowych ubogoidurowych: A — płynu pęcherzyków jajnikowych, B — fibroblastów, C — twardówki, D — rogówki; n — oligosacharydy związane wiązaniem N-glikozydowym, o — oligosacharydy związane wiązaniem O-glikozydowym.

białkowego tylko jeden łańcuch polisacharydowy stanowiący około 50% m.c. monomeru. PG-DS rogówki wspólnie z PG-KS uczestniczą w tworzeniu uporządkowanej struktury włókien kolagenowych, która umożliwia przepuszczalność światła [4]. W zmętnieniowym zbliźnowaceniu rogówki stwierdza się powiększenie przestrzeni międzyfibrylarnych, spadek zawartości PG-KS oraz zmiany strukturalne PG-DS, ustępujące po wyleczeniu [83, 84]. Szczególny rodzaj PG-DS izolowano z chrząstki. Obok małych PG-DS bogatoiduronowych i PG-DS ubogoiduronowych charakterystycznych dla chrząstki embrionalnej [85, 86], opisano PG-DS, w których rolę rdzenia białkowego pełnią łańcuchy alfa-kolagenu, do których przyłączone są 1 lub 2 ubogoiduronowe łańcuchy DS [87].

Wysokocząsteczkowe PG-DS bogate w reszty kwasu glukuronowego, syntetyzowane w proliferujących komórkach glejowych, agregują z HA i podobnie jak agregujące PG-CS wykazują *in vitro* powinowactwo do białek wiążących [72]. W płynie pęcherzykowym występują wysokocząsteczkowe PG-DS o m.c. rzędu $2-3 \times 10^6$, w których długie i liczne łańcuchy polisacharydowe wiążą rdzeń białkowy o m.c. około 500.000 [71]. Częsteczka zawiera 300—400 reszt oligosacharydowych związanych O-glikozydowo oraz około 50 reszt połączonych wiązaniem N-glikozydowym. Rozmiary cząsteczki i wysoki stopień hydratacji pozwalają przypuszczać, iż odgrywa ona istotną rolę w utrzymywaniu odpowiedniej lepkości płynu. Łańcuch polipeptydowy PG-DS płynu pęcherzyków jajnikowych wykazuje wyjątkową wrażliwość na enzymy proteolityczne, zwłaszcza plazminę, co mieć może znaczenie w procesie dojrzewania i ewolucji

[88]. Stosunkowo dobrze poznano budowę wysokocząsteczkowych PG-DS izolowanych z płynu wysiękowego proliferującego worka żółtkowego szczurów [73]. Częsteczki o m.cz. 400.000—800.000 zawierają krótki rdzeń białkowy zbudowany ze 104 aminokwasów, w którym wyróżnić można 49-aminokwasowy centralny region wiązania DS, w którym dominują przemienne sekwencje reszt seryny i glicyny. Odcinek N-końcowy zawierający 14 aminokwasów wykazuje powinowactwo do kolagenu i fibronektyny, natomiast funkcja 41-aminokwasowego odcinka C-końcowego nie została dotychczas wyjaśniona.

IV. Proteoglikany keratano-siarczanowe

Łańcuchy siarczanu keratanu uczestniczą w budowie różnych proteoglikanów, zwłaszcza PG-CS chrząstki, natomiast stosunkowo nieliczną grupę stanowią PG-KS zawierające obok centralnego łańcucha polipeptydowego wyłącznie polisacharydowe łańcuchy siarczanu keratanu. Związki tego typu izolowane z rogówki mają m.cz. w granicach 30.000—75.000, a do rdzenia białkowego przyłączonych jest 1—3 łańcuchy KS o m.cz. 7.000—10.000 [84, 89, 90, 91]. W odróżnieniu od PG innego typu w PG-KS łańcuchy polisacharydowe połączone są z białkiem wiązaniem N-glikozydowym. W cząsteczce PG-KS mogą występować także podobnie związane oligosacharydy.

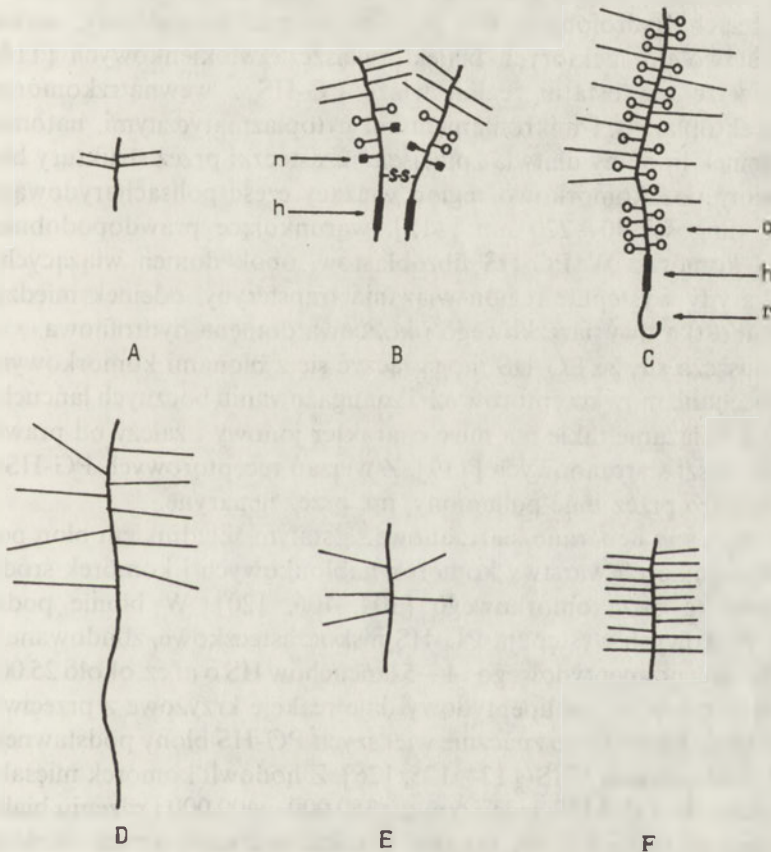
Proteoglikany keratano-siarczanowe wspólnie z niskocząsteczkowymi PG-DS uczestniczą w budowie substancji podstawowej rogówki, zabezpieczając wyjątkowe własności optyczne tej tkanki. Na ich szczególne znaczenie wskazuje fakt, że defekt syntezy PG-KS, a zwłaszcza upośledzona sulfatacja odpowiednich reszt heksozaminowych, może być przyczyną wrodzonych lub nabytych zmian patologicznych [92, 93, 94]. Poza rogówką, znaczne ilości PG-KS znaleziono w dysku międzykręgowym [95, 96]. Strukturalnie są one podobne do agregujących PG-CS chrząstki, jednak mają znacznie skrócony region wiązania CS, lub znacznie zmniejszoną liczbę łańcuchów chondroityno-siarczanowych w cząsteczce PG-KS [97].

V. Proteoglikany heparano-siarczanowe

Szczególne role proteoglikanów heparano-siarczanowych (PG-HS) wynika z faktu, iż stanowią one składnik błon komórkowych lub związane są ze strukturami błonowymi. Taka lokalizacja sprawia, że biorą one udział w procesach zachodzących w warstwach powierzchniowych oraz w interakcjach pomiędzy komórką, a otaczającym ją środowiskiem. Proteoglikany powierzchniowe błon komórkowych izolowano między innymi z hepatocytów [98, 99], z fibroblastów [100, 101] i komórek tkanki nerwowej [102]. Ich obecność wykazano w błonach podstawnych kłębków nerkowych [103, 104, 105, 106], ściany tętniczej [107, 108, 109], a także w hodowlach komórkowych pheochromocytooma [110], mięsaka Engelbretha-Holma-Swarma [111, 112] i raka

Niekóre właściwości proteoglikanów heparano-siarczanowych

Tkanka	Masa cząsteczkowa			Liczba łańcuchów	Piśmiennictwo
	PG	Rdzeń białkowy	GAG		
Powierzchniowe					
Hepatocyty	$\sim 73.5 \times 10^3$	~ 17.000	~ 14.000	3-4	98, 99
Fibroblasty	$\sim 350 \times 10^3$	2×90.000	~ 20.000	8-12	100, 101
Pęcherzyki synaptyczne	$100-200 \times 10^3$	~ 105.000	?	?	102, 110
Komórki raka okrężnicy	$850-950 \times 10^3$	~ 240.000	~ 30.000	30-40	115, 121
Błon podstawnych					
Kłębki nerkowe	$130-250 \times 10^3$	$90-170.000$	~ 25.000	4-5	103, 104
Mięsak EHS	$750-800 \times 10^3$	$350-400.000$	~ 65.000	6-12	107, 111
Pheochromocytoma	$\sim 350 \times 10^3$	~ 80.000	~ 15.000	18	107, 110



Ryc. 4 Schemat struktury proteoglikanów heparano-siarczanowych powierzchniowych: A — hepatocytów, B — fibroblastów, C — komórek raka okrężnicy oraz błon podstawnych; D — mięsaka EHS, E — kłębków nerkowych, F — Pheochromocytoma; h — hydrofobowy region łańcucha polipeptydowego, n — oligosacharydy związane wiązaniem N-glikozydowym, o — oligosacharydy związane O-glikozydowo, r — region wiązania białek włóknienkowych.

okrężnicy [113]. Dostępne informacje dotyczące m.cz. PG-HS, wielkości rdzenia białkowego oraz liczby i wielkości łańcuchów polisacharydowych zebrano w tabeli 4 natomiast proponowaną strukturę tych PG przedstawia rycina 4.

Najmniejsze PG-HS izolowane z hepatocytów szczurzych mają 3—4 łańcuchy polisacharydowe o m.cz. około 14.000 połączone z pojedynczym łańcuchem polipeptydowym [99]. Proteoglikany fibroblastów mają rdzeń białkowy zbudowany z dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkiem dwusiarczkowym, do którego przyłączonych jest 8—12 łańcuchów HS oraz liczne oligosacharydy [100, 101]. Wysokocząsteczkowe PG-HS izolowano z hodowli komórek raka okrężnicy, mięsaka EHS i komórek warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego szczurów [107, 114, 115]. Badania łańcucha polipeptydowego tych PG prowadzone przy użyciu metod immunologicznych pozwoliły wyodrębnić domeny o właściwościach hydrofilowych i sekwencjach z dużą liczbą reszt seryny i glicyny, wiążące łańcuchy polisacharydowe i oligosacharydy, krótki odcinek o właściwościach hydrofobowych i lipofilnych oraz N-końcowy, wykazujący powinowactwo do niektórych białek, zwłaszcza włókiennokowych [114, 116]. Uważa się, że ten ostatni region wiąże PG-HS z wewnątrzkomórkowymi białkami ektoplazmy i mikrofilamentami cytoplazmatycznymi, natomiast sąsiedni odcinek lipofilny ułatwia „przejście” cząsteczki przez struktury błonowe. Usytuowany pozakomórkowo region wiążący część polisacharydową tworzy wypustki długości 40—220 nm [113], warunkujące prawdopodobnie wiele własności komórki. W PG-HS fibroblastów, obok domen wiążących poli i oligosacharydy występuje region wiązania transferyny, odcinek międzyłańcuchowego mostka dwusiarczkowego i końcowa domena hydrofilowa.

Przypuszcza się, że PG-HS mogą łączyć się z błonami komórkowymi przy udziale mechanizmów receptorowych i zaangażowaniu bocznych łańcuchów HS [117, 118]. Wiązanie takie ma mieć charakter jonowy i zależy od prawidłowej zawartości reszt siarczanowych [119]. Z wiązań receptorowych PG-HS wypierane są *in vitro* przez inne polianiony, np. przez heparynę.

Proteoglikany heparano-siarczanowe są stałym składnikiem błon podstawnych, oddzielających warstwy komórek nabłonkowych i komórek śródbłonna od środowiska pozakomórkowego [104, 106, 120]. W błonie podstawnej kłębków nerkowych występują PG-HS niskocząsteczkowe, zbudowane z krótkiego łańcucha polipeptydowego i 4—5 łańcuchów HS o m.cz. około 25.000 [121, 122, 123]. Ich łańcuch polipeptydowy daje reakcje krzyżowe z przeciwciałami wobec rdzenia białkowego znacznie większych PG-HS błony podstawnej ściany tętniczej oraz mięsaka EHS [124, 125, 126]. Z hodowli komórek mięsaka EHS wyizolowano dwa PG-HS, jeden o m.cz. 350.000—400.000 i rdzeniu białkowym o m.cz. rzędu 95.000—130.000, drugi wysokocząsteczkowy o m.cz. około 800.000 i czterokrotnie większym centralnym łańcuchem polipeptydowym. Na podstawie wyników badań z użyciem znakowanej metioniny autorzy sądzą, że postać niskocząsteczkowa jest produktem częściowej degradacji PG-HS, zachodzącej również *in vivo*.

Proteoglikany heparano-siarczanowe wykazują szereg właściwości warunkujących zapewne ich funkcje biologiczne. Wykazują silne powinowactwo do kolagenu I i lamininy, a reakcja wiązania zachodzi w fizjologicznych warunkach pH i siły jonowej [111, 127]. Ocenia się, że jedna cząsteczka PG-HS wiązać może 80—200 monomerów kolagenu lub 2—10 cząsteczek lamininy [107, 120]. W błonach podstawnych PG-HS wiążą również kolagen typu III i V, słabo natomiast kolagen IV [128, 129, 130]. Duże zainteresowanie budzi interakcja PG-HS z fibronektyną [131, 132, 133, 134]. Uważa się, że białko to wspólnie z innymi elementami pozakomórkowej substancji podstawowej może być składnikiem makrocząsteczkowego „adheronu”, odpowiedzialnego za adhezję komórek. Powierzchniowe PG-HS błon komórkowych mają być w tym przypadku receptorem odpowiedzialnym za przyleganie [134, 135]. Inną interesującą właściwością PG-HS jest zdolność do samoagregacji, umożliwiającą wiązanie komórek zawierających powierzchniowe PG nie tylko ze strukturami podłoża, lecz również między sobą [136, 137]. W wiązaniach tych, podobnie jak w wiązaniu białek włókienkowych uczestniczą boczne łańcuchy HS. Również rdzeń białkowy może brać udział w interakcji PG-HS z innymi substancjami wysokocząsteczkowymi. Powinowactwo łańcucha polipeptydowego PG-HS do HA obserwowano w preparatach izolowanych z płuca i okrężnicy [115, 138]. W PG-HS błon komórkowych końcowy fragment rdzenia białkowego uczestniczyć ma w wiązaniu z filamentami cytoplazmatycznymi w rodzaju aktyny [111, 116].

Duże zagęszczenie PG-HS na powierzchni błon komórkowych i w błonach podstawnych oraz ich silny ładunek sprawia, że odgrywają one istotną rolę w przepuszczalności i transporcie substancji wysoko i drobnocząsteczkowych [139, 140, 141]. W badaniach przepuszczalności błony podstawnej kłębków nerkowych wykazano, że działanie enzymów degradujących PG-HS powoduje przechodzenie do moczu albuminy i ferrytyny. Silny ładunek powierzchniowy odpowiedzialny jest również za wiązanie niektórych enzymów błonowych, które jak np. lipaza lipoproteinowa lub trombina działać mogą na powierzchni śródbłonna naczyń krwionośnych [108, 109, 142, 143]. Uważa się, że PG-HS błon komórkowych uczestniczące w transporcie substratów i metabolitów są czynnikiem regulującym wzrost i różnicowanie komórek [144, 145, 146]. Proteoglikany heparano-siarczanowe występujące w szczególnie dużych ilościach w tkance nerwowej odpowiedzialne są prawdopodobnie za integrację komórek z otaczającym środowiskiem, a zwłaszcza za wiązanie pęcherzyków synaptycznych z błonami plazmatycznymi tkanek docelowych [147, 148]. Przypuszcza się również, że PG-HS biorą udział w utrzymywaniu integralności błon synaptycznych obciążonych ciągłym procesem sekrecji i endocytozy [149, 150]. Proteoglikany heparano-siarczanowe znaleziono również w strukturach subkomórkowych, między innymi we frakcji jądrowej otrzymanej z hodowli komórek melanoma i hepatocytów [151, 152]. Ponieważ *in vitro* HS hamuje aktywność polimerazy DNA, wysuwane są przypuszczenia, że PG-HS

mogą być czynnikiem regulującym syntezę DNA oraz podział i replikację komórek [153, 154].

Zbliżone własnościami do PG-HS proteoglikany heparynowe izolowano z komórek tucznych [155]. Mają one wysoką masę cząsteczkową rzędu 1×10^6 , a do krótkiego łańcucha polipeptydowego o m.cz. około 20.000 z powtarzającymi się sekwencjami seryny i glicyny, przyłączonych jest 9—12 polisacharydowych łańcuchów heparyny o m.cz. w granicach 50.000—100.000 [156]. Pod wpływem endoglikozydaz, PG komórek tucznych uwalniają heparynę, stając się może naturalny magazyn tej substancji *in vivo* [157].

W podsumowaniu podkreślić należy duże trudności w badaniu PG. Ich szczególne powinowactwo do innych substancji wysokocząsteczkowych i elementów komórkowych oraz wielkość makrocząstek, wymaga stosowania drastycznych metod izolowania, naruszających być może strukturę cząstek natywnych. Stąd też, mimo bardzo licznych badań, porównywanie i uogólnianie ich wyników w celu stworzenia spójnego poglądu na strukturę i funkcję jest sprawą trudną. Niemniej jednak, udział PG w tworzeniu międzykomórkowych i pozakomórkowych struktur tkankowych, a zwłaszcza wykazane różnice składu i struktury proteoglikanów tkanek prawidłowych i patologicznych wskazują, że są one ważnym elementem homeostazy organizmu. Należy mieć nadzieję, że dalsze badania rzucają nowe światło na udział proteoglikanów w patogenezie wielu chorób, zwłaszcza przebiegających z uszkodzeniem tkanki łącznej, a być może, wytyczą również nowe kierunki terapeutyczne.

Artykuł otrzymano 30 kwietnia 1987 r.

Zaakceptowano do druku 6 marca 1988 r.

PIŚMIENICTWO

1. Hascall V. C., Sajdera S. W., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2384—2396.
2. Tsiganos C. P., Muir H., (1969), *Biochem. J.*, **113**, 839—884.
3. Rosenberg L., Hellmann W., Kleinschmidt A. K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1877—1883.
4. Poole A. R., (1986), *Biochem. J.*, **236**, 1—14.
5. Tomaszewski J., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 447—469.
6. Roden L., (1980) w: *Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, (red. Lennarz W.), str. 267—371; Plenum Press, New York.
7. Silbert J. E., (1982), *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 315—375.
8. Bourdon M. A., Oldberg A., Pirschnbacher M., Ruoslahti E., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1321—1325.
9. Heinegard D., Wieslander J., Sheehan J., Paulsson M., Sommarin Y., (1985), *Biochem. J.*, **225**, 95—106.
10. Hardingham T., (1981), *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 489—497.
11. Sato S., Rahemtulla F., Prince C. W., Tomana M., Butler T., (1985), *Connect. Tiss. Res.*, **14**, 65—75.
12. Vogel K., Heinegard D., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9298—9306.

13. Salisbury B.G.J., Wagner W.D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8050—8057.
14. Tomaszewski J.J., Hanzlik J.A., Donica H., Dmoszyńska E., (1978), *Artery*, **4**, 408—415.
15. Carrino D.A., Caplan A.I., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 14145—14154.
16. Kiang W.L., Margolis R.U., Margolis R.K., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10529—10537.
17. Pearson C.H., Gibson G.J., (1982), *Biochem. J.*, **201**, 27—37.
18. Ratcliffe A., Hardingham T.E., (1983), *Biochem. J.*, **213**, 371—378.
19. Buckwalter J.A., Rosenberg L.C., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9830—9839.
20. Iozzo R.V., (1985), *Lab. Invest.*, **53**, 373—396.
21. Lohmander L.S., Deluca S., Nilsson B., Hascall V.C., Kaputo C.B., Kimura J.H., Heinegard D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6084—6091.
22. Santer V., White R.J., Roughley P.J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **716**, 277—282.
23. Stanescu V., Stanescu R., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **757**, 377—381.
24. Bayliss M.T., Venn M., Maroudas A., Ali S.Y., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 387—400.
25. Crawford T., (1983), *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**, 1251—1259.
26. Theocharis D.A., Tsiganos G.P., (1985), *Int. J. Biochem.*, **17**, 479—484.
27. Sweet M.B.E., Thonar E.J.M., Marsh J., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 439—448.
28. Franzen A., Heinegard D., (1984), *Biochem. J.*, **224**, 59—66.
29. Anderson R.S., Schwartz E.R., (1985), *Arthritis Rheum.*, **28**, 804—812.
30. Oegema T.R. Jr., Kraft E.L., Jourdian G.W., Van Valen T.R., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 1720—1726.
31. Anderson J.C., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1390—1394.
32. Scott J.E., Orevord C.R., Hughes E.W., (1981), *Biochem. J.*, **195**, 573—581.
33. Chang Y., Yanagishita M., Hascall V.C., Wight T.N., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 5679—5688.
34. Kapoor R., Phelps C.F., Cöster L., Fransson L.A., (1981), *Biochem. J.*, **197**, 259—268.
35. McMurtrey J., Radhakrishnamurthy B., Dalfers E.R., Berenson G.S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1621—1626.
36. Oegema T.R. Jr., Hascall V.C., Eisenstein R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1312—1318.
37. Breton M., Picard J., Berron E., (1981), *Biochemistry*, **63**, 515—525.
38. Wight T.N., Hascall V.C., (1983), *J. Cell Biol.*, **96**, 167—172.
39. Franzen A., Björnsson S., Heinegard D., (1981), *Biochem. J.*, **197**, 669—674.
40. Vijayagopal P., Radhakrishnamurthy B., Srinivasan S.R., Berenson G.S., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **839**, 110—118.
41. Roughley P.J., Poole A.R., Mort J.S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11908—11914.
42. Hardingham T.E., (1979), *Biochem. J.*, **177**, 237—247.
43. Broom N.D., Poole C.A., (1983), *Arthritis Rheum.*, **29**, 1111—1119.
44. Hukins D.W., Asped R.M., (1985), *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 260—264.
45. Boskey A., (1981), *Clin. Orthop.*, **157**, 225—258.
46. Kapoor R., Phelps C.F., Wight T.N., (1986), *Biochem. J.*, **240**, 575—583.
47. Vijayagopal P., Srinivasan S.R., Radhakrishnamurthy B., Berenson G.S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8234—8241.
48. Camejo G., Lopez A., Lopez F., Quinones J., (1985), *Arteriosclerosis*, **55**, 93—105.
49. Hatton M.W.C., Moar S.L., (1985), *Thromb. Hemostas.*, **54**, 228—234.
50. Damle S.P., Kieras F.J., Tzeng W.K., Gregory J.D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1614—1620.
51. Fisher L.W., Termine J.D., Dejters S.W. Jr., Whitson S.W., Yanagishita M., Kimura J.H., Hascall V.C., Kleinman H.K., Hassell J.R., Nilsson B., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 6588—6594.

52. Carrino D.A., Caplan A.I., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12419—12430.
53. Hascall V.C., (1977), *J. Supramol. Structr.*, **7**, 101—120.
54. Hunter G.K., Heersche J.N.M., Aubin J.E., (1984), *Biochemistry*, **23**, 1572—1576.
55. Prince C.W., Rahemtulla F., Butler W.T., (1983), *Biochem. J.*, **216**, 589—596.
56. Heinegard D., Paulsson M., Inerot S., Carlström C., (1981), *Biochem. J.*, **197**, 355—366.
57. Heinegard D., Björne-Persson A., Cöster L., Franzen A., Gardell S., Malström A., Paulsson M., Sandfalk R., Vogel K., (1985), *Biochem. J.*, **230**, 181—194.
58. Oldberg A., Rouslahti E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4859—4865.
59. Tomaszewski J., Hanzlik J., Wolański I., Grzywa M., Donica H., Woźniak K., Henda M., (1979), *Ann. UMCS, Sectio D*, **34**, 277—282.
60. Wagner W.D., Rowe H.A., Connor J.B., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11136—11142.
61. Damle S.P., Cöster L., Gregory J.D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5523—5527.
62. Glössl J., Beck M., Kresse H., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14144—14150.
63. Fujii N., Nagai Y., (1981), *J. Biochem.*, **90**, 1249—1258.
64. Nakamura T., Matsunaga E., Shinaki H., (1983), *Biochem. J.*, **213**, 289—296.
65. Scott J.E., Orford C.R., (1981), **197**, 213—216.
66. Cöster L., Fransson L.A., (1981), *Biochem. J.*, **193**, 143—153.
67. Axelsson I., Heinegard D., (1980), *Exp. Eye Res.*, **31**, 57—62.
68. Rosenberg L.C., Choi H.U., Tang L.H., Johnson T.L., Pal S., Webber C., Reiner A., Poole N.R., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 6304—6313.
69. Brennan M.J., Oldberg A., Pirshbacher M.D., Ruoslahti E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13742—13750.
70. Ulldbjerg N., Malmström A., Ekman G., Sheehan J.K., Ulmsten U., Wingerup I., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 497—503.
71. Yanagishita M., Rodbard D., Hascall V.C., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 911—920.
72. Norling B., Glimelius B., Wasteson A., (1984), *Biochem. J.*, **221**, 845—853.
73. Oldberg A., Haymann E.G., Ruoslahti E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10847—10852.
74. Shinkai H., Nakamura T., Matsunaga E., (1983), *Biochem. J.*, **213**, 297—304.
75. Pearson C.H., Winterbottom N., Fackers D.S., Scott P.G., Carpenter M.R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 15101—15104.
76. Longas M.O., Fleischmeier R., (1985), *Connect. Tissue Res.*, **13**, 117—125.
77. Scott J.E., (1980), *Biochem. J.*, **187**, 887—891.
78. Vogel K.G., Paulsson M., Heinegard D., (1984), *Biochem. J.*, **223**, 587—597.
79. Scott J.E., Haigh M., (1985), *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 933—933.
80. Cöster L., Fransson L.A., Sheehan J., N i e d u s z y n s k i J.A., Phelps C.F., (1981), *Biochem. J.*, **197**, 483—490.
81. Rowe H.A., Wagner W.D., (1985), *Arteriosclerosis*, **5**, 101—109.
82. Oegema T.R., Thompson R.C. Jr., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1015—1022.
83. Axelsson J., (1984), *Acta Ophthalmol.*, **62**, 25—38.
84. Hassell J.R., Cintron C., Kublin C., Newsome D.A., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **222**, 362—369.
85. Shinomura T., Kimata K., Oike Y., Nero A., Hirose N., Tanabe K., Suzuki S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9313—9322.
86. Nero A., Kimata K., Oike Y., Shinomura T., Maeda N., Yano S., Takánasti N., Suzuki S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9323—9331.
87. Vaughan L., Winterhalter K.H., Bruckner P., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 4758—4763.
88. Strickland S., Beers W.J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5694—5698.
89. Axelsson J., Heinegard D., (1978), *Biochem. J.*, **169**, 517—530.
90. Hassell J.R., Newsome D.A., Hascall V.C., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 12346—12354.

91. Gregory J.D., Cöster L., Damle S.P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6965—6970.
92. Zeigler C., Mersmann G., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **799**, 203—208.
93. Hassell J.R., Newsome D.A., Krachmer J.H., Rodrigues M.M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3705—3709.
94. Nakazawa K., Hassell J.R., Hascall V.C., Lohmander L.S., Newsome D.A., Krachmer J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13751—13757.
95. Cole F.C., Burkhardt D., Forst L., Ghosh P., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **839**, 127—138.
96. Stevens R.L., Ewins R.J.F., Revell P.A., Muir H., (1979), *Biochem. J.*, **179**, 561—572.
97. Hopwood J.J., Robinson H.C., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 517—526.
98. Grassner A.M., (1983), *Hepato-Gastroenterol.*, **30**, 225—229.
99. Oldberg A., Kjellen L., Höök M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8505—8510.
100. Carlstedt I., Cöster L., Malmström A., Fransson L.A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11629—11635.
101. Cöster L., Malmström A., Carlstedt I., Fransson L.A., (1983), *Biochem. J.*, **215**, 417—419.
102. Klinger M.M., Margolis R.U., Margolis R.K., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 4082—4090.
103. Kanwar Y.S., Forghuar M.G., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1303—1307.
104. Parthasarathy N., Spiro R.G., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12749—12755.
105. Stow J.L., Sawada H., Forghuar M.G., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3296—3300.
106. Klein D.J., Oegema T.R., Eisenstein R., Furcht L., Michael A.F., Brown D.A., (1983), *Am. J. Pathol.*, **111**, 323—330.
107. Gallagher J.T., Lyon M., Steward W.P., (1986), *Biochem. J.*, **236**, 313—325.
108. Williams M.P., Streeter H.B., Wusteman F.S., Cryer A., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **756**, 83—91.
109. Shimada K., Ozawa T., (1985), *J. Clin. Invest.*, **75**, 1308—1316.
110. Matthew W.D., Greenspan R.J., Lander A.D., Reicherdt F., (1985), *J. Neurosci.*, **5**, 1842—1850.
111. Kleinman H.K., McGarvey M.L., Liotta L.A., Robey P.G., Tryggvason K., Martin G.R., (1982), *Biochemistry*, **21**, 6188—6193.
112. Stevens R.L., Oike Y., Handley C., Hascall V.C., Hampton A., Caterson B., (1984), *J. Cell Biochem.*, **26**, 247—259.
113. Izzo R.V., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 403—417.
114. Yanagishita M., Hascall V.C., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 10260—10269.
115. Izzo R.V., Wight T.N., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11135—11142.
116. Woods A., Höök M., Kjellen L., Smith C.G., Rees D.A., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 1743—1752.
117. Kjellen L., Oldberg A., Höök M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10407—10413.
118. Winterbourne D.J., (1982), *Bioscience*, **2**, 1009—1015.
119. Robinson J., Viti M., Höök M., (1984), *J. Cell Biol.*, **98**, 946—953.
120. Kleinman H.K., McGarvey M.L., Hassell J.R., Martin G.R., (1983), *Biochemistry*, **22**, 4969—4974.
121. Kanwar Y.S., Veis A., Kimura J.H., Jakubowski M.L., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 762—766.
122. Parthasarathy N., Spiro R.G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 507—513.
123. Kobayashi S., Oguri K., Kobayashi K., Okayama M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12051—12057.
124. Hassell J.R., Robey P.G., Barrach H.J., Wilczek J., Rennard S.I., Martin G.R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4494—4498.
125. Hassell J.R., Leyshon W.C., Ledbetter S.R., Tyree B., Suzuki S., Kato M., Kimata K., Kleinman H.K., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 8098—8105.

126. Ledbetter S.R., Tyree B., Hassell J.R., Horigan E.A., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 8106—8113.
127. Koda J.E., Bernfield M., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 11763—11770.
128. Rapraeger A., Jalkanen M., Endo E., Koda J., Bernfield M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11046—11052.
129. Fujiwara S., Wiedemann H., Timpl R., Lustig A., Engel J., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **143**, 145—157.
130. Koda J.E., Rapraeger A., Bernfield M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 587—597.
131. Hedman K., Johansson S., Vartio T., Kjellen L., Vaheri A., Höök M., (1982), *Cell*, **28**, 663—670.
132. Sekiguchi K., Hakomori S., Funahashi M., Matsumoto I., Seno M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14359—14365.
133. Evington J.R.N., Luscombe M., Haldbrook J.J., (1985), *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 243—244.
134. Williams E.C., Janmey P.A., Ferry J.D., Mosher D.F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 14973—14978.
135. Laterra J., Silbert J.E., Culp L.A., (1983), *J. Cell Biol.*, **96**, 112—123.
136. Fransson L.A., Havsmark B., Sheehan J.K., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 13039—13043.
137. Fransson L.A., Carlstedt I., Cöster L., Malmström A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14342—14345.
138. Radhakrisnamurthy B., Smart F., Delfers E.R. Jr., Berenson G.S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7575—7582.
139. Kanwar Y.S., Linker A., Fraquhar M.G., (1980), *J. Cell Biol.*, **86**, 688—693.
140. Rosenzweig L.J., Kanwar Y.S., (1982), *Lab. Invest.*, **47**, 177—184.
141. Kanwar Y.S., (1984), *Lab. Invest.*, **51**, 7—21.
142. Bengtsson G., Olivercrona T., Höök M., Riesenfeld J., Lindhal U., (1980), *Biochem. J.*, **189**, 625—633.
143. Shimada K., Gill P.J., Silbert J.E., Douglas W.H., Fanburg B.L., (1981), *J. Clin. Invest.*, **68**, 995—1002.
144. Ratner N., Bunge R.P., Glaser L., (1985), *J. Cell Biol.*, **101**, 744—754.
145. Fritze L.M., Reilly C.F., Rosenberg R.D., (1985), *J. Cell Biol.*, **100**, 1041—1049.
146. Castellot J.J. Jr., Beeler D.L., Rosenberg R.D., Karnowsky M.J., (1984), *J. Cell Physiol.*, **120**, 315—320.
147. Margolis R.U., Margolis R.K., Chang L.B., Preti C., (1975), *Biochemistry*, **14**, 85—88.
148. Grief K.F., Trenchard H.I., (1984), *J. Cell Biochem.*, **26**, 127—133.
149. Jones R.T., Walker J.H., Stadler H., Whittaker V.P., (1982), *Cell Tissue Res.*, **224**, 685—688.
150. Brandan E., Maldonado M., Garrido J., Inestrosa N.C., (1985), *J. Cell Biol.*, **101**, 985—992.
151. Bhavanandan V.P., Davidson E.A., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2032—2036.
152. Fedarko N.S., Conrad H.E., (1986), *J. Cell Biol.*, **102**, 587—599.
153. Frukawa K., Bhavanandan V.P., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **740**, 466—475.
154. Kinoshita S., Yishii K., (1979), *Exp. Cell Res.*, **124**, 361—369.
155. Bland C.E., Ginsburg H., Silbert J.E., Metcalfe D.D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8661—8666.
156. Robinson H.M., Horner K.A., Höök M., Ogren S., Lindhal U. (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6687—6693.
157. Wosteson A., Höök M., Westermarck B., (1976), *FEBS Lett.*, **64**, 218—221.

BOGUSŁAW WIŁKOMIRSKI*

Filogenetyczne prekursorzy steroli

Phylogenetic precursors of sterols

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Struktura podstawowych lipidów kopalnych
 - II-1. Hopanoidy
 - II-2. Lipidy archebakteryjne
 - II-3. Tricyklopoliprenole
 - II-4. Karotenoidy bakteryjne
- III. Równoważność strukturalna i funkcjonalna steroli i hopanoidów
- IV. Ewolucja cykazy skwalenu
- V. Postulowane drzewo filogenetyczne politerpenoidowych lipidów błonowych

Contents

- I. Introduction
- II. Structure of basic fossil lipids
 - II-1. Hopanoids
 - II-2. Archaeobacterial lipids
 - II-3. Tricycloprenols
 - II-4. Bacterial carotenoids
- III. Structural and functional equivalence of sterols and hopanoids
- IV. Evolution of squalence cyclase
- V. Putative phylogenetic tree for polyterpenoid membrane lipids

I. Wprowadzenie

Zawartość związków organicznych nagromadzonych w osadach geologicznych przekracza 10.000 razy masę „żywej”, organicznej materii Ziemi. Badania dotyczące struktury i pochodzenia, a także roli organicznych substancji obecnych w złożach osadowych rozpoczęły się w latach 60-tych i przerodziły w bardzo pręźnie rozwijającą się gałąź wiedzy zwaną paleontologią molekularną.

*Dr hab., Zakład Systematyki i Geografii Roślin Instytut Botaniki UW. Warszawa, Al. Ujazdowskie 4.

Osady (łupki, kerogen, węgiel, ropa) zawierają bardzo złożone mieszaniny substancji o charakterze lipidowym. Wiele z nich stanowi oczywiste „molekularne skamieniałości” tj. związki, które nie występują obecnie w żywych organizmach. Struktura tych lipidów wykazuje jednak bez żadnych wątpliwości, że są one pochodzenia biologicznego; uległy one przemianom chemicznym w trakcie dojrzewania osadów [1].

Przybliżenie Czytelnikom tej dziedziny badań wydaje się celowe, bowiem na łamach „Postępów Biochemii” nie było dotąd publikacji dotyczącej struktury i pochodzenia lipidów kopalnych, a także roli ich analogów w obecnie żyjących organizmach. Rozważania te pozwalają również na przedstawienie drzewa filogenetycznego politerpenoidowych lipidów błonowych.

II. Struktura podstawowych lipidów kopalnych

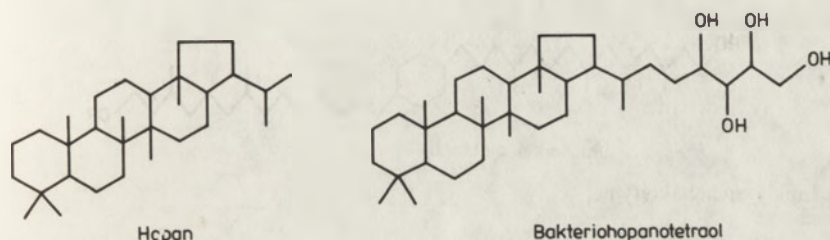
II-1. Hopanoidy

W końcu lat 50-tych z żywicy drzew tropikalnych z rodziny Dipterocarpaceae rosnących w Indonezji wyizolowano pięciocykliczne pochodne triterpenowe (C_{29} i C_{30}) o nowym, nieznanym dotąd rodzaju szkieletu [2]. Szkielet ten nazwano hopenem, natomiast związki zawierające taki szkielet — hopanoidami.

W kilka lat później triterpeny te znaleziono w paprociach [3, 4], mchach [5, 6], porostach [7] i grzybach [8, 9]. W 1966 r. Hills i Whitehead natrafili na hopanoidy w wysokowrzącej frakcji nigeryjskiej ropy naftowej [10]. Rozwój metod badawczych, a zwłaszcza spektroskopii masowej i chromatografii gazowej potwierdził powszechność występowania hopanoidów w osadach [11]. Związki te nazwano geohopanoidami w odróżnieniu od biohopanoidów izolowanych z żyjących organizmów. Stwierdzono również duże podobieństwo strukturalne geohopanoidów (wyizolowano obecnie ponad 150 związków o tym szkielecie) pochodzących z kopaliny wydobytych w różnych miejscach świata. Geohopanoidy znajdowano w łupkach ilastych, glinach, wapniu, węglu i ropie; wiek wielu z tych osadów przekracza 500 mln. lat [12]. Ilość samych tylko hopanoidów (nie licząc innych związków pochodzenia terpenoidowego) szacuje się na 10^{12} ton, co wynosi mniej więcej tyle, ile masa całego węgla organicznego w żyjących obecnie organizmach. Znalezienie tak ogromnej ilości i różnorodności hopanoidów w osadach wymagało wyjaśnienia ich pochodzenia. Pamiętać bowiem należy, że hopanoidy, w odróżnieniu od triterpenów o innych szkieletach, nie występują powszechnie w roślinach. Odkrycie C_{30} hopanoidów w bakteriach i sinicach [13] sugerowało możliwość mikrobiologicznego pochodzenia tych związków, dając jednocześnie wyjaśnienie tak dużej zawartości geohopanoidów. Prawdopodobne biologiczne pochodzenie nie wyjaśniało jeszcze występowania wśród geohopanoidów związków o cząsteczce zawierającej ponad 30 atomów węgla (tj. od 31 do 35). Cząsteczki kolejnych identyfikowanych biohopanoidów nie przekraczały 30 atomów węgla. Można sobie

wyobrazić przegrupowania i degradacji cząsteczek podczas starzenia się osadów, ale dołączenie w tych warunkach od 1 do 5 atomów węgla było całkowicie nieprawdopodobne. Geohopanoidy o cząsteczce zawierającej powyżej 30 atomów węgla pozostawały, jak mówiono, „osieroconymi lipidami”, czyli związkami, których prekursorów dotąd nie znano [14]. Była to sytuacja bez precedensu w nauce, polegająca na tym, że cała rodzina substancji naturalnych pozostała niezauważona, a na jej istnienie wskazywały dopiero „molekularne skamieniałości”.

Dopiero w roku 1973 Forster i współpracownicy [15] wyizolowali z bakterii *Acetobacter xylicum* i *Bacillus acidocaldarius* związek nazwany bakteriohopanotetraolem (C_{35}). Cząsteczka bakteriohopanotetraolu zawiera tetrahydroksylowy łańcuch boczny dołączony do szkieletu hopanu.



Ryc. 1. Hopanoidy.

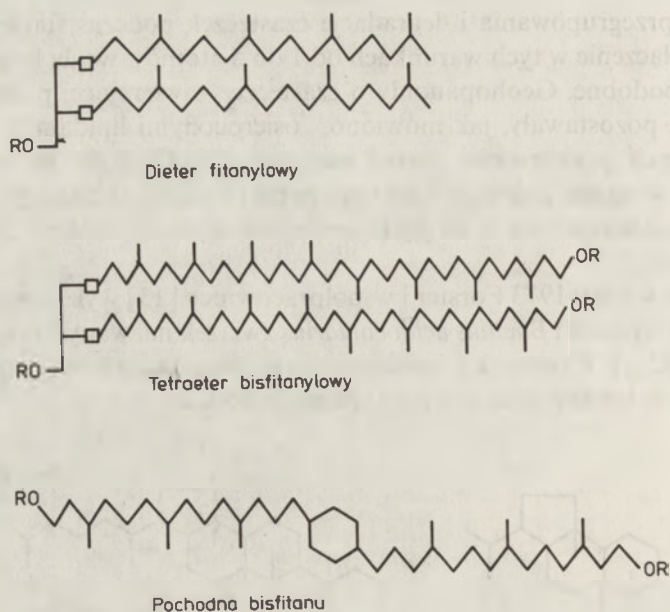
Takie wysoko utlenione bakteriohopanoidy stanowiące nową grupę lipidów bakteryjnych uważa się za potencjalne prekursory wszystkich hopanoidów kopalnych. Ich szerokie rozpowszechnienie w bakteriach i sinicach, a także odporność na degradację pomimo rozgałęzionej struktury, tłumaczą powszechność i obfitość występowania w osadach hopanoidów o cząsteczce zawierającej powyżej 30 atomów węgla.

II-2. Lipidy archebakteryjne

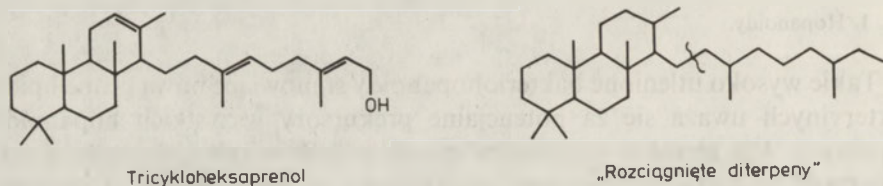
Archebakterie różnych typów zawierają fitanylowe dietyry i specyficzne bis-fitanylowe tetraetery gliceroli i innych polioli jako lipidy błonowe [16]. W osadach znaleziono 20-węglowy węglowodór — fitan-, który częściowo mógłby także pochodzić z degradacji fitolu chlorofilowego. Natomiast jego C_{40} dimer — bis-fitan- niewątpliwie pochodzi z archebakterii. Zarówno bisfitan jak i jego pochodne zawierające w cząsteczce pierścienie cyklopentanowe lub cykloheksanowe są bardzo rozpowszechnione w osadach [17—19]. Związki te przedstawiono na rycinie 2.

II-3. Tricyklopoliprenole

Tricykliczne poliprenole, a zwłaszcza powstałe z nich węglowodory tzw. „rozciągnięte diterpeny” występują powszechnie w osadach [20]. Ich strukturę



Ryc. 2. Lipidy archebakteryjne.



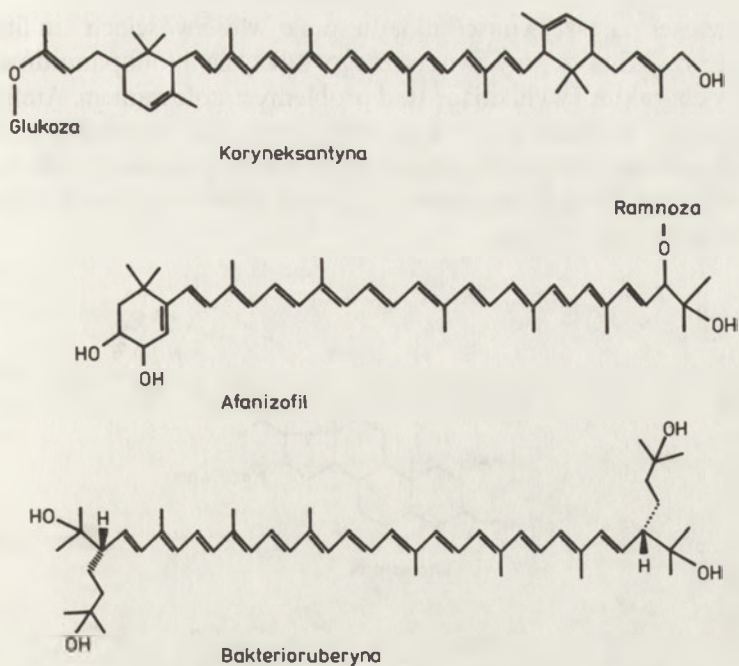
Ryc. 3. Tricyklopoliprenole.

przedstawia rycina 3. Związki tej klasy zawierają od 19 do 30 atomów węgla w cząsteczce i jako podstawę mają charakterystyczny szkielet tricykliczny [21, 22].

II-4. Karotenoidy bakteryjne

Wiele bakterii zawiera charakterystyczne pochodne karotenoidowe. Różnią się one od typowych karotenoidów roślinnych obecnością wysokopolarnych reszt na końcach łańcucha węglowodorowego. Przykłady takich związków przedstawiono na rycinie 4. Rozpatrzenie struktury lipidów występujących w osadach geologicznych pozwala na wyprowadzenie dwóch wniosków o charakterze ogólnym:

— W osadowej materii organicznej lipidy mikrobiologiczne stanowią znaczną pulę. Oczywiście przyczyną tego jest fakt, że każdy organizm po śmierci ulega bakteryjnemu procesowi rozpadu, głównie do dwutlenku węgla. Ta część



Ryc. 4. Karotenoidy bakteryjne.

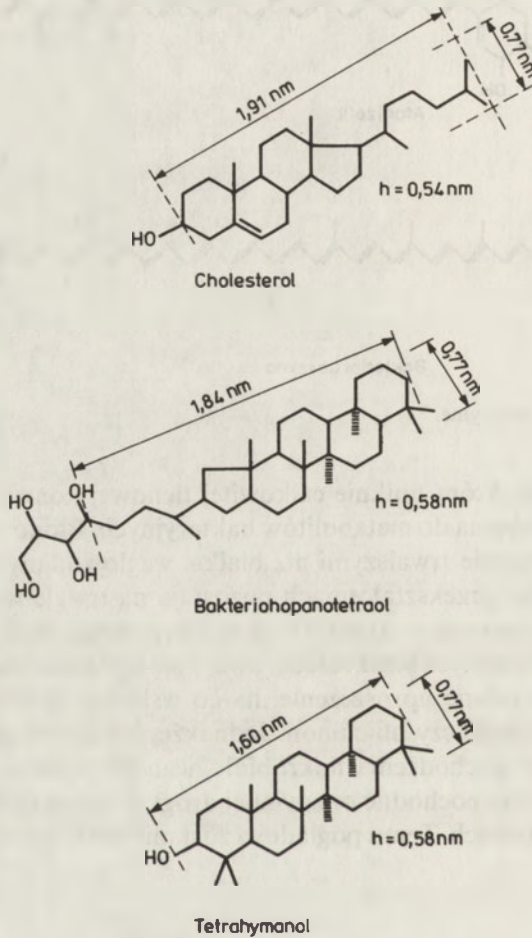
materii organicznej, która uniknie całkowitej tlenowej konwersji do CO_2 , jest początkowo przerabiana do metabolitów bakteryjnych. Błonowe politerpenoidy są strukturami znacznie trwalszymi niż białka, węglowodany czy kwasy tłuszczowe i po pewnych przekształceniach pozostają na trwałe w osadach.

— Wszystkie omawiane struktury są politerpenoidami. Związki te, często o bardzo skomplikowanych strukturach, uważa się za typowe metabolity wtórne. Jest to oczywiście pewne uproszczenie, na co wskazuje generalna rola takich związków jak dolichole czy ubichinon. Jednakże powszechność występowania w osadach lipidów pochodzenia mikrobiologicznego pozwala na postawienie hipotezy, że wszystkie pochodne omawianej drogi metabolicznej mają podobne znaczenie w organizmach. Temu pogładowi zostanie poświęcona pozostała część artykułu.

III. Równoważność strukturalna steroli i hopanoidów

Sterole są powszechne u eukariontów, a ich nieobecność u prokariotów jest znacząca. Istnieje jeden wyjątek od tej reguły, który zostanie omówiony później. Poszukiwanie steroli w bakteriach doprowadziło do wykrycia jedynie śladowych ilości, nie wykazano ponadto możliwości syntezy steroli *de novo* w żadnym z przebadanych prokariotów [23]. Biohopanoidy są strukturalnymi odpowiednikami steroli. Wyraża się to w analogicznych wymiarach molekularnych,

kształcie cząsteczki, sztywności układu oraz właściwościach amfifilicznych. Wydaje się, że jedną z przyczyn późnego odkrycia biohopanoidów jest ich amfifiliczny charakter i wynikające stąd problemy z izolowaniem. Amfifiliczność jest jednocześnie kluczem do biologicznego znaczenia hopanoidów. Wymiary molekularne sterolu i hopanoidów zostały przedstawione na rycinie 5. Równoważność strukturalna tych związków wyraża się równoważnością funkcjonalną zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.



Ryc. 5. Równoważność strukturalna steroli i hopanoidów.

In vitro niektóre hopanoidy (podobnie do cholesterolu) wpływają na właściwości pojedynczych i podwójnych błon fosfolipidowych lub pęcherzyków lipidowych (liposomów) [24—26]. *In vivo* wzrost zależnej od steroli mykoplazmy przedłuża dodanie do podłoża diplopterolu zamiast cholesterolu [27]. Jeżeli pierwotniak *Tetrahymena pyriformis* (eukariont) jest hodowany na pożywce zawierającej sterole, używa je do budowy swoich błon. Jednak, gdy pożywka jest

pozbawiona steroli, *Tetrahymena pyriformis* biosyntetyzuje diplopterol (hopanoid) oraz tetrahymanol (związek pokrewny typowym hopanoidom) w ilościach porównywalnych ze sterolami [28]. Tetrahymanol znajduje się w błonach, gdzie uzupełnia ich skład lipidowy nadając błonie prawidłową płynność. Przykład ten wskazuje na takie same możliwości hopanoidów w błonach prokariotów.

Z bakterii niektórych szczepów wyizolowano także bardziej złożone hopanoidy. Różnią się one od typowych biohopanoidów obecnością grup aminowych w łańcuchu bocznym [29, 30], które mogą być dodatkowo połączone z ugrupowaniami polarnymi typu tryptofanu i ornityny, ewentualnie glukozaminy, N-acetyloglukozaminy [31] lub adenozy [32]. Znaczenie tych związków nie jest znane. Być może odgrywają one jakąś bardziej specyficzną rolę niż zastępowanie steroli w błonach, będąc czymś w rodzaju „bakteryjnych sterydów”.

IV. Ewolucja cyklazy skwalenu

Wszystkie C_{30} hopanoidy wyodrębnione z bakterii, paproci, mchów, porostów i grzybów są pozbawione grupy funkcyjnej zawierającej tlen na C-3. Natomiast triterpeny eukariotyczne o innych szkieletach, a także hopanoidy z roślin nasiennych mają grupę OH na C-3. Pochodzi ona z cyklizacji epoksydu skwalenu, podczas gdy 3-dezoksy hopanoidy powstają w procesie bezpośredniej enzymatycznej cyklizacji skwalenu inicjowanej przez proton. Wykazano to doświadczalnie w przypadku hopanoidów z *Polypodium vulgare* [33] i *Tetrahymena pyriformis* [34].

Zarówno cechy strukturalne hopanoidów bakteryjnych, jak też dużo prostszy charakter ich biosyntezy pozwala na sformułowanie hipotezy, że hopanoidy są nie tylko strukturalnymi i funkcjonalnymi odpowiednikami steroli w błonach, lecz także ich filogenetycznymi prekursorami. Następujące cechy biosyntezy hopanoidów przemawiają za bardziej pierwotnym charakterem ich biosyntezy w stosunku do biosyntezy steroli [35].

— w biosyntezie hopanoidów cyklizacji ulega prostszy substrat, tj. skwalen, a nie jego pochodna 2,3-epoksydowa [36, 37].

— konformacja substratu w biosyntezie hopanoidów (całkowicie pre-krzesłowy skwalen) jest mniej wymuszona termodynamicznie niż konformacja substratu w biosyntezie steroli, która musi być częściowo pre-łódkowa. Tak więc cyklizacja katalizowana przez enzym, którego substratem jest skwalen jest najmniej niekorzystna termodynamicznie ze wszystkich pre-cyklizacyjnych konformacji tego węglowodoru [38, 39].

— biosynteza hopanoidów jest prostą cyklizacją, podczas gdy biosynteza steroli wymaga dalszych przegrupowań i degradacji po zakończeniu etapu cyklizacji [40, 41].

— przebadane cyklazy skwalenu z *Acetobacter pasteurianum* [42] i *Tetrahymena pyriformis* wykazują stosunkowo niską specyficzność substratową. Mogą

one cyklizować zarówno skwalen, jak i oba enancjomery jego epoksydu. Eukariotyczna cyklaza epoksydu skwalenu działa specyficznie na 3S enancjomer epoksydu, nie cyklizując jednak ani 3R enancjomeru epoksydu ani samego skwalenu [44].

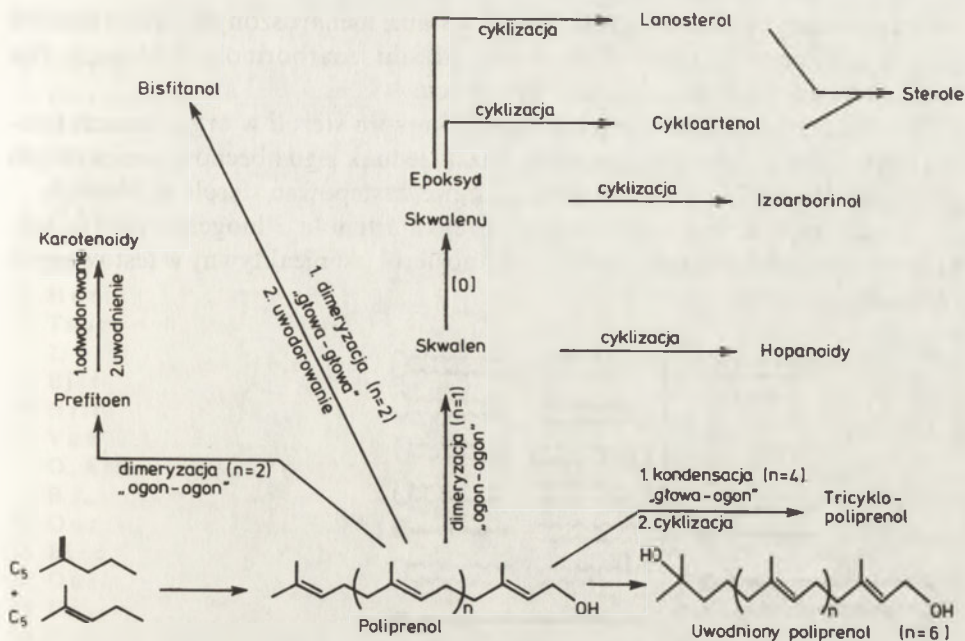
Przedstawione argumenty sugerują wyraźnie, że cyklaza skwalenu jest filogenetycznym prekursorem cyklazy epoksydu skwalenu. Cyklazy skwalenu są typowymi enzymami prokariotycznymi. Jedynym wyjątkiem wśród prokariotów jest *Methylococcus capsulatum* [45], która oprócz hopanoidów, zawiera 3 β -hydroksypochodne lanosterolu. Jest to zatem jedyny znany prokariot zawierający analogi steroli. Nie są to co prawda sterole właściwe, lecz ich 4 α -metylopochodne stanowiące pośredniki biosyntetyczne pomiędzy lanosterolem a sterolami właściwymi. Wskazuje to na obecność w tym organizmie dwóch różnych układów biosyntetycznych:

- nieoksydacyjnej cyklizacji skwalenu prowadzącej do hopanoidów,
- utleniania skwalenu do epoksydu i dalszej cyklizacji do pochodnych lanosterolu w sposób typowy dla organizmów eukariotycznych.

V. Hipotetyczne drzewo filogenetyczne politerpenoidowych lipidów błonowych

Zaproponowanie drzewa filogenetycznego politerpenoidów błonowych pozwala z jednej strony na prześledzenie prawdopodobnej drogi ewolucji tych związków, z drugiej zaś na — prawdopodobne w przyszłości — ujawnienie pośredników (brakujących ogniw), które do tej pory nie zostały wyodrębnione z żyjących organizmów, a które prawdopodobnie są lipidami bakteryjnymi. Zostało to przedstawione na rycinie 6.

Najprostszy politerpenoidami, które mogłyby udoskonalać lub nawet tworzyć błony są uwodnione produkty kondensacji reszt prenylowych (o długości łańcucha od 5 do 9 takich reszt). Ta liczba reszt prenylowych daje odpowiednią wielkość cząsteczki. Powstanie takich politerpenoidów nie wymaga żadnych innych układów biosyntetycznych niż te, które biorą udział w tworzeniu łańcucha poliprenowego i wysycaniu wiązania podwójnego. Tak samo prymitywne są tricyklopoliprenole. Jako ciekawostkę można podać fakt, że ekstrakty bezkomórkowe z *Tetrahymena pyriformis* [46] mogą przeprowadzać całkowicie *trans* pentaprenylove etery metylowe do sesterpenów typu skalaranu oraz cyklizować całkowicie *trans* heksaprenylove etery metylowe do pochodnych di-, tri-, tetra-, i pentacyklicznych. Jest to pierwsze bezpośrednio wykazanie enzymatycznej cyklizacji pochodnych długołańcuchowych alkoholi izoprenoidowych. Wydaje się, że taka cyklizacja może odbywać się przy udziale cyklazy skwalen-hopanoid tego pierwotniaka, co dodatkowo może świadczyć o małej specyficzności pierwotnych cyklaz. Proces ten jest termodynamicznie równie korzystny, jak cyklizacja skwalenu, a droga biosyntezy poliprenoli jest prostsza. Przemawia to za przypuszczeniem, że poliprenylove usztywniacze błonowe są jeszcze bardziej pierwotne niż produkty cyklizacji skwalenu. Na podobnym



Ryc. 6. Hipotetyczne drzewo filogenetyczne politerpenoidowych lipidów błonowych.

szczeblu rozwoju ewolucyjnego są wszelkiego rodzaju karotenoidy bakteryjne i archebakteryjny bisfitalol. Żaden z tych związków nie wymaga etapu cyklizacji w swojej biosyntezie.

Kolejnym etapem rozwoju poliizoprenoidów była zapewne reakcja dimeryzacji pirofosforanu farnezyli i pirofosforanu geranylogeranyli. W wyniku dimeryzacji tworzy się skwalen oraz różnego typu tetraterpeny. Wyniki badań wskazują, że działają tu dwa bardzo podobne enzymy, pochodzące od jednego wspólnego i powstałe w wyniku punktowej mutacji [47].

Cyklizacja skwalenu jest procesem bardziej zaawansowanym ewolucyjnie w porównaniu z biosyntezą niecyklicznych usztywniaczy błonowych. Po pierwsze, powstanie skwalenu wymaga dodatkowego enzymatycznego procesu dimeryzacji, po drugie jego cyklizacja jest już trochę mniej korzystna termodynamicznie niż cyklizacja poliprenoli, choć pozostaje termodynamicznie faworyzowana w porównaniu z cyklizacją epoksydu skwalenu. Struktura cyklaz skwalenu i epoksydu skwalenu nie jest jeszcze całkowicie poznana, badania są w toku [48, 49].

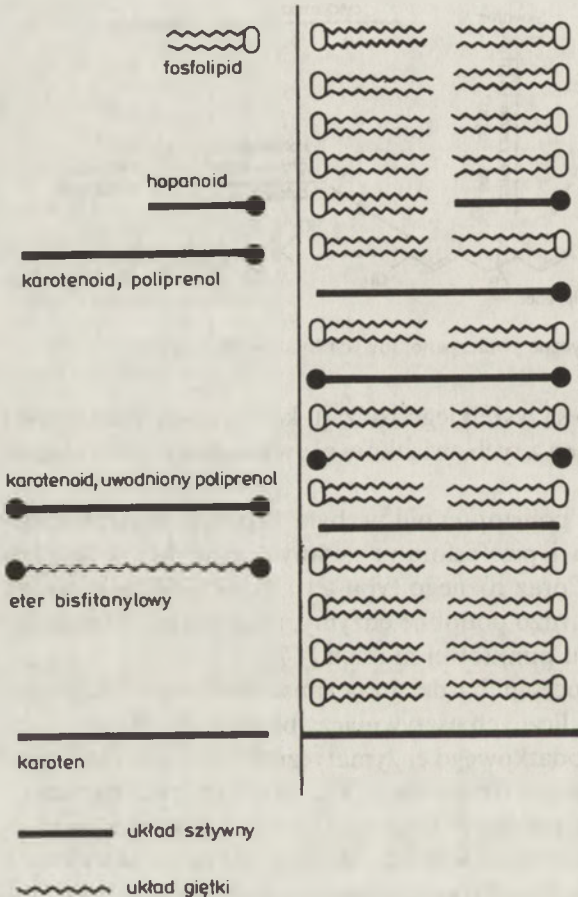
Główna zmiana środowiskowa nastąpiła wraz z pojawieniem się tlenu atmosferycznego. Cyklizacja epoksydu skwalenu przez pierwotną cyklazę skwalen-hopanoid, która może zachodzić ze względu na prawdopodobną małą specyficzność enzymu prowadzi do dioli nieprzydatnych dla stabilizacji błon. Prawdopodobnie punktowa mutacja w cyklazie doprowadziła do zmiany pozwalającej na tworzenie z epoksydu skwalenu trzech zasadniczych produktów:

— izoaborinolu, pięciocyklicznego triterpenu występującego w kilku roślinach

nach tropikalnych oraz wyodrębnionego w stanie nienaruszonym z kilku osadów [50]. Do tej pory brak danych na temat udziału izoarborinolu w błonach. Nie znaleziono go także w bakteriach tlenowych.

— cykloartenolu, biogenetycznego prekursora steroli w organizmach fotosyntetyzujących. Ostatnie badania wykazały jednak jego obecność w niektórych pierwotniakach [51, 52]. Cykloartenol może zastępować sterole w błonach.

— lanosterolu, będącego izomerem cykloartenolu i biogenetycznym prekursorem steroli u zwierząt i grzybów. Lanosterol jest nieaktywny w testowanych błonach.



Ryc. 7. Uszlachetnianie błon przez politerpenoidy. (Lewa kolumna zawiera objaśnienia znaków, prawa kolumna pokazuje strukturę błony).

W zależności od rozmiarów molekularnych oraz od obecności ugrupowań polarnych, omówione filogenetyczne prekursora steroli mogą w różny sposób udoskonalać błony fosfolipidowe, co przedstawiono na rycinie 7. Porównując model z pojęciami z techniki uważa się, że uszlachetniacze struktury błony pełnią rolę nitów, kołków, klamer i prętów zbrojeniowych.

Artykuł otrzymano 17 listopada 1987 r.
Zaakceptowano do druku 10 marca 1988 r.

PIŚMIENICTWO

1. Ourisson G., Albrecht P., Rohmer M., (1984), *Sci. Am.*, **251**, 44—51.
2. Ourisson G., Albrecht P., Rohmer M., (1979), *Pure App. Chem.*, **51**, 709—729.
3. Berti G., Bottari F., (1969), *Progr. Phytochem.*, **1**, 589—685.
4. Bottari F., Marsili A., Morelli I., Pacciani M., (1972), *Phytochemistry*, **11**, 2519—2523.
5. Marsili A., Morelli I., (1968), *Phytochemistry*, **7**, 1705—1706.
6. Marsili A., Morelli I., Bernardini C., Pacchiani M., (1972), *Phytochemistry*, **11**, 2003—2005.
7. Huneck S., (1971), *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **29**, 262—268.
8. Tsuda Y., Isobe K., Fukushima S., Ageta M., Iwata K., (1967), *Tetrahedron Lett.*, 23—28.
9. Ejiri H., Shibata S., (1974), *Phytochemistry*, **13**, 2871—2871.
10. Hills I., Whitehead E., (1966), *Nature*, **209**, 977—979.
11. Van Dorselaer A., Ensminger A., Spyckerelle C., Dastillung M., Sieskind O., Arpino P., Albrecht P., Ourisson G., Brooks P. W., Gaskell S. J., Kimble B. J., Philp R. P., Maxwell J. R., Englinton G., (1974), *Tetrahedron Lett.*, 1349—1352.
12. Ourisson G., (1987), *Nature*, **326**, 126—129.
13. Bird C. W., Lynch J. M., Pirt S. J., Reid W. W., (1971), *Tetrahedron Lett.*, 3189—3190.
14. Ourisson G., Rohmer M., Poralla K., (1987), *Microbiol. Sci.*, **4**, 52—57.
15. Forster H. J., Biemann K., Haigh W. J., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 133—143.
16. Fewson C. A., (1986), *Biochem. Educat.*, **14**, 103—115.
17. Michaelis W., Albrecht P., (1979), *Naturwissenschaften*, **66**, 420—421.
18. Chappe B., Michaelis W., Albrecht P., Ourisson G., (1979), *Naturwissenschaften*, **66**, 522—523.
19. Chappe B., Albrecht P., Michaelis W., (1982), *Science*, **217**, 65—66.
20. Heissler D., Ocampo R., Albrecht P., Riah J. J., Ourisson G., (1984), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 496—497.
21. Reed W. E., (1977), *Geochim. Cosmochim. Acta*, **41**, 237—247.
22. Connon J., Restle A., Albrecht P., (1980), w. „Advances in Organic Geochemistry” 1979, red. Douglas A. G., Maxwell J. R., str. 1—17, Pergamon Press, Oxford.
23. Bouvier P., Rohmer M., Benveniste P., Ourisson G., (1976), *Biochem. J.*, **159**, 267—271.
24. Kannenberg E., Poralla K., (1980), *Naturwissenschaften*, **67**, 458—459.
25. Poralla K., Kannenberg E., Blume A., (1980), *FEBS Lett.*, **113**, 107—111.
26. Bissere P., Wolff G., Albrecht M. A., Tanaka T., Nakatani Y., Ourisson G., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 320—324.
27. Kannenberg E., Poralla K., (1982), *Arch. Microbiol.*, **133**, 100—102.
28. Conner R. L., Landrey J. R., Burns C. H., Mallory F. B., (1968), *J. Protozool.*, **15**, 600—605.
29. Neulist S., Rohmer M., Holst O., Borowiak D., Mayer H., (1984), *C. R. Acad. Sci.*, **II**, Paris, 298, 631—634.
30. Neulist S., Holst O., Rohmer M., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **147**, 561—568.
31. Langworthy T. A., Mayberry W. R., Smith P. F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **431**, 550—569.
32. Neulist S., Rohmer M., (1985), *Biochem. J.*, **328**, 769—771.
33. Barton D. H. R., Mellows G., Widdowson D. A., (1971), *J. Chem. Soc. (Sect. C)*, 110—116.
34. Caspi E., Zander J. M., Greig J. B., Mallory F. B., Conner R. L., Landrey J. R., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3563—3565.
35. Rohmer M., Bouvier P., Ourisson G., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**, 841—851.

36. Zander J.M., Greig J.B., Caspi E., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1247—1254.
37. Barton D.H.R., Moss G.P., (1966), *Chem. Commun.*, 261—262.
38. Eschenmoser A., Ruzicka L., Jeger O., Arigoni D., (1955), *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1890—1904.
39. Ruzicka L., (1959), *Proc. Chem. Soc.*, 341—360.
40. Anding C., Rohmer M., Ourisson G., (1976), *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1274—1275.
41. Benveniste P., (1986), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **37**, 275—308.
42. Rohmer M., Anding C., Ourisson G., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **112**, 541—547.
43. Bouvier P., Berger Y., Rohmer M., Ourisson G., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **112**, 549—556.
44. Barton D.H.R., Jarman T.R., Watson K.C., Widdowson D.A., Boar R.B., Damps K.J., (1975), *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 1134—1138.
45. Rohmer M., Bouvier P., Ourisson G., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **112**, 557—560.
46. Renoux J.M., Rohmer M., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **155**, 125—132.
47. Davies B.H., Taylor R.F., (1976), *Pure Appl. Chem.*, **47**, 211—221.
48. Neumann S., Simon H., (1986), *Biol. Chem., Hoppe-Seyler*, **367**, 723—729.
49. Sekler B., Poralla K., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **881**, 356—363.
50. Ourisson G., Albrecht P., Rohmer M., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 236—239.
51. Raederstorff D., Rohmer M., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **164**, 421—426.
52. Raederstorff D., Rohmer M., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **164**, 427—434.

RECENZJE KSIĄŻEK

„Lehrbuch der Pflanzenphysiologie”

Eike Libbert: 4 Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1987,

381 str. tekstu, 52 str. literatury i skorowidza.

E. Libbert jest od lat znanym z nowoczesności autorem piszącym w NRD (Uniwersytet w Rostoku), dlatego ukazanie się nowego, znacznie rozszerzonego 4 wydania Fizjologii roślin należy przyjąć z uwagą. Wprawdzie zgodnie z tytułem, treścią książki winny być w zasadzie podstawowe zagadnienia fizjologii roślin, ale pierwsze 4 rozdziały, czyli prawie 60% tekstu poświęca autor właściwie przemianie materii. Jest więc ona bogatym źródłem wiedzy biochemicznej, jakkolwiek o charakterze niestety dość encyklopedycznym. Z punktu widzenia dydaktyki biochemicznej konstrukcja książki nie jest najszcześniejsza, gdyż po krótkim, wprowadzającym rozdziale 1, rozdział 2 przedstawia „podstawy przemiany materii”, ale początkowo tylko w zakresie utleniania biologicznego, asymilacji CO₂ i niektórych zagadnień filogenetycznych. Rozdział 3 omawia z kolei podstawy regulacji biologicznej, a rozdział 4, o najbardziej encyklopedycznej konstrukcji — szczegółowe aspekty przemiany materii. I właściwie dopiero w tych 2 rozdziałach czytelnik dowiaduje się o podstawowych własnościach enzymów, o części koenzymów (o koenzymach oksydoreduktaz była bowiem mowa już przy utlenianiu biologicznym). Natomiast chemizm przemian podstawowych jest nie zawsze traktowany dostatecznie dokładnie, a nawet czasem wręcz encyklopedycznie (np. metabolizm wtórny). Wreszcie rozdział 5 (Wzrost i rozwój) oraz 6 (ruch), stanowiące razem około 40% tekstu, dotyczą aspektów typowo fizjologicznych, jakkolwiek i tu biochemik może znaleźć interesujące go fragmenty, takie jak strukturę i przemiany hormonów roślinnych, substancji hamujących, fitochromu, fitoaleksyn, działania herbicydów retardantów, morfaktyn i in.

Jak z tego wyszczególnienia wynika, książka nie może stanowić podstawy do systematycznego studiowania biochemii, a przypuszczalnie i fizjologii roślin dla studentów nie mających dostatecznego przygotowania, mimo takiej deklaracji złożonej we wstępie przez autora. Wadą jej jest próba włączenia do treści ogromnej liczby terminów i zagadnień, wynikająca zresztą z potrzeby unowocześnienia dzieła przy spontanicznym rozwoju biologii molekularnej w ostatnich latach. Dlatego wiele zagadnień jest potraktowanych pobieżnie, lub nawet ogranicza się do definicji zjawiska, czy składnika. To oczywiście uniemożliwia systematyczne studiowanie, z drugiej jednak strony pozwala traktować materiał jako rozwinięty zbiór wiedzy hasłowej, co jest znacznie ułatwione przez obszerny i bardzo szczegółowy skorowidz rzeczowy. Dzieło jest przy tym względnie nowoczesne, gdyż cytowana na końcu literatura (ok. 500 pozycji) sięga roku 1984, a nawet pojedyncze pozycje dotyczą roku 1985.

Trzeba jednak wskazać na szczególnie obszernie i nowocześnie opracowane fragmenty dotyczące utleniania biologicznego wraz z pozyskiwaniem energii (35 str.) oraz chemizmu i energetyki fotosyntezy (65 str.). Szczegółowo i nowocześnie wydają się też być przedstawione aspekty wzrostu i rozwoju (110 str.) oraz ruchu (45 str.). W zakresie wym. zagadnień Czytelnik znajdzie głębsze potraktowanie treści oraz wiele nowych szczegółów, a więc w pełni nadają się one do wzbogacenia wiedzy w tym zakresie. Pozostałe zaś, jak np. podstawy regulacji biologicznej, czy metabolizm szczegółowy wprawdzie zawierają wiele szczegółów i terminów, a nawet przykładów, ale wymagałyby do pełnego zrozumienia literatury uzupełniającej. Część dotycząca przemiany materii jest ilustrowana licznymi wzorami i schematami, na ogół czytelnymi i dobrze objaśnionymi, ale nie zawsze nowoczesnymi. Natomiast część fizjologiczna zawiera liczne rysunki i wykresy uzupełniające w sposób pogładowy teorię.

W podsumowaniu pragnę wyrazić pogląd, że opiniowane dzieło ma wiele zalet, z których najważniejszą jest ogromna ilość nowego materiału i z tego względu należy ją polecić badaczom i studentom zaawansowanym w studiowaniu podstawowych nauk biologicznych. Niestety ma ona również wady polegające na nie w pełni systematycznym omawianiu opisywanych tematów.

Jerzy Kączkowski

„Methoden zur Pflanzenhormonanalyse”

Red. G. Sembdner, G. Schneider, K. Schreiber

Gustav Fischer Verlag, Jena, 1988, 296 str. 77 rysunków, 64 tabele.

Recenzowana monografia jest pracą zbiorową. Redaktorzy są pracownikami Instytutu Biochemii Roślin Niemieckiej Akademii Nauk w Halle/Saale; stamtąd również rekrutuje się większość autorów podrzdziałów, jakkolwiek znajdują się wśród nich też specjaliści z innych ośrodków NRD a także Czechosłowacji oraz (jeden) z ZSRR.

Książka ma układ metodyczny. Omówiono kolejno: ekstrakcję i oczyszczanie, chromatografię kolumnową, chromatografię cienkowarstwową i bibułową, chromatografię cieczową wysokociśnieniową, chromatografię gazową, biotesty oznaczania hormonów roślinnych, testy oznaczania substancji indukujących i wpływających na kwitnienie, metody immunologiczne, metody enzymatyczne, spektroskopię absorbcyjną, spektrofluorymetrię, spektroskopię masową, metody izotopowe. W kolejnych rozdziałach przedstawiono zarówno metody oznaczania najbardziej znanych endogennych regulatorów wzrostu, jak: auksyny, cytokininy, gibereliny, kwas absycynowy i etylen, jak również związków grupy kwasu jasmonowego, brasyinosterydów i poliamin. Każdy podrzdział kończy bibliografia przedmiotu. Na zakończenie całości, na 25 stronach, podano używane w książce skróty, a także wzory chemiczne hormonów oraz ich metabolitów i form związanych. W sumie książka omawia — skróto ale wszechstronnie — stosowane obecnie metody, zarówno fizykochemiczne jak biologiczne, oznaczania hormonów roślinnych.

W najnowszej literaturze światowej nie ma pozycji, która by tak całościowo obejmowała sprawę oznaczania endogennych, roślinnych regulatorów wzrostu. Należy się cieszyć, że książka ukazała się właśnie w kraju demokracji ludowej, co zwiększa jej dostępność dla polskiego czytelnika. „Methoden zur Pflanzenhormonanalyse” stanowi niezwykle cenną pozycję dla wszystkich interesujących się tą dziedziną, a jest ich wielu. Sądzę, że byłoby celowe jak najszybsze jej przetłumaczenie.

M. Bielińska-Czarnecka

„Elementy filozofii zjawiska biologicznego”

Piotr Lenartowicz

Wydawnictwo Apostołów Modlitwy, Kraków, 1986, 476 str.

Zjawiska biologiczne i organizmy żywe stanowią od dawna przedmiot refleksji filozoficznej. Zwykle dotyczą one przede wszystkim powstania życia i jego ewolucji. Autor większą wagę przywiązuje do analizowania zjawisk życiowych takich, jakie możemy obserwować obecnie. Stara się uchwycić istotę tych zjawisk w ich całościowości. „Całościowość” jest dla autora podstawową cechą organizmów żywych, u których cykl życiowy stanowi jednostkę procesów życiowych. W cyklu życiowym na szczególną uwagę zasługuje jego epigenetyczność, przechodzenie układów rozwojowych w układy funkcjonalne. Autor stara się starannie odróżnić zjawiska zachodzące w układach

biologicznych od zjawisk zachodzących w materii nieożywionej. W tym celu bardzo rozbudowuje system złożony z takich pojęć jak jednorodność, porządek, złożoność, informacja, hierarchiczność, celowość, przyczynowość, skutek itd., starając się pokazać ich swoisty sens w przypadku zjawisk życiowych. Stosuje rozwiniętą w duchu filozofii arystotelesowsko-tomistycznej kategoryzacji bytów i zjawisk posługując się terminami zaczerpniętymi z różnych dziedzin (biologia, filozofia, informatyka). Pojawiają się przy tym terminy, które robią wrażenie terminów biologicznych, chociaż w biologii nie są normalnie stosowane. Tak np. obok stosowanego w biologii terminu cechy adaptacyjne pojawiają się cechy identyfikacyjne, czy traumatyczne. Stosując tak przygotowany warsztat pojęciowo-terminologiczny autor analizuje ogromną ilość danych zaczerpniętych z wielu działów biologii takich jak embriologia, anatomia, ewolucjonizm, biochemia czy biologia molekularna, niejednokrotnie z oryginalnych prac eksperymentalnych. Czyni to zapewne chcąc mocno oprzeć swoje wywody na materiale źródłowym i będąc przekonany, że czytelnik sam do niego nie dotrze. Nie jestem jednak przekonany czy było to najszcześniejsze rozwiązanie ponieważ czytelnik nie znający biologii przynajmniej na poziomie uniwersyteckim nie będzie w stanie przedrzeć się przez spore partie książki, a już zupełnie ocenić poprawność wnioskowania autora. Z kolei czytelnik o przygotowaniu biologicznym czyta o wielu znanych sobie faktach, niejednokrotnie opisywanych zmienionym nieco językiem. Napotka przy tym szereg sformułowań co najmniej dyskusyjnych. Biologowi np. trudno mówić o częściach embrionów jako o prekursorach organów w tym samym sensie, co o aminokwasach jako prekursorach białek jak też rozdzielać układy funkcjonalne i rozwojowe w sposób sugerowany przez autora. Trudno zgodzić się na stawianie na jednej płaszczyźnie hipotezy pola morfogenetycznego i hipotezy „siły życiowej”, ponieważ pierwsza, w przeciwieństwie do drugiej, nadaje się do eksperymentalnej weryfikacji. Hipoteza pola magnetycznego tłumaczy tylko określony zbiór zjawisk biologicznych i jest ona komplementarna z innymi hipotezami tłumaczącymi morfogenezę. Niektóre zagadnienia genetyczne przedstawione są błędnie, ale trudno omawiać je tu szczegółowo.

Przewodnią myślą autora jest pokazanie, że zjawisk życiowych (cyklu życiowego) nie da się wytłumaczyć bez założenia istnienia „czynnika integrującego”. Upatruje go on w genomie, ale termin ten używany jest w innym znaczeniu niż w genetyce, zastępując raczej „duszę wegetatywną” Arystotelesa lub „siłę życiową”, chociaż autor traktuje genom jako byt materialny. Swoiste stosowanie terminów wziętych z biologii pozwala autorowi formułować zdania typu: „Teoria mutacji zakłada, że a) organizm składa się z dwóch elementów materialnych, fenotypu i genomu”, które wypowie niewielu biologów. Sądzę też, że niewielu zgodzi się ze stwierdzeniem, że plemnik nie jest żywy. Stwierdzenia tego typu są, jak mi się wydaje, wynikiem epistemologicznych i filozoficznych założeń autora, a nie „obiektywnymi” wnioskami wyciąganymi z materiału doświadczalnego. Same postulowanie „czynnika integrującego” nie wydaje się konieczne do interpretacji przedstawianych zjawisk i nie jest, jak sądzę zgodne z zasadą Ockhama, na którą autor często się powołuje.

P. Lenartowicz podjął się niewątpliwie bardzo ambitnego zadania przedstawienia i wyjaśnienia w sposób uogólniający bardzo obszernego materiału biologicznego stąd nic dziwnego, że trafiają się pewne błędy i nieporozumienia. Książka jest trudna, dla biologa często prowokująca w pozytywnym sensie. Bardzo pożyteczne jest w niej usystematyzowane przedstawienie historii poglądów na zjawiska życiowe, różnych hipotez i teorii, a także zwrócenie uwagi na błędy interpretacyjne popełniane przez biologów oraz ich, często naiwne, filozofowanie. Wielokrotnie przytacza autor przykłady antropomorfizacji w tłumaczeniu zjawisk życiowych, wydaje mi się jednak, że stosujący ją badacze, zwykle robią to świadomie, używając jej jako skrótu myślowego.

Niewątpliwie bardzo interesujące byłyby refleksje filozofa na temat prezentowanej książki, a zwłaszcza omówienie przedstawionego materiału w świetle innej niż arystotelesowsko-tomistyczna tradycji filozoficznej.

Andrzej Paszewski

SŁOWNICTWO

Komunikaty Komisji Słownictwa Biochemicznego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

I. Zalecenia dla Autorów

Zalecenia Komisji Słownictwa Biochemicznego obowiązujące Autorów przekazujących artykuły do druku w „Postęпах Biochemii” można znaleźć w następujących publikacjach:

1. Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne *, red. A. Morawiecki, PWN, Warszawa 1983.
2. Słownictwo witamin D. *Post. Biochem.*, 1983, **29**, 397–408.
3. Jednostki aktywności enzymatycznej. *Post. Biochem.*, 1983, **29**, 409–411.
4. Słownik nazw enzymów. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 95–205.
5. Zmiany w słownictwie enzymów. *Post. Biochem.*, 1986, **32**, 375.
6. Wybrane symbole wielkości i jednostek. Wykaz skrótów. *Post. Biochem.*, 1983, **29**, 412–413.
7. Zalecenia dotyczące pomiarów i przedstawienia danych równowag biochemicznych. *Post. Biochem.*, 1984, **30**, 487–499.
8. Słownictwo monosacharydów rozgałęzionych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 649–656.
9. Słownictwo monosacharydów nienasyconych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 656–661.
10. Skrócone nazwy łańcuchów oligosacharydowych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 662–672.
11. Słownictwo polisacharydów. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 672–677.
12. Symbole określające konformację łańcuchów polisacharydowych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 677–684.
13. Słownictwo określające konformację pięcio- i sześcioczłonowych form pierścieniowych monosacharydów i ich pochodnych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 684–690.

II. Wykazy skrótów i nazw potocznych

Komisja Słownictwa Biochemicznego przedstawia wykazy symboli grup chemicznych, skrótów nazw związków chemicznych i metod, oraz potocznych nazw buforów, które można stosować bez podania definicji.

(*Eur. J. Biochem.*, (1987), **167**, A10–11).

* Komisja Słownictwa przypomina, że obecnie obowiązuje termin „względna masa cząsteczkowa” zamiast dawniej stosowanego terminu „ciężar cząsteczkowy”.

Standardowe symbole grup chemicznych, nie wymagające definicji

Symbol	Nazwa
1	2
A ¹⁾ , Ado	adenozyna
Ac	acetyl
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	kwas asparaginowy
Asx	kwas asparaginowy lub asparagina (nie określone)
C ¹⁾ , Cyd	cytydyna
Cys lub Cys	cystyna (połowa)
Cys	cysteina
Dol	dolichol
Et	etyl
Fru	fruktoza
Gal	galaktoza
G ¹⁾ , Guo	gwanozyna
Glc	glukoza
GlcN	2-amino-2-deoksy-D-glukoza
GlcNAc	2-deoksy-2-N-acetyloamino-D-glukoza
Gln	glutamina
Glu	kwas glutaminowy
Glx	kwas glutaminowy lub glutamina (nie określone)
Gly	glicyna
His	histydyna
Hyl	hydroksylizyna
Hyp	hydroksyprolina
I ¹⁾ , Ino	inozyna
Ile	izoleucyna
Leu	leucyna
Lys	lizyna
Man	mannoza
Me	metyl
Met	metionina
N ¹⁾	nieokreślony nukleozyd
Neu	kwas neuraminowy
Orn	ornityna
P, p	fosforan
Phe	fenyloalanina
Pr	propyl
Pro	prolina
R ¹⁾	nieokreślony nukleozyd purynowy
Rib	ryboza
Ser	seryna
T ¹⁾ , Thd	rybozylotymina (nie tymidyna, którą symbolizuje dT ¹⁾ lub dThd
Thr	treonina
Trp	tryptofan
Tyr	tyrozyna

c.d. tabeli 1

1	2
U ¹⁾ , Urd	urydyna
Ψ ¹⁾ , Ψ rd	pseudourydyna (5-rybozylouracyl)
Val	walina
X ¹⁾ , Xao	ksantozyna
Xaa	nieokreślony aminokwas
Xyl	ksyloza
Y ¹⁾	nieokreślony nukleozyd pirymidynowy

¹⁾ należy używać wyłącznie na określenie nukleozydu, a nie zasady (w strukturach chemicznych). Można używać w sekwencjach kwasów nukleinowych dla opisanego porządku zasad przyłączonych do szkieletu cukrowo-fosforanowego „od lewego do prawego” (przyjmując wiązanie 3' - 5').

Tabela 2

Standardowe skróty pół-systematycznych i potocznych nazw, nie wymagające definicji

Skrót	Nazwa
1	2
ADP-Rib	adenozyno (5') difosfo (5)-β-D-ryboza
AMP, ADP i ATP ¹⁾	5'-mono-, di-, i trifosforan adenozyny
bp	pary zasad (base pairs)
cAMP, cykliczny AMP	3' - 5-monofosforan adenozyny
CD	dichroizm kołowy
CMP, CDP i CTP ¹⁾	5'-mono-, di-, i trifosforan cytydyny
CoA (lub CoASH)	koenzym A
CoASAc	acetylo-koenzym A
DEAE-celuloza	O-(dietyloaminoetylo)-celuloza
DNA, cDNA, mtDNA, nDNA	kwas deoksyrybonukleinowy, komplementarny DNA, mitochondrialny DNA, jądrowy DNA
EDTA	etylenodiaminotetraoctan
EGTA	kwas [(etylenobis(oksonitrylo))] tetraoctowy
ELISA	test immunoenzymatyczny, immunologiczny test na podłożu, sprzężony z enzymem (enzyme-linked immunoabsorbant assay)
EPR	paramagnetyczny rezonans elektronowy
ESR	spinowy rezonans elektronowy
FAD	dinukleotyd flawino-adeninowy
FMN	5'-fosforan ryboflawiny, mononukleotyd flawinowy
FPLC	szybka chromatografia cieczowa białek (fast protein liquid chromatography)
GLC	chromatografia gazowo-cieczowa
GMP, GDP i GTP ¹⁾	5'-mono-, di-, i trifosforan guanozyny
Hb, HbCO i HbO ₂	hemoglobina (odtlenowana), karboksyhemoglobina i oksyhemoglobina
HPLC	wysoko rozdzielcza chromatografia cieczowa (high performance liquid chromatography)
IEF	ogniskowanie izoelektryczne
IgA itp	immunoglobulina A itp
IMP, IDP i ITP ¹⁾	5'-mono-, di-, i trifosforan inozyny
kb	10 ³ zasad

c.d. tabeli 2

1	2
Mb, MbCO i MbO ₂	mioglobina, karboksymioglobina i oksymioglobina
MS	spektrometria masowa
NAD, NAD ⁺ , NADH	dinukleotydy nikotynoamido-adeninowy, jego forma utleniona i zredukowana
NADP, NADP ⁺ , NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynoamidowe-adeninowego, jego forma utleniona i zredukowana
NMN	mononukleotydy nikotynoamidowy
NMR	jądrowy rezonans magnetyczny
NOE	jądrowy efekt Overhausera (nuclear Overhauser enhancement)
ORD	dyspersja skręcalności optycznej
PAGE	poliakryloamidowa elektroforeza żelowa
P,	nieorganiczny fosforan
PP,	nieorganiczny pirofosforan
poly(A), itp	(3'-5') poli (kwas adenylowy), itp
RNA, hnRNA, mRNA,	kwas rybonukleinowy, heterogenny jądrowy RNA, informacyjny RNA, mitochondrialny RNA, jądrowy RNA, rybosomalny RNA, transportujący RNA
mtRNA, nRNA, rRNA, tRNA	
RNP	rybonukleoproteina
SDS	sól sodowa siarczynu dodecylu
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
TMP, TDP i TTP ¹⁾	5'-mono-, di-, i trifosforan rybozylotyminy ²⁾
UDPGlc	urydyno (5') difosfo (1)- α -D-glukoza
UMP, UDP i UTP ¹⁾	5'-mono-, di-, i trifosforan urydyny
XMP, XDP i XTP	5'-mono-, di-, i trifosforan ksantozyny

¹⁾ Na określenie odpowiedniego fosforanu deoksynukleotydu można używać przedrostka d, np dADP. W przypadku możliwej niejednoznaczności różne izomery mogą być oznaczane: 2'NMP, 3'NMP lub 5'NMP.

²⁾ Pochodne tymidyny, zawierające deoksyrybozę należy oznaczać odpowiednio: dTMP, dTDP, i dTTP.

Tabela 3

Potoczne nazwy buforów, nie wymagające definicji

Nazwa potoczna	Nazwa systematyczna	Nazwa handlowa
1	2	3
Aces	kwas 2-[(2-amino-2-oksoetylo) amino] etanosulfonowy	kwas <i>N</i> -(2-acetamido)-2-aminoetano-sulfonowy
Ada	kwas [(karbamoilometylo) imino] diocetowy	kwas <i>N</i> -(2-acetamido)-2-iminoocetowy
Bes	kwas 2-[bis(2-hydroksyetylo) amino] etanosulfonowy	kwas <i>N, N</i> -bis(2-hydroksyetylo)-2-aminoetano-sulfonowy
Bicine	<i>N, N</i> -bis(2-hydroksyetylo) glicyna	
Bistris	2 [bis(2-hydroksyetylo) amino]-2-(hydroksymetylo) propan-1, 3-diol	bis(2-hydroksyetylo) iminotris (hydroksymetylo) metan
Chaps	kwas 3-[(cholamidopropylo) dimetyloamoniol]-1-propanosulfonowy	
Hepes	kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetano-sulfonowy	kwas <i>N</i> -2-hydroksyetylopiperazyno- <i>N'</i> -2-etanosulfonowy
Hepps	kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynopropanosulfonowy	kwas <i>N</i> -2-hydroksyetylopiperazyno- <i>N'</i> -3-propanosulfonowy

c.d. tabeli 3

1	2	3
Mes	kwas 4-morfolinoetanosulfonowy	kwas 2-(<i>N</i> -morfolino) etanosulfonowy
Mops	kwas 4-morfolinopropanosulfonowy	kwas 2-(<i>N</i> -morfolino) propanosulfonowy
Pipes	kwas 1, 4-piperazynodietanosulfonowy	kwas piperazyno- <i>N</i> - <i>N'</i> -bis (2-etanosulfonowy)
Taps	kwas 3-{[2-hydroksy-1, 1-bis (hydroksymetylo) etylo]-amino}-1-propanosulfonowy	kwas 3-[tris (hydroksymetylo) metylo]-amino-propanosulfonowy
Tes	kwas 2-{[2-hydroksy-1, 1-bis (hydroksymetylo) etylo] amino} etanosulfonowy	kwas <i>N</i> -tris [hydroksymetylo]metylo-2-aminoetanosulfonowy
Tricine	<i>N</i> -[2-hydroksy-1, 1-bis (hydroksymetylo) etylo]-glicyna	<i>N</i> -tris (hydroksymetylo) metyloglicyna
Tris	2-1 amino-2-hydroksymetylopropan-1, 3-diol	tris (hydroksymetylo) aminometan

III. Propozycja dotycząca peptydów o nazwie angielskiej: growth factors

W porozumieniu z Komisją Słownictwa Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz po konsultacji z językoznawcą Komisja Słownictwa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego proponuje Kolegom:

1. termin **czynniki wzrostowe** traktować jako nazwę potoczną peptydów pobudzających wzrost komórek *in vitro*,
2. termin **czynnik wzrostu** stosować we wszystkich przypadkach omawiania konkretnych czynników wzrostu o w/w działaniu, podając w formie rzeczownikowej tkankę docelową (np. czynnik wzrostu nerwu, fibroblastów, czy tp.), a w formie przymiotnikowej podając tkankę pochodzenia (np. naskórkowy czynnik wzrostu, fibroblastyczny czynnik wzrostu i tp.), lub — jeśli Autor tekstu woli — pisząc: czynnik wzrostu z... (np. z płytek krwi, z fibroblastów i tp.).

ZJAZDY I KONFERENCJE NAUKOWE

Sprawozdanie z XXIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 9—11 września 1987, Białystok

XXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, był jednym z największych w jego trzydziestoletniej historii. Uczestniczyło w nim około 600 osób, w tym goście zagraniczni z ZSRR, Belgii i Austrii.

Wykład inauguracyjny pt.: „Przypuszczalna funkcja biologiczna struktur węglowodanowych występujących w krwinkach czerwonych” wygłosił Prof. Jerzy Kościelak.

Zjazd obradował w 10 sekcjach. Zorganizowano 9 sympozjów o następującej tematyce:

- „Biochemia nowotworów”
Organizator: Prof. Ryszard Farbiszewski
- „Procesy bioenergetyczne”
Organizator: Prof. Lech Wojtczak
- „Enzymy proteolityczne i mechanizmy proteolizy”
Organizator: Prof. Krzysztof Worowski
- „Metabolizm wapniowo-fosforanowy”
Organizator: Prof. Roman Lorenc
- „Struktura i funkcja błon biologicznych”
Organizator: Doc. Zofia Poremska
- „Biochemia kliniczna”
Organizator: Prof. Jan Prokopowicz
- „Procesy biotechnologiczne”
Organizator: Prof. Kazimierz Zakrzewski
- „Glikokoniugaty”
Organizator: Prof. Jerzy Kościelak
- „Badania biochemiczne w naukach rolniczych”
Organizator: Prof. Jerzy Kączkowski.

Obok wyżej wymienionych sympozjów zorganizowano sesję plakatową na tematy różne.

Łącznie przedstawiono 34 referaty sympozjalne oraz 391 komunikatów.

W ramach sympozjum pt.: „Biochemia nowotworów”, przedstawiono referat na temat udziału czynników wzrostowych i substancji agregujących płytki krwi w powstawaniu przerzutów nowotworowych oraz 41 komunikatów na temat różnych aspektów biochemicznych choroby nowotworowej.

Sympozjum pt.: „Procesy bioenergetyczne” było poświęcone różnym aspektom bioenergetyki. Wygłoszono 9 referatów przeglądowych oraz przedstawiono w formie komunikatów 26 prac eksperymentalnych.

W ramach sympozjum pt.: „Enzymy proteolityczne” wygłoszono referat na temat właściwości biologicznych produktów proteolizy oraz 20 komunikatów dotyczących aktywacji proteaz, inhibitorów proteolizy, proteaz roślinnych i bakteryjnych.

Sympozjum p.t.: „Metabolizm wapniowo-fosforanowy” było poświęcone metabolitom witaminy D, transportowi jonów wapniowych i fosforanowych przez błony biologiczne, patobiochemii zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej. W ramach tego sympozjum przedstawiono 30 komunikatów.

W ramach sympozjum p.t.: „Struktura i funkcja błon biologicznych” przedstawiono dwa referaty oraz 23 komunikaty na temat składu błon biologicznych, ich właściwości antygenowych i transportu metabolitów przez te błony.

Obrady sympozjum p.t.: „Biochemia kliniczna” koncentrowały się głównie wokół następujących zagadnień:

- biochemia krwinek czerwonych
- enzymologia kliniczna
- zaburzenia gospodarki lipidowej i miażdżycy
- diagnostyka biochemiczna zatruc
- patobiochemia choroby alkoholowej.

Łącznie przedstawiono jeden referat oraz 52 komunikaty.

Szczególne zainteresowanie wzbudziło sympozjum p.t.: „Procesy biotechnologiczne”. Przedmiotem referatów, komunikatów i dyskusji były teoretyczne podstawy biotechnologii i jej zastosowanie w działalności praktycznej, głównie w medycynie. W ramach tego sympozjum odbyła się sesja na temat mutagenyzy środowiskowej. Omówiono współczesne poglądy na temat molekularnych mechanizmów mutagenyzy, czynników mutagennych i ich biotransformacji. W ramach tego sympozjum przedstawiono 16 referatów i 48 komunikatów.

Sympozjum pt.: „Glikokoniugaty” było poświęcone glikoproteinom i glikolipidom oraz enzymom uczestniczącym w ich metabolizmie. Poświęcono tym problemom dwa referaty i 27 komunikatów.

Sympozjum pt.: „Badania biochemiczne w naukach rolniczych” obejmowało prezentację osiągnięć różnych dziedzin biochemii związanych z rolnictwem. Przedstawiono jeden referat i 33 komunikaty.

Pozostałe komunikaty, nie mieszczące się w tematyce wyżej wymienionych sympozjów, przedstawiono w ramach sesji plakatowych na tematy różne.

Obradom Zjazdu towarzyszyły wystawy sprzętu laboratoryjnego, odczynników i literatury biochemicznej.

Edward Bańkowski

Z DZIAŁALNOŚCI POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Nagrody

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyznał w roku 1987 nagrody za wyróżniające się osiągnięcia w dziedzinie biochemii:

NAGRODA im. JAKUBA KAROLA PARNASA — za najlepszą pracę doświadczalną w dziedzinie biochemii wykonaną w Polsce i opublikowaną w r. 1986:

— Lech Wojtczak, Anna Żółkiewska i Jerzy Duszyński z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie za pracę pt. „Energy-storage capacity of the mitochondrial proton-motivw force” opublikowaną w *Biochem. Biophys. Acta* 851, 313—321, 1986.

NAGRODA im. BOLESŁAWA SKARŻYŃSKIEGO — za najlepszy artykuł ogłoszony w roczniku 32 *Postępów Biochemii*:

— Jacek Kuźnicki z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie za pracę: „Fosforylacja miozyny in vive i in vitro” (*Post. Biochem.*, tom 32 Nr 1 i 2, 1986 r.).

NAGRODA im. WŁODZIMIERZA MOZOŁOWSKIEGO — dla młodych biochemików za prezentację prac na XXIII Zjeździe PTBioch. w Białymstoku — wrzesień 1987 r.:

— Anna Filipek z Instytutu Biol. Dośw. im. Nenckiego w Warszawie za pracę: „Właściwości białka wiążącego wapń (CaBP) z komórek raka wysiękowego Ehrlicha”

— Renata Jasińska z Inst. Biol. Dośw. im. Nenckiego w Warszawie za pracę „Dekarboksylacja liposomalnej fosfatydyloseryny przez mitochondria wątroby szczura i raka Ehrlicha”

— Piotr Jasicki z Z-du Genetyki Molekularnej Inst. Bioch. Uniwersytetu Łódzkiego za pracę: „Rozdział platyny między subfrakcje komórkowe limfocytów krwi obwodowej świni po inkubacji z cis i transdiaminodichloro-platyną (II)”

— Jacek Borkowski z Z-du Biochemii AWF Wrocław za pracę „Inhibitor trypsyny z moczu powysiłkowego”

— Maria Kłodyńska z Puławskich Z-dów Przem. Bioweter. pt. „Tworzywo poliamidowe jako nośnik do immobilizacji białek”.

*Prezes Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
doc. dr hab. Zofia Porembka*

Nakładem i staraniem Komitetu Biotechnologii przy Prezydium Polskiej Akademii Nauk, a także Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN i Ośrodka Informacji Naukowej PAN, wydano w grudniu 1988 r. pierwsze w Polsce czasopismo poświęcone biotechnologii, kwartalnik

Biotechnologia — Przegląd Informacyjny

Pismo adresowane jest przede wszystkim do środowisk naukowych zainteresowanych problematyką biotechnologiczną i do pracowników przemysłu biotechnologicznego. Swą ofertę wydawniczą kierujemy zarówno do teoretyków jak i do praktyków, a także do wszelkich osób pasjonujących się biotechnologią.

Periodyk wydawany będzie 4 razy w roku w objętości 48 stron formatu A-4, w nakładzie 500 egz. Właśnie z powodu niskiego nakładu najlepszym sposobem zapewnienia sobie zakupu pisma jest prenumerata w Oddziałach ORW PAN. Zamówienia można składać na adres redakcji:

Biotechnologia — Przegląd Informacyjny

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

61-704 Poznań, Noskowskiego 12

Cena egzemplarzowa jednego numeru wynosi 450 zł., w prenumeracie półrocznej 900 zł., a w rocznej 1800 zł.

W kolejnych najbliższych numerach będą omówione m.in. następujące bloki tematyczne:

- * bioinformatyka,
- * mikrobiologia przemysłowa,
- * medycyna,
- * rolnictwo,
- * synteza i mutageneza.

**IV Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki
odbędzie się w 1990 r. w Poznaniu.**

Blizsze informacje można uzyskać pisząc na adres:

**Komitet Organizacyjny IV Ogólnopolskiej Konferencji
Biologii Komórki
Katedra Histologii i Embriologii, 60-671 Poznań
ul. Świącickiego 6
tel. 6999-181 w 557**

CONTENTS

ARTICLES:

J. Kwiatkowska — G proteins as „universal connection” in signal transmission from the membrane receptors on their effectors (Dep. of Biochemistry, School of Medicine, Wrocław)	123
T. Jakubowicz — Mechanism and function of ribosomal protein S6 phosphorylation in Eukaryotes (Dept. of Molecular Biology, Inst. of Mikrobiology, University of M. Curie-Skłodowska, Lublin)	131
L. Szmigiero — Topoisomerase II as a cellular target of some anticancer drugs (Dept. of General Chemistry, Inst. of Physiology and Biochemistry, School of Medicine, Łódź)	147
J. Siedlecki — Eucaryotic DNA polymerases (Dept. of Cell Biology and Experimental Therapy, Cancer Center of the M. Curie-Skłodowska Institute, Warszawa)	153
A. Sieroń, J. Lewin-Kowalik — Nerve growth factor, chemical structure and biological function (Dept. of Physiology, Silesian Medical School, Katowice)	173
Z. Pawłowska, C. Cierniewski, J. Krzesłowska, W. Koziolkiewicz — Glycoproteins of platelet membrane and their role in receptor activity of blood platelets (Dept. of Biophysics, Inst. of Physiology and Biochemistry, Medical School, Łódź)	183
J. J. Tomaszewski, H. Donica — Proteoglycans: Structure and function (Dept. of Clinical Biochemistry and Environmental Toxicology, Medical Academy, Lublin)	209
B. Wiłkomirski — Phylogenetic precursors of sterols (Dept. of Plant Systematics and Geography, Inst. of Botany, University of Warsaw)	229

BOOK REVIEWS:

„Lehrbuch der Pflanzenphysiologie” — E. Libbert	241
„Methoden zur Pflanzenhormonanalyse”	242
„Elementy Filozofii”	242

NOMENCLATURE:

Polish Biochemical Nomenclature	245
---	-----

SCIENTIFIC MEETING

Annual Meeting of the Polish Biochemical Society, Białystok, 1987	252
---	-----

ACTIVITY OF THE POLISH BIOCHEMICAL SOCIETY

SPIS TREŚCI

ARTYKUŁY:

J. Kwiatkowska — Białka G jako „uniwersalny łącznik” w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы	123
T. Jakubowicz — Mechanizm i znaczenie fosforylacji białka rybosomowego S6 u Eukaryota	131
L. Szmigiero — Topoizomeraza II jako komórkowy receptor niektórych leków przeciwnowotworowych	147
J. Siedlecki — Polimerazy DNA komórek wyższych eukariontów	153
A. Sieroń, J. Lewin-Kowalik — Czynniki wzrostu nerwu, budowa chemiczna i znaczenie biologiczne	173
Z. Pawłowska, C. Cierniewski, J. Krzesłowska, W. Koziołkiewicz — Glikoproteiny błony płytkowej i ich rola w aktywności receptorowej płytek krwi	183
J. J. Tomaszewski, H. Donica — Struktura i funkcja proteoglikanów	209
B. Wiłkomirski — Filogenetyczne prekursorzy steroli	229

RECENZJE:

„Lehrbuch der Pflanzenphysiologie” — E. Libbert (J. Kączkowski)	241
„Methoden zur Pflanzenhormonanalyse” — Praca zbiorowa (M. Bielińska-Czarnecka)	242
„Elementy filozofii zjawiska biologicznego” — P. Lenartowicz (A. Paszewski)	242

SŁOWNICTWO:

Komunikaty Komisji Słownictwa Biochemicznego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	245
---	-----

ZJAZDY I KONFERENCJE NAUKOWE:

Sprawozdanie z XXIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 1987 (E. Bańkowski)	250
--	-----

Z DZIAŁALNOŚCI POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO:

Nagrody	252
-------------------	-----

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 omawiając 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 obejmuje zatem prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB). Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanej przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) — podane na następujących przykładach:

- 1 Hildenbrandt G.R., Arensen N.N., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, 631, 499-502.
- 2 Bosteck C.J., Sumner A.T., (1978), *The Eukariotic Chromosome*, str. 233-268; North-Holland, Amsterdam.
- 3 Norbeth T., Piscator M., (1979), w *Handbook on the Toxicology of Metals* (red. Friberg L., Nordberg G.F., Vonk V.B.), str. 541-553; Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- 4 De Ley J., Kersters., (1975), w *Comprehensive Biochemistry*, (red. Florin M., Stotz E.H.), tom 29 B, str. 1-77; Elsevier, Amsterdam.
- 5 Franks N.P., Lieb W.R., (1981), w *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, tom 7 (red. Knight C.G.), str., 243-272; Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

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 ołówkiem) 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 obejmujące 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 oznaczyć na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i pierwszym słowem tytułu oraz wskazaniem „góra” i „dół” (ółówkiem). 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.

Warunki prenumeraty

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 PKO BP XV Oddział w Warszawie Nr 1658-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztową 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 7. Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

Post. Bioch., 34 z. 3, s. 121—256

Indeks 36969