

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 42, NR 4, 1996

Tadeusz Reichstein — Wspomnie- nia . . . . .	318
Choroby wywołane przez priony .	320
Rejon lizy faga $\lambda$ . . . . .	331
Antygeny zgodności tkankowej MHC II . . . . .	340
Transport enzymów lizosomalnych — receptory M6P . . . . .	350
Kwas arachidonowy . . . . .	357
Eikozanoidy . . . . .	363
Komunikat Komisji Słownictwa .	369
Roczny spis treści . . . . .	370

***Kwartalnik „Postępy Biochemii”  
wydawany z pomocą finansową  
Komitetu Badań Naukowych***

<http://rcin.org.pl>

## WYDAWCA

Editor  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
Polish Biochemical Society  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa  
Poland

Drukarnia Naukowo-Techniczna  
Mińska 65  
03-828 Warszawa

## REDAKCJA

Editorial Board  
REDAKTOR NACZELNY  
Editor in chief  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 31-24-03  
REDAKTORZY  
Editors  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
tel. 659-70-72 w. 3234  
ANNA SZAKIEL  
tel. 23-20-46  
JOLANTA GRZYBOWSKA  
tel. 13-05-15  
BARBARA ZARZYCKA  
tel. 659-85-71 w. 332

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
PIOTR CEGŁOWSKI  
(Warszawa)  
JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA  
(Toruń)  
ANNA INGLÓT  
(Wrocław)  
WITOLD JACHYMCZYK  
(Warszawa)  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
(Warszawa)  
JOANNA STROSZNAJDER  
(Warszawa)  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
(Warszawa)

## ADRES REDAKCJI

Address  
REDAKCJA KWARTALNIKA  
„POSTĘPY BIOCHEMII”  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa  
tel. (2) 659-85-71 w. 441  
fax: (22) 22-53-42

## SPIS TREŚCI CONTENTS

- Tadeusz Reichstein — Noblista z Włocławka — Wspomnienie**  
Tadeusz Reichstein — the Nobelwinner from Włocławek — Obituary . . . . . 318
- Pasażowalne amyloidozy mózgowie czyli choroby wywołane przez priony: czy struktura czynnika *scrapie* jest już rzeczywiście znana?**  
Transmissible cerebral amyloidoses or prion diseases: is the structure of the infectious agent really understood?  
PAWEŁ P. LIBERSKI, JOLANTA BRATOSIEWICZ . . . . . 320
- Rola białek kodowanych przez faga  $\lambda$  w destrukcji bakteriowej ściany komórkowej i kontroli czasu lizy**  
Role of bacteriophage  $\lambda$ -proteins in destruction of bacterial cell wall and the control of lysis timing  
SABINA KĘDZIERSKA, ALINA TAYLOR . . . . . 331
- Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy II**  
Structure and function of the MHC class II molecules  
BOGDAN FALKIEWICZ, BOGDAN LIBEREK . . . . . 340
- Wewnątrzkomórkowy transport enzymów lizosomalnych — Rola receptorów mannozo-6 fosforanu**  
Mannose-6 phosphate receptors in intracellular transport of lysosomal enzymes  
BARBARA CZARTORYSKA . . . . . 350
- Kwas arachidonowy w fizjologii i patologii tkanki nerwowej**  
Arachidonic acid in physiology and pathology of nervous tissue  
LUDMIŁA ŻYLIŃSKA, LILLA LACHOWICZ . . . . . 357
- Eikozanoidy — mózgowie przekaźniki sygnałów**  
Eicosanoides — brain's signal transducers  
LILLA LACHOWICZ, LUDMIŁA ŻYLIŃSKA . . . . . 363
- Komunikat Komisji Słownictwa**  
Report of the Nomenclature Commission . . . . . 369
- Roczny spis treści . . . . . 370**

## Tadeusz Reichstein — noblista z Włocławka

### Wspomnienie

W dniu 1 sierpnia 1996 roku zmarł w Bazylei profesor Tadeusz Reichstein, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, członek honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Tadeusz Reichstein urodził się 20 lipca 1897 roku we Włocławku, jako najstarszy syn Izydora Reichsteina — chemika i przemysłowca oraz Gustawy z domu Brockman. Były to powszechnie poważane dwie rodziny żydowskie, spośród wielu osiadłych od stuleci na Kujawach. Bardzo silne więzi rodziców Tadeusza z krajem ich urodzenia przejawiały się między innymi i tym, że — mieszkając już w Szwajcarii — po odzyskaniu przez Polskę niepodległości przyjęli obywatelstwo polskie i pozostali polskimi obywatelami. Imię Tadeusz, zostało nadane profesorowi na cześć Tadeusza Kościuszki, a na pytanie jak trzeba określić jego narodowość, za kogo się uważa, profesor Reichstein odpowiadał: „Czuję się Szwajcarem, polsko-żydowskiego pochodzenia”.

Kiedy Tadeusz miał 8 lat, jego ojciec przeniósł swoją rodzinę do Szwajcarii. Tadeusz Reichstein kształcił się tam i dorastał. Ukończył studia chemiczne na Politechnice w Zurychu i doktoryzował się w roku 1922 u wybitnego chemika, Hermanna Staudingera, późniejszego laureata Nagrody Nobla. Tadeusz Reichstein pozostał związany z Politechniką w Zurychu aż do 1938 roku. Przedmiotem początkowej działalności badawczej w Politechnice w Zurychu były związki warunkujące aromat kawy. Okazało się, że substancji takich jest bardzo wiele i trudno byłoby wyizolować lub zsyntetyzować kilka takich, których mieszanina imitowałaby aromat kawy naturalnej. Wielkim sukcesem natomiast zakończyły się podjęte przez Reichsteina próby opracowania chemicznej syntezy witaminy C. Jako materiał wyjściowy zastosowano glukozę. Po wielu próbach Reichsteinowi wprawdzie udało się otrzymać syntetyczną witaminę C, ale z bardzo niską wydajnością i przy wysokich kosztach. By je obniżyć należało znacznie zwiększyć wydajność syntezy. Dla chemika najtrudniejszym zadaniem było przeprowadzenie stereochemicznej przemiany sorbitolu w odpowiednią formę sorbozy — bezpośredniego prekursora witaminy C. Tadeusz Reichstein wpadł na pomysł, aby do tej przemiany wykorzystać specyficzny enzym produkowany przez bakterie żyjące w przewodzie pokarmowym muchy. Szczegółową procedurę syntezy opublikował on w 1934 roku. Jej zastosowanie zmniejszało koszty produkcji witaminy C aż tysiąc-krotnie! Pozwoliło to na obniżenie ceny 1 kilograma witaminy C z 13 tysięcy dolarów do 14 dolarów. Procedura wprowadzona przez Reichsteina przyniosła mu zasłużoną sławę i jest do dziś stosowana z małymi modyfikacjami.

Za radą przyszłego noblisty Leopolda Rużicki pod-

jął Tadeusz Reichstein w 1929 roku próby wyizolowania z kory nadnerczy biologicznie czynnego związku — jednego, jak wówczas myślano — niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Wieloletnie badania doprowadziły do wydzielenia z kory nadnerczy niewielkich ilości aż 29 związków rozpuszczalnych w tłuszczach, które w swojej cząsteczce zawierały pierścień sterydowy. Swe badania w tej dziedzinie od 1938 roku kontynuował Reichstein w Bazylei jako profesor zwyczajny i dyrektor Instytutu Farmaceutycznego tamtejszego Uniwersytetu.

W końcu lat trzydziestych już trzy zespoły badawcze zajmowały się identyfikacją i ustalaniem chemicznej struktury steroidowych hormonów nadnerczy. Były to oprócz zespołu Tadeusza Reichsteina w Szwajcarii dwie grupy badaczy amerykańskich. Reichstein stopniowo izoluje i identyfikuje kolejne hormony z kory nadnerczy. Próbuje je też chemicznie syntetyzować. Pierwszą syntezę deoksykortykosteronu przeprowadził Reichstein, zanim jeszcze ten związek był przez niego wykryty w ekstraktach kory nadnerczy. Prócz deoksykortykosteronu wykrywa on także kortyzon i aldosteron. Syntetyczny kortyzon otrzymany przez Reichsteina został podany pacjentom z chorobą reumatoidalną w roku 1948. Skutki tego odkrycia stały się rewolucyjne dla medycyny. Komitet Nagrody Nobla uznał w 1950 roku, że nagrodą w dziedzinie medycyny i fizjologii należy uhonorować trzech uczonych: Tadeusza Reichsteina i dwóch Amerykanów: Edwarda Kendalla i Philipa Hencha za badania nad hormonami sterydowymi nadnerczy.

Przez następnych 17 lat, pod kierunkiem noblisty Reichsteina w Bazylei rozwikłano wiele dalszych problemów związanych z chemią hormonów sterydowych nadnerczy oraz chemią glikozydów.

W roku 1967 profesor Reichstein przeszedł na emeryturę z imponującym dorobkiem naukowym obejmującym ponad 630 publikacji i 150 przewodów doktorskich, których był promotorem. Mógł więc odpoczywać jako człowiek zasłużony. Jednak, jako amator botanik, zajął się z upodobaniem badaniem paproci. Rychło stał się w tej dziedzinie ekspertem światowym. Do 1994 roku opublikował prawie 100 prac z pteridologii, stale pracując w tej dziedzinie. Mając 98 lat uczony przesłał 4 dalsze prace do czasopism botanicznych. Był to więc fenomen światowy.

Ale to nie wszystko. Profesor Tadeusz Reichstein znany był ze swojej nadzwyczajnej skromności i szlachetnej dobroczynności. Opiekował się wieloma osobami, fundując im stypendia, w tym i kilku stypendystom z Polski. Jego osobowość była niezwykła i urzekająca ludzi, którzy się z Nim zetknęli.

W roku 1995 profesor Tadeusz Reichstein został wybrany przez Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego honorowym członkiem Towarzystwa. Dyplom honorowego członka Towarzystwa wraz z bukietem róż został wręczony profesorowi Reichsteinowi w Bazylei przez profesora Witolda

Filipowicza. Profesor Reichstein był niezwykle wzruszony tym wyróżnieniem, które poczytywał za zaszczyt. Wspominał kraj swego urodzenia z ogromnym wzruszeniem i serdecznością.

Z wielkim żalem żegnamy profesora Tadeusza Reichsteina.

*Polskie Towarzystwo Biochemiczne*

**Uprzejmie zawiadamiamy PT Koleżanki i PT Kolegów  
o przeniesieniu siedziby Zarządu Głównego  
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego  
na teren Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego  
pokój 632 i 633**

**Obecny adres:**

**Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
Tel. bezpośredni 658 20 99  
Tel. przez centralę 659 85 71 w. 352  
Fax 22 53 42**

**Dyżury biura Zarządu odbywać się będą jak dotychczas  
we wtorki w godz 12-18**

## Pasażowalne amyloidozy mózgowe czyli choroby wywołane przez priony: czy struktura czynnika *scrapie* jest już rzeczywiście znana?

### Transmissible cerebral amyloidoses or prion diseases: is the structure of the infectious agent really understood?

PAWEŁ P. LIBERSKI<sup>1,2</sup>  
JOLANTA BRATOSIEWICZ<sup>2</sup>

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Amyloid w pasażowalnych amyloidozach mózgowych
- III. Mutacje w genie białka prionu korelują z fenotypem CJD, GSS i FFI
- IV. Badania na zwierzętach transgenicznym
- V. PrP jako amyloid: koncepcja pasażowalnych amyloidoz mózgowych
- VI. Co pozostało?

#### I. Wstęp

Dwanaście ofiar, poniżej 30 roku życia, zmarłych na rzadki zespół otępienny tzw. *chorobę Creutzfeldta-Jakoba* (CJD) sugeruje, że encefalopatia gąbczasta krów (choroba szalonych krów; BSE) zainfekowała ostatecznie człowieka [1]. Panika, która wybuchła z tego powodu spowodowała, że grób jednej z ofiar był głęboki na 9 stóp a nie jak zwykle na 6 zaś grabarze zostali wyposażeni w ochronne ubrania i rękawice chirurgiczne. Nie po raz pierwszy choroby wywołane przez priony, do których należy CJD i BSE, poruszyły media. Poprzednio — gdy w 1985 roku brytyjska telewizja podała sensacyjną wiadomość iż chory, który zmarł prawdopodobnie na CJD został zakażony podczas podawania hormonu wzrostu wyizolowanego z przysadek człowieka — wśród biorców hormonu i lekarzy wybuchło przerażenie. U ludzi przyjmujących hormon wzrostu nie obserwowano jednak epidemii CJD. Co stanie się teraz nie wiadomo. Młodzi ludzie

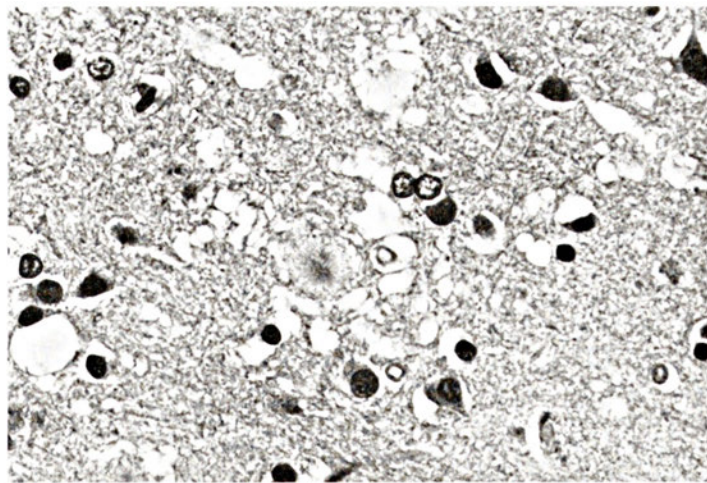
#### Contents:

- I. Introduction
- II. Amyloid in transmissible brain amyloidoses
- III. Mutations in the gene for PrP correlate with the phenotypic expression of CJD, GSS and FFI
- IV. Transgenic studies
- V. PrP as the amyloid: a concept of transmissible brain amyloidoses
- VI. What remains?

umierający na CJD w Wielkiej Brytanii i Francji (jeden przypadek) chorują na tzw. wariant (vCJD) tej choroby. Charakteryzuje się on nieco odmiennym obrazem klinicznym (długi przebieg, dysestezje jako objaw wiodący, brak charakterystycznego obrazu EEG oraz otępienie jedynie w późnym okresie choroby) oraz neuropatologicznym (bardzo liczne blaszki amyloido-we; ang. *florid plaques*, otoczone wieńcem wakuoli) (Ryc. 1). Identyczny obraz uzyskano po inokulacji makaków BSE [2]. Istnieje zatem bezpośredni dowód eksperymentalny, że BSE przenosi się na naczelnę powodując zmiany neuropatologiczne identyczne z tymi stwierdzanymi u człowieka.

CJD i BSE należy do tzw. pasażowalnych amyloidoz mózgowych (inne nazwy to podostre encefalopatie gąbczaste lub tzw. choroby wywołane przez priony, *prion diseases*). Są one wywołane przez czynnik infekcyjny różnie określane terminami „wirus powolny”, „prion” lub „wiriono” dla odróżnienia go od „zwykłych” wirusów i wiroidów. Czynnik ten, w opinii autora, nie został dotąd w pełni scharakteryzowany. Poza CJD i BSE, do grupy tych chorób należą: kuru, i choroba Gerstmann-Strauslera-Scheinkera (GSS) oraz śmiertelna rodzinna bezsenność (*fatal familial insomnia, FFI*) u człowieka, naturalna *scrapie* u owiec, kóz i muflonów, pasażowalna encefalopatia nerek

<sup>1</sup> Prof. dr n. med. Laboratorium Mikroskopii Elektronowej i Neuropatologii, Samodzielnej Pracowni Biologii Nowotworów, Katedry Onkologii A.M. ul. Paderewskiego 4, 93-509 Łódź <sup>2</sup> mgr Pracownia Mikroskopii Elektronowej Zakładu Patomorfologii, Centrum Zdrowia Matki Polki



Ryc. 1 Typowa blaszka amyloidowa z mózgu chorego na wariant choroby Creutzfeldta-Jakoba. Zwracają uwagę wakuole promieniście otaczające blaszkę. Dzięki uprzejmości dr Jamesa Tronside'a, Edynburg, Szkocja.

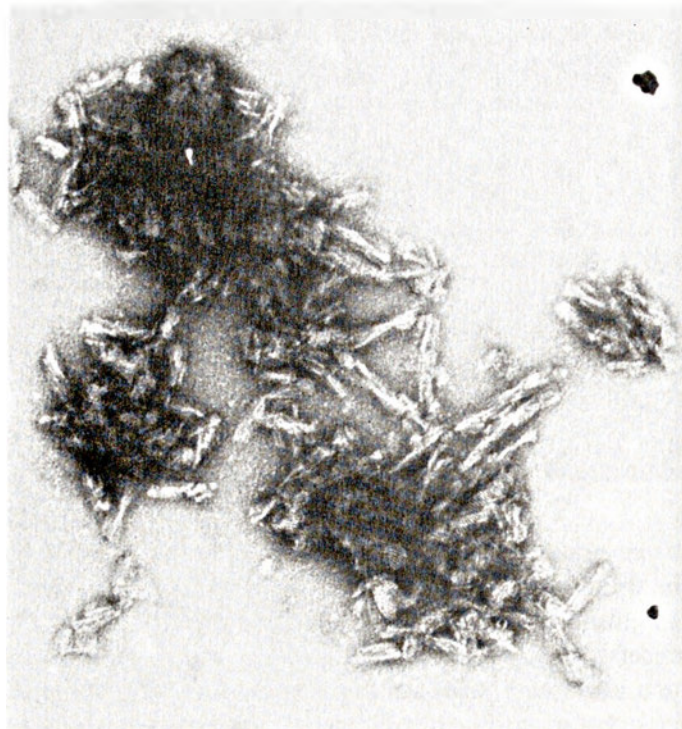
(*transmissible mink encephalopathy*), przewlekła choroba wyniszczająca (*chronic wasting disease, CWD*) u kilku gatunków jeleni w stanie Madison w USA, wreszcie encefalopatia gąbczasta kotów i encefalopatie gąbczaste u kilku gatunków antylopa, geparda, pumy, ocelota i tygrysa w ogrodach zoologicznych Wielkiej Brytanii. Niepasażowalne amyloidozy mózgowe to choroba Alzheimera i jej pochodne.

## II. Amyloid w pasażowalnych amyloidozach mózgowych

Zjawiskiem osiowym w patogenezie wszystkich amyloidoz, włączając pasażowalne amyloidozy mózgowe, jest synteza i przetwarzanie molekularnie odmiennego prekursora amyloidu, który następnie odkłada się w tkankach mózgu [3-5]. Terminem „*amyloid*” określa się grupę molekularnie odrębnych białek (A $\beta$ , PrP, gelsolina, transthyretyna, cystatina C), najczęściej glikozylowanych, posiadających wspólną konformację  $\beta$ -faldową i związane z nią właściwości histochemiczne i ultrastrukturalne. Należą do nich: dwulomność w świetle spolaryzowanym po zabarwieniu czerwienią Congo, charakterystyczna żółtozielona fluorescencja po zabarwieniu tioflawiną S oraz formowanie włókien (*fibers*) utworzonych z 2-4 bn włókienek (*fibrils*).

Amyloid w pasażowalnych amyloidozach mózgowych, *prion protein* (PrP) o ciężarze 27-30 kDa, PrP 27-30, został po raz pierwszy zidentyfikowany we frakcjach uzyskanych z homogenatów mózgow chomików eksperymentalnie zakażonych *scrapie* [6]. W nomenklaturze grupy Stanleya B. Prusiner'a z Uniwersytetu Kalifornijskiego, San Francisco, nazwa „*prion*” odpowiada nazwie „czynnika *scrapie*” [7-10]. PrP 27-30 jest produktem ograniczonej proteolizy większego białka prekursorowego, PrP 33-35<sup>Sc</sup> (33-35 kDa; sc, od *scrapie*) [11-13]. Dla CJD lub GSS można używać analogicznych terminów PrP<sup>CJD</sup> lub PrP<sup>GSS</sup>. Gen kodujący PrP<sup>Sc</sup> (*PRNP*; od *prion protein*; akronim *PRP*, od *proline-rich protein* był już „zajęty”) zlokalizowany jest u człowieka na chromosomie 20, a u myszy

na chromosomie 2 (u myszy gen ten nosi nazwę *Prn-p*, [11, 14]. Geny dla PrP scharakteryzowano dla wielu gatunków ssaków w tym owiec [15], krów [16], świni domowej [17] naczelnych [18, 19] oraz torbaczy [20]. Istnieją analogi tego genu u ptaków, *Drosophila* i nicienia *C. elegans* [21-23]. Gen ten składa się, w zależności od gatunku, z dwóch lub trzech eksonów (u człowieka z dwóch); cała sekwencja kodująca białko (otwarta rama odczytu: *open reading frame*, ORF) jest zawarta w drugim (lub trzecim) eksonie [11]. PrP 33-35<sup>Sc</sup> nie jest jednak pierwotnym produktem tego genu; jest nim białko PrP 33-35<sup>C</sup> (c, od *cellular*), o sekwencji aminokwasów identycznej z PrP<sup>Sc</sup> [11-13]. PrP<sup>C</sup>, w wyniku niezidentyfikowanych, prawdopodobnie konformacyjnych [24-27], modyfikacji postranslacyjnych, zostaje zmodyfikowane do PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> człowieka składa się z 253 aminokwasów i wykazuje wysoki stopień homologii z PrP innych gatunków ssaków [23]. Jak wspomniano, sekwencja aminokwasów PrP<sup>C</sup> i PrP<sup>Sc</sup>, oraz wszystkie modyfikacje postranslacyjne, włączając obecność C-końcowej „kotwicy” utworzonej z fosforylowanego glikolipidu (GPI, *glycophospholipid inositol anchor*) [28-29], są identyczne, natomiast białka te różnią się niektórymi własnościami fizykochemicznymi; między innymi w wyniku trawienia proteinazą K w obecności detergentu, PrP<sup>C</sup> ulega całkowitej zaś PrP<sup>Sc</sup> jedynie częściowej proteolizie uwalniając rdzeń PrP 27-30 [12-13]. Konwersja PrP<sup>C</sup> w PrP<sup>Sc</sup> odbywa się na nieokreślonym etapie poprzez transport nowo syntetyzowanego PrP<sup>C</sup> na powierzchnię komórki, gdzie staje się ono dostępne dla PIPLC (*phosphoinositol-specific phospholipase C*), a następnie do lizosomów [30]. W badaniu elektronomikroskopowym homogenatów mózgu, PrP 27-30 uwidacznia się jako tzw. „włókienka towarzyszące *scrapie*” (SAF, *scrapie associated fibrils*) lub *prion rods*, których struktura spełnia wyżej wymienione kryteria włókien amyloidu [31-33] (Ryc. 2). Badania konformacji PrP<sup>C</sup> i PrP<sup>Sc</sup> wykazały, że PrP<sup>C</sup> w swojej strukturze trzeciorzędowej zawiera trzy  $\alpha$ -helisy zaś PrP<sup>Sc</sup> przewagę obszarów  $\beta$ -faldowych [24-27, patrz niżej].



**Ryc. 2** Liczne włókienka towarzyszące scrapie (*scrapie-associated fibrils*) wyizolowane z mózgow chomików zakażonych szczepem 263K scrapie. Liberski P.P., Brown P. i Gajdusek D.C., Barwienie negatywowe kwasem fosforowolframowym. Powiększenie, x 42 000.

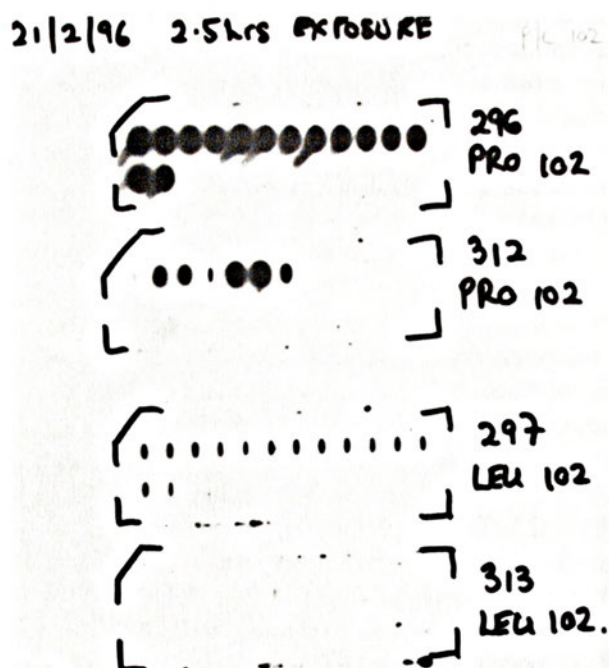
### III. Mutacje w genie białka prionu korelują z fenotypem CJD, GSS i FFI

Pomimo iż PAM są wywołane przez dotychczas niezidentyfikowany czynnik zakaźny, 10-15% przypadków CJD oraz, *ex definitione*, wszystkie przypadki GSS i FFI występują rodzinnie dziedzicząc się autosomalnie dominująco [34-36]. Z klasycznych badań Dickinsona i wsp. [37-38] w Edynburgu wiadomo, że okres inkubacji (a zatem replikacja) czynnika *scrapie* znajduje się pod ścisłą kontrolą genu *Sinc* (od *shorter incubation period*) tożsamego z *Prn-p* (analog genu *PRNP* u człowieka [39]. Gen dla PrP (*PRNP*) u człowieka stał się zatem oczywistym celem poszukiwań zmian ko-segregujących z fenotypową ekspresją choroby. Pierwsza mutacja wykryta w obrębie *PRNP* była mutacją kodonu 102 stwierdzona w GSS i prowadząca do substytucji prolina leucyną [40] (Ryc. 3). Mutacje te ( $Leu^{102}$ ) wykryto w wielu rodzinach GSS na całym świecie [41-49] (łącznie z oryginalną austriacką rodziną, w której po raz pierwszy opisano ten zespół w 1936 r. [50]). W niezwyklej rodzinie (*Indiana kindred*) z GSS ze stanu Indiana, USA [51], charakteryzującej się obecnością typowych dla choroby Alzheimera, tau-pozytywnych dystroficznych neurytów (patrz niżej) współwystępujących ze zmianami specyficznymi dla GSS), występuje mutacja kodonu

**Ryc. 3** Wzór prążków po reakcji PCR i dot blot oraz hybrydyzacji z wyznakowanymi radioaktywnie sondami specyficznymi dla formy prawidłowej (Pro) i zmutowanej (Leu) kodonu 102. Obecne są intensywne prążki na filtrach inkubowanych z sondami specyficznymi dla typu dzikiego; na filtrach inkubowanych z sondami specyficznymi dla typu zmutowanego prążki są słabe lub ich brak.

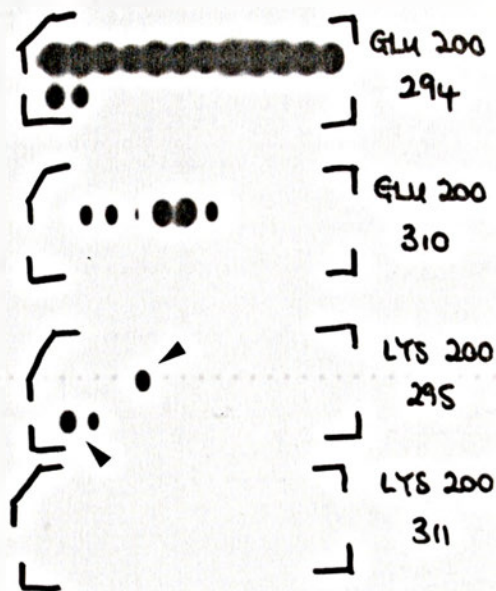
198 prowadząca do substytucji fenyloalaniny seryną zaś w podobnej fenotypowo rodzinie ze Szwecji występuje mutacja kodonu 217 prowadząca do substytucji kwasu glutaminowego arginina [52-53].

Mutacje w obrębie genu dla PrP (*PRNP*) wykryto także w rodzinnych przypadkach CJD [54-58, 34]. Mutację kodonu 200 prowadzącą do substytucji glutaminy lizyną (Ryc. 4) wykryto we wszystkich trzech ogniskach endemicznej CJD: w Izraelu u Żydów Stefardyjskich pochodzenia libijskiego ("*a wandering Jew of the Diaspora*"; [59-61]), w Czechosłowacji





23/2/96 3hr EXPOSURE.



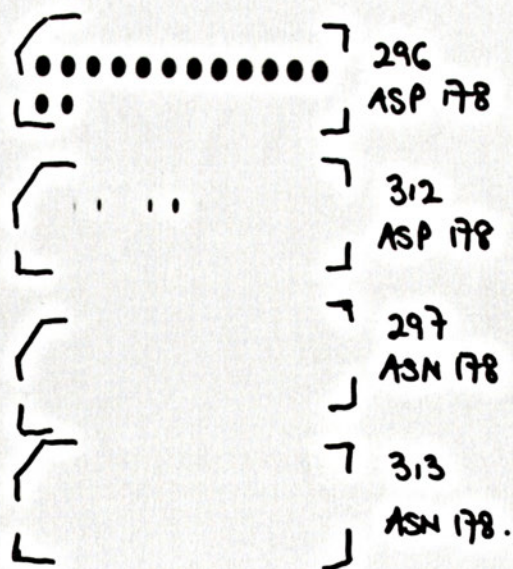
Ryc. 4 Wzór prążków po reakcji PCR i dot blot oraz hybrydyzacji z wyznakowanymi radioaktywnie sondami specyficznymi dla formy prawidłowej (Glu) i zmutowanej (Lys) kodonu 200. Trzy próby badane na filtrze 294 i 295 są heterozygotyczne pod względem tego kodonu (główki strzałek).

W kilku rodzinnych przypadkach zespołów otępienych wykazujących cechy pośrednie pomiędzy CJD i GSS oraz w przypadkach rodzinnych demencji bez charakterystycznego obrazu neuropatologicznego [78] wykryto w genie dla PrP wstawki (*inserts*) oktapeptydowych sekwencji powtarzalnych (*repeats*) w regionie pomiędzy kodonami 51 i 91 gdzie w warunkach prawidłowych znajduje się 5 takich oktapeptydów a w wymienionych rodzinnych przypadkach CJD ich liczba wzrasta do 11-13 (Ryc. 6) [79-84]. Obecność markerów molekularnych typowych dla CJD w rodzinach bez cech kliniczno-patologicznych tej choroby zmusza do refleksji nad redefiniowaniem molekularnym jednostek chorobowych z tej grupy [57]. Schematy zmian molekularnych przedstawiają ryciny (Ryc. 3-7).

Wszystkie wymienione mutacje występowały w przypadkach rodzinnych. Występująca endemicznie kuru, podobnie jak sporadyczne przypadki CJD, nie są spowodowane żadną mutacją. Natomiast sporadyczne przypadki CJD występują przede wszystkim u ludzi będących homozygotami dla polimorfizmu kodonu 129 *PRNP* (Ryc. 7) [83, 85-87]. W sporadycznych przypadkach CJD (w tym przypadkach jatrogennych — po podawaniu ludzkiego hormonu wzrostu) przeważają homozygoty 129<sup>Met Met</sup> lub 129<sup>Val Val</sup> w odróżnieniu od dominującej heterozygotycznej populacji 129<sup>Met Val</sup> [88-89]. Szczególnie interesujące, Val<sup>129</sup> występuje powiązana z Ser<sup>198</sup> lub Arg<sup>217</sup> w GSS

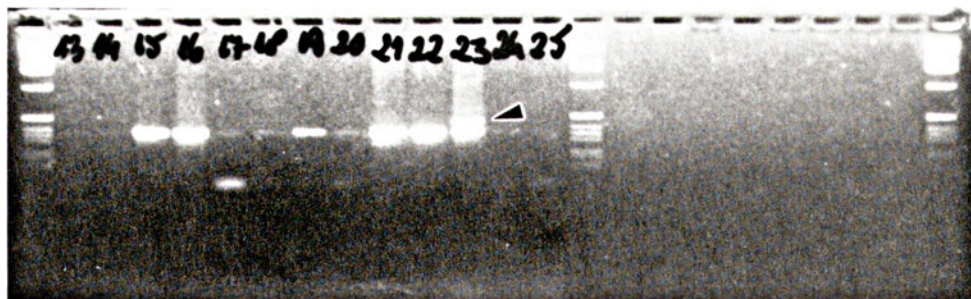
(“Oravske kuru”) [57] oraz w Chile [62]. Taka sama mutacja występuje jednak również w japońskiej rodzinie z CJD [63]. W fińskich, holenderskich, francuskich i amerykańskich (pochodzenia holenderskiego i węgierskiego) rodzinach z CJD wykryto mutacje kodonu 178 prowadzącą do substytucji asparaginy kwasem asparaginowym (Ryc. 5) [64-67]. Mutacje te wykryto także w sławnej rodzinie Backer, w której po raz pierwszy opisano rodzinne występowanie CJD [34, 68]. Identyczna mutacja występuje w przypadkach FFI, znanych w klasycznej literaturze neuropatologicznej jako „demencje wzgórzowe” (*thalamic dementias*) [69-73]. Na marginesie, pierwszym, który opisał rodzinę z FFI był Gabriel Garcia Marquez w książce „Sto lat samotności”. Mutacja Leu<sup>105</sup> występuje w przypadkach rodzinnej spastycznej paraparezy z mnogimi PrP-pozytywnymi blaszkami w korze ruchowej zaś nielicznymi w mózdzku [74]. Fenotyp ten może być także wariantem GSS. Mutacja Ile<sup>210</sup> została odkryta we Włoszech [75] i Francji [76] w sporadycznych przypadkach CJD. Tego typu doniesienie należy traktować z ostrożnością ponieważ związki rodzinne mogą ujawnić się dopiero w badaniach genealogicznych kilka pokoleń wstecz. Wreszcie, wykryto podwójną mutację kodonów 180 (Val do Ile) i 232 (Met do Arg) w sporadycznych przypadkach CJD charakteryzujących się późnym początkiem (84 lata) oraz brakiem typowego zapisu EEG (tak jak w przypadkach z mutacją kodonu 178) [77].

23/2/96 6 hrs EXPOSURE ASP/ASN 178



Ryc. 5 Wzór prążków po reakcji PCR i dot blot oraz hybrydyzacji z wyznakowanymi radioaktywnie sondami specyficznymi dla formy prawidłowej (Asp) i zmutowanej (Asn) kodonu 178. Obecność intensywnych prążków dla sond typu dzikiego i brak prążków dla typu zmutowanego świadczy o prawidłowej budowie kodonu w badanych próbkach.

Ryc. 6 Żel po reakcji PCR obejmującej region oktapeptydów (pomiędzy kodonami 51 i 91). Linie 13-22 zawierają zamplifikowany fragment DNA prawidłowej długości. Dodatkowy prążek na linii 23 (główna strzałka) zawiera wstawki oktapeptydowe.



z tau-pozytywnymi dystroficznymi neurytami [52-53] zaś z Asn<sup>178</sup> w rodzinnych przypadkach CJD [69, 72]. Obecność genotypu Val<sup>129</sup> Asn<sup>178</sup> prowadzi do wystąpienia fenotypu CJD natomiast Met<sup>129</sup> Asn<sup>178</sup> jest powiązana fenotypowo z FFI [69, 72].

Należy zaznaczyć, iż obecność mutacji w obrębie ludzkiego genu dla PrP częściowo warunkuje fenotyp kliniczny CJD [56, 64, 90]. Dla przykładu, w 74% przypadków CJD z mutacją kodonu 200 występuje typowy zapis EEG. W odróżnieniu, zapis ten prawie nigdy nie pojawia się w przypadkach CJD z mutacją kodonu 178 [64]. Przypadki CJD z mutacją kodonu 178 cechuje znacznie wcześniejszy niż w przypadkach sporadycznych wiek zachorowania i znacznie dłuższy czas trwania choroby [64]. Jeszcze wcześniej manifestują się przypadki CJD, w których gen kodujący PrP zawiera dodatkowe wstawki [64]. Przypadki GSS zajmują ekstremalną pozycję, manifestując się naj-

wcześniej i trwając najdłużej.

Fizjologiczna rola PrP<sup>c</sup> oraz rola mutacji genu PrP nie jest znana. Istnieją dwie podstawowe, a zarazem sprzeczne hipotezy. Hipoteza „prionu” sugeruje, iż konwersja PrP<sup>c</sup> do PrP<sup>sc</sup>, spowodowana przez mutacje w przypadkach rodzinnych lub będąca zjawiskiem stochastycznym w przypadkach sporadycznych, jest warunkiem koniecznym i wystarczającym do wystąpienia objawów choroby [91, 7-9, 92-93, 23]. Według tej hipotezy, PrP<sup>sc</sup>, nabierając cech „infekcyjnego” białka, sam byłby czynnikiem infekcyjnym czyli „prionem”. Innymi słowami, pasażowalność procesu chorobowego byłaby jedynie epifenomenem.

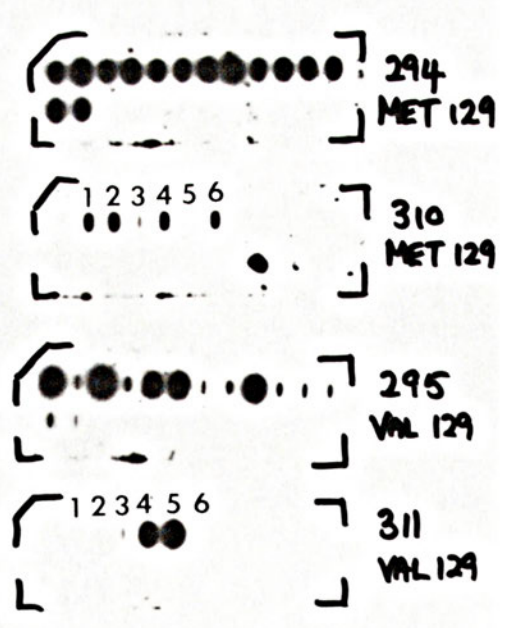
Druga, mniej ortodoksyjna hipoteza sugeruje, że konwersja PrP<sup>c</sup> w PrP<sup>sc</sup> zwiększa jedynie wrażliwość na zakażenie dotychczas niescharakteryzowanym wirusem. Na poparcie tej hipotezy przytacza się powiązanie wrażliwości na zakażenie naturalną *scrapie* u owiec z określonym polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) genu PrP (tożsamego z genem *SIP*) [94-98] oraz powiązanie innego polimorfizmu dwóch kodonów tego genu z długością okresu inkubacji eksperymentalnej *scrapie* u myszy [39, 99]. U myszy charakteryzujących się krótkim okresem inkubacji po zakażeniu szczepem „Chandler” wirusa *scrapie*, kodon 108 genu PrP odpowiada leucynie, a kodon 189 treoninie. Natomiast u myszy o długim okresie inkubacji, kodon 108 odpowiada fenyloalaninie natomiast kodon 189, walinie [99].

Hipoteza „wirino” zakłada z kolei, iż jeśli PrP<sup>sc</sup> jest częścią czynnika infekcyjnego, czynnik ten byłby rodzajem chimery molekularnej utworzonej z wirusowo-specyficznego oligonukleotydu (dotychczas niewyizolowanego, a zatem całkowicie hipotetycznego) i białka gospodarza (PrP<sup>c</sup>); taka struktura tłumaczyłaby większość niezwykłych cech wirusa np. brak wywoływanej odpowiedzi immunologicznej [100, 101]. Istnieje wreszcie możliwość, że konwersja PrP<sup>c</sup> do PrP<sup>sc</sup> jest jedynie indukowana przez dotychczas niewykryty wirus.

#### IV. Badania na zwierzętach transgenicznych

Szczep 263 K *scrapie* (Sc237) jest patogenny dla chomików (Ha) ale nie myszy (Mo). Transgeniczne myszy Tg(HaPrP) zawierające transgen PrP chomika stają się natomiast wrażliwe na zakażenie tym szczepem, a okres inkubacji jest odwrotnie proporcjonalny do liczby kopii transgeny [93, 102]. Badania tego typu

21/2/96 2.5 hrs EXPOSURE.



Ryc. 7 Autoradiogram obrazujący polimorfizm kodonu 129. Filtr 310 inkubowany był z sondą specyficzną dla metioniny, filtr 311 z sondą specyficzną dla walin. Genotyp badanych pacjentów jest następujący: 1, M/M; 2, M/M; 3, M/V; 4, M/V; 5, V/V; 6, M/M.

jednoznacznie sugerują interakcję pomiędzy PrP<sup>c</sup> gospodarza a PrP<sup>sc</sup> zawartym w inokulum. Hipoteza prionu sugeruje, że amplifikacja PrP<sup>sc</sup> jedynie naśladuje replikację czynnika infekcyjnego. Wyniki badań innych eksperymentów z myszami transgenicznymi nie są jednak już tak jednoznaczne. Myszy transgeniczne Tg(Mo Prn-p<sup>b</sup>) posiadające transgen Prn-p<sup>b</sup> (kodujący dłuższy okres inkubacji po zakażeniu szczepem Chandler) wykazują paradoksalne skrócenie (a nie spodziewane wydłużenie) okresu inkubacji po zakażeniu tym szczepem. U myszy transgenicznych Tg(MoPrP-P101L) transfekowanych transgenem zawierającym mutację kodonu 101 genu dla PrP (odpowiadającą mutacji kodonu 102 GSS, gen myszy zawiera delecję kodonu 55) pojawia się spontaniczna choroba neurodegeneracyjna charakteryzująca się obecnością wakuoli i PrP-immunopozytywnych blaszek amyloidowych [103]. Z kolei u myszy transgenicznych, o dużej liczbie kopii transgeny PrP chomika Tg(HaPrP), spontanicznie pojawia się nekrotyzująca mielopatia oraz demielinizacyjna polineuropatia [104]. Efekt ten zależy od dawki transgeny. Na przykład, u homozygotycznych myszy Tg(HaPrP<sup>+/+</sup>) choroba rozwija się po 400-600 dniach życia zaś u hemizygotycznych myszy Tg(HaPrP<sup>+/-</sup>) dopiero po 650 dniach. Interesujące, zarówno u myszy Tg(MoPrP-P101L) jak i u myszy Tg(HaPrP<sup>+/+</sup>) ze spontaniczną chorobą neurologiczną nie udaje się wykryć PrP<sup>sc</sup>, pomimo obecności PrP-immunododatnich blaszek amyloidowych. Modyfikacja ekspresji transgeny dodatkowo wpływa na fenotyp choroby. Dziesięciokrotnie większa ekspresja transgeny u myszy Tg(MoPrP-P101L) 2866 i 2477 powoduje wystąpienie objawów choroby już po 150-300 dniach natomiast u myszy Tg(MoPrP-P101L)2866 skrzyżowanych z "knock-outami" Prn-p<sup>0/0</sup> choroba pojawia się jeszcze wcześniej, bo po 150-160 dniach [105]. Jeśli opublikowane dane o udanym pasażu z tych myszy (ale tylko na chomiki i myszy transgeniczne Tg(MoPrP-P101L) o niskiej liczbie kopii transgeny) [106] zostaną potwierdzone w niezależnym laboratorium, będzie to ostateczny dowód hipotezy prionu.

Wyniki badań transgenicznych wskazują, że w konwersji PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>sc</sup> bierze udział dodatkowy komponent, tzw. „białko X” [107, 108]. W odróżnieniu od myszy Tg(HaPrP), myszy zawierające transgen PRNP człowieka, Tg(HuPrP) nie wykazują zwiększonej wrażliwości na zakażenie materiałem CJD (okres inkubacji 590-840 dni). Natomiast w chimerach Tg(MHu2MPrP), analogicznych do niżej opisanych chimer Tg(MH2MPrP), okres inkubacji po zakażeniu CJD skraca się do około 200 dni. Różną wrażliwość myszy Tg(HuPrP) i Tg(MHu2MPrP) na zakażenie CJD można tłumaczyć obecnością hipotetycznego chaperonowego białka X myszy, które biorąc udział w konwersji PrP<sup>c</sup> do PrP<sup>sc</sup> łatwiej interaguje z kompleksem HuPrP<sup>CJD</sup>/MHu2MPrP<sup>c</sup> niż z kompleksem HuPrP<sup>CJD</sup>/HuPrP<sup>c</sup>. Co więcej konwersja PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>sc</sup>

jest najłatwiejsza jeśli homologia obu białek w kodonie 129 jest tożsama. U myszy Tg(HuPrP)132 (Val w kodonie 129) i Tg(HuPrP)440 (Met w tym samym kodonie) okres inkubacji po zakażeniu jest najkrótszy wtedy jeśli PrP w inokulum zawiera w kodonie 129 aminokwas identyczny jak ten kodowany przez transgen. To ostatnie zjawisko może również tłumaczyć wyniki badań z użyciem myszy transgenicznych Tg(MHu2M PrP) i Tg(HPurP) bez konieczności odwoływania się do istnienia białka X.

Hipoteza prionu oparta o założenie interakcji PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>sc</sup> uzyskała oparcie w wyniku badań wykorzystujących myszy „chimery”. Inokulowanie *in vitro* komórek neuroblastoma transfekowanych „chimerami” genu PrP składającymi się z różnych kombinacji fragmentów genu chomika i myszy (geny te różnią się w 16 kodonach) prowadziło do powstawania PrP<sup>sc</sup> myszy (rozpoznawanego przeciwciałem monoklonalnym 3F4) jedynie wówczas gdy transgen (MHM2 i M4) był rozpoznawany jako gen myszy, a nie chomika. Dla odróżnienia, transgeny H4 i H3M nie były rozpoznawane jako transgeny myszy lecz chomika i jako takie nie produkowały PrP<sup>sc</sup>. W oparciu o ww. transgeny (oraz dodatkowy transgen MH2M) skonstruowano myszy transgeniczne, z których Tg(MH2M) były wrażliwe na zakażenie szczepem 263 K *scrapie* („chomiczym”) natomiast myszy Tg(MHM2) wykazywały oporność na ten szczep (białko MH2M jest rozpoznawane jako białko myszy, nie chomika). Interesujące, transgeny MH2M i MHM2 wykazują różnice jedynie dwóch kodonów. Jeżeli liczba kopii transgeny MHM2 jest bardzo duża (Tg(MH2M)294) wówczas myszy te stają się w końcu wrażliwe na zakażenie tym szczepem. Interpretacja wyników tego ostatniego eksperymentu jest w zasadzie analogiczna do tej tłumaczącej paradoksalne skrócenie okresu inkubacji u myszy Tg(Mo Prn-p<sup>b</sup>); liczba kopii transgeny „przewzycięża” inherentną dla tego transgeny właściwość oporności na zakażenie szczepem 263 K. Obecność transgeny MH2M wpływa na okres inkubacji; okres inkubacji szczepu 263 K przepasażowanego przez myszy Tg(MH2M), a następnie przez chomiki syryjskie wydłuża się.

Uzyskanie, poprzez homologiczną rekombinację, myszy bez PrP dostarczyło narzędzia, które umożliwiło zweryfikowanie przynajmniej części przedstawionych hipotez [92, 109-110]. Myszy te nie wykazują początkowo żadnych zaburzeń rozwojowych [111], natomiast w późniejszym okresie obserwuje się defekt w funkcjonowaniu złącza synaptycznego [112], snu [113] oraz ataksję mózdkową powiązaną ze zwyrodnieniem komórek Purkinjego [114]. Po inokulacji, u myszy tych nie występują objawy *scrapie* oraz nie występuje replikacja czynnika zakaźnego [109]. Doświadczenia te wykazały, że PrP jest niezbędne dla replikacji czynnika natomiast nie pozwalają one na definitywne stwierdzenie, że PrP jest jednocześnie czynnikiem infekcyjnym [115].

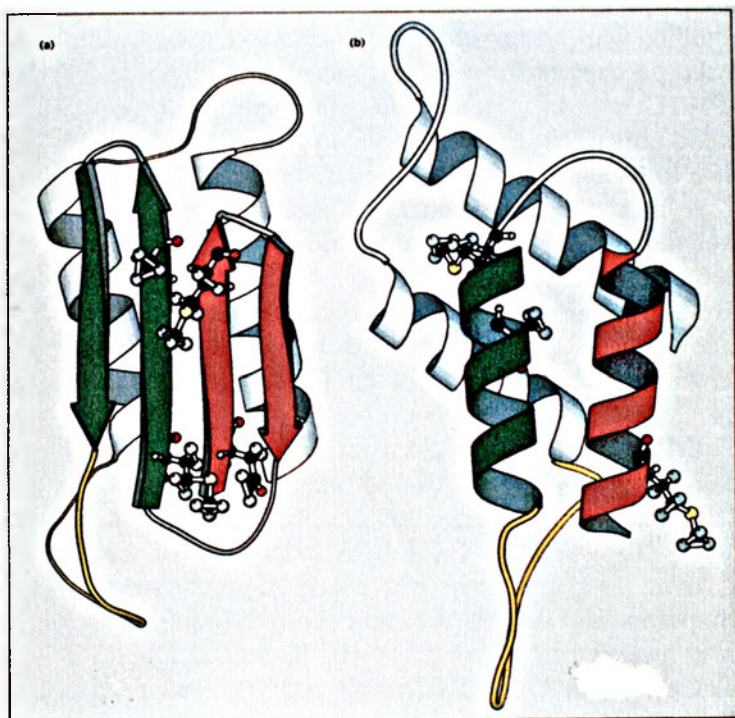
## V. PrP jako amyloid: koncepcja pasażowalnych amyloidoz mózgowych

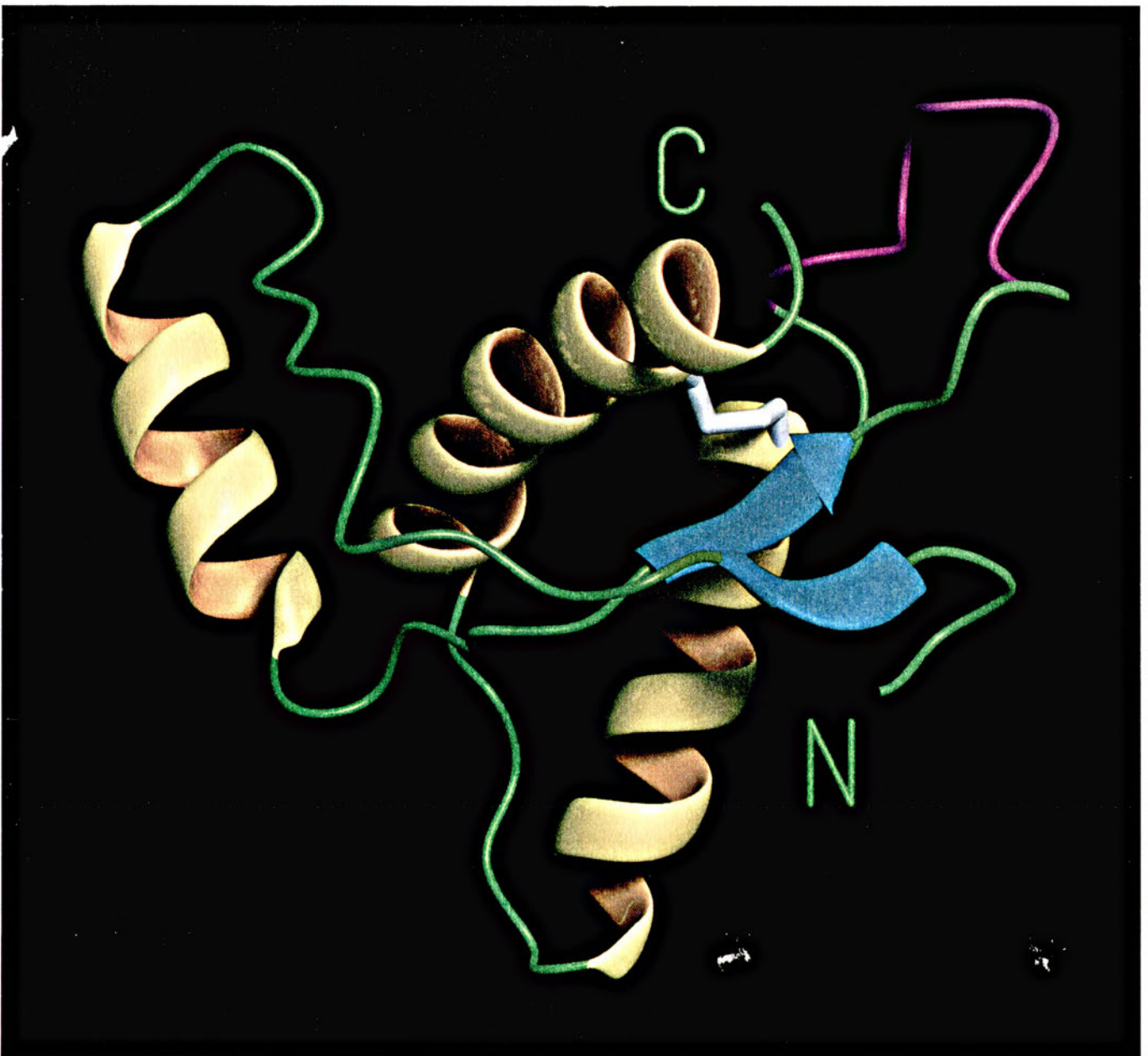
PrP-dodatnia blaszka (płytką) amyloidowa stanowi najbardziej specyficzny składnik neuropatologii omawianej grupy chorób. Ponieważ mózgi chorych na kuru zawierały miriady takich blaszek, dlatego też Gajdusek nazwał kuru "galloping senscence of the juvenile" [116]. Trzy dziesięciolecia później ustalono, iż blaszka amyloidowa w TSE zawiera PrP<sup>Sc</sup>; tak więc PrP<sup>Sc</sup> jest, *ex definitione* amyloidem w pasażowalnych amyloidozach mózgowych, niezależnie od tego czy białko to jest także częścią czynnika *scrapie*. Bezpośredniego dowodu, iż PrP<sup>Sc</sup> zawiera przewagę charakterystycznych dla każdego amyloidu struktur  $\beta$ -fałdowych w swojej budowie przestrzennej dostarczył po raz pierwszy Caughey i wsp. [24] posługując się spektroskopią w podczerwieni. Następnie Prusiner i wsp. [25-27] potwierdził, iż PrP<sup>Sc</sup> zawiera około 54% struktur  $\beta$ -fałdowych (Ryc. 8). W wyniku denaturacji SDS (który to proces powoduje znaczny spadek infekcyjności), odsetek struktur  $\beta$ -fałdowych spada. Podobnie, wysokie pH powoduje spadek zarówno miana infekcyjności, jak i zawartości struktur  $\beta$ -fałdowych w PrP<sup>Sc</sup>. Dla odróżnienia, PrP<sup>C</sup> zawiera w swej konformacji trzy [117] obszary  $\alpha$ -helikalne. Z kolei, trzy z czterech syntetycznych peptydów odpowiadających sekwencji czterem obszarom  $\alpha$ -helikalnym PrP<sup>C</sup> tworzą samorzutnie włókna amyloidowe, co sugeruje obecność struktur  $\beta$ -fałdowych a nie  $\alpha$ -helikalnych, co potwierdzają badania z użyciem NMR (Ryc. 9) [117]. Co bardziej interesujące, wszystkie obszary  $\alpha$ -helikalne mapują się do tej części PrP<sup>Sc</sup>, która stanie się opornym na trawienie proteinazami PrP 27-30 w CJD ale nie we wszystkich postaciach GSS. Razem, dane te dostarczają kolejnego dowodu,

że interakcja białko-białko (PrP<sup>Sc</sup>-PrP<sup>C</sup>) stanowi podstawowy proces patogenezy w pasażowalnych amyloidozach mózgowych. Safar i wsp. [118-121] posługując się technikami spektroskopii dichroizmu kołowego zastosowanego do cienkich warstw PrP uzyskiwanych na szkle lub mice wykazali iż PrP<sup>Sc</sup> zawiera 34% struktur  $\beta$ -fałdowych i 20%  $\alpha$ -helikalnych, zaś PrP 27-30 odpowiednio 43% struktur  $\beta$ -fałdowych bez obszarów  $\alpha$ -helikalnych. Prusiner [105] przedstawił analogiczne dane dla PrP<sup>Sc</sup> (30%  $\alpha$ -helikoid, 43% struktur  $\beta$ -fałdowych i 27% struktur przypadkowych (*turn and coil*); PrP<sup>C</sup> (odpowiednio 42%, 3% i 55%) oraz PrP 27-30 (21%, 54% i 15%). Wszystkie te dane sugerują, że PrP<sup>Sc</sup> w zajęty przez pasażowalne amyloidozy mózgu pozostaje głównie w konformacji  $\beta$ -fałdowej w odróżnieniu od PrP<sup>C</sup>, które konformacyjnie jest głównie  $\alpha$ -helikalne. Ostatnio opublikowano badania NMR fragmentu 121-231 PrP<sup>C</sup> uzyskanego technikami rekombinacyjnymi w *E. coli* [117]. W odróżnieniu od poprzednio cytowanych modeli, PrP<sup>C</sup> zawiera tutaj trzy  $\alpha$ -helikoidy (fragmenty 144-154, 179-193 i 200 do 217) oraz dwa anty paralelne łańcuchy  $\beta$ -fałdowe (128-131 i 161-164). Prawdopodobnie już wkrótce zostanie opublikowana struktura NMR PrP<sup>Sc</sup>.

Konwersji PrP<sup>C</sup> w PrP<sup>Sc</sup> dokonano także w systemie bezkomórkowym *in vitro*, co dostarczyło pierwszego bezpośredniego dowodu, że taka konwersja istotnie dokonuje się w procesie nukleacji (*seeding*) wokół jądra [122]. W cytowanym eksperymencie, znakowany <sup>35</sup>S-PrP<sup>C</sup> zostawał przekształcony w <sup>35</sup>S-PrP<sup>Sc</sup> pod wpływem nadmiaru PrP<sup>Sc</sup>. Konwersja PrP<sup>C</sup> w PrP<sup>Sc</sup> jest gatunkowo-specyficzna, to znaczy <sup>35</sup>S-HaPrP<sup>C</sup> konwertował pod wpływem MoPrP<sup>Sc</sup> znacznie mniej wydajnie niż pod wpływem HaPrP<sup>Sc</sup> i tworzące się w wyniku tej konwersji formy PrP oporne na proteinazę K (a więc analogiczne do PrP 27-30) były odmiennej

**Ryc. 8** Modele PrP<sup>C</sup> (b) i PrP<sup>Sc</sup> (a). (a) Proponowany model PrP<sup>Sc</sup>. Struktura prezentowana na rycinie została wybrana z sześciu różnych modeli białka jako korelująca najlepiej z danymi genetycznymi. PrP<sup>Sc</sup> zawiera cztery domeny  $\beta$ -fałdowe i dwie  $\alpha$ -helisy.  $\beta$ -fałdowe domeny 1a i 1b (czerwone) odpowiadają pierwszej  $\alpha$ -helisie PrP<sup>C</sup> zaś domeny 2a i 2b (zielone), drugiej  $\alpha$ -helisie PrP<sup>C</sup>. Helisy 3 i 4 pozostają niezmienione w tym modelu. Cztery reszty aminokwasowe (Asn108; Met112, Met129 i Ala133) odgrywające rolę w barierze gatunkowej przedstawione jako białe modele kulkowe. (b). Proponowany model PrP<sup>C</sup>. Helisa pierwsza przedstawiona w czerwieni druga w zieleni. Model ten został jedynie częściowo potwierdzony badaniami NMR [117]. Dzięki uprzejmości Prof. Stanleya B. Prusiner'a, Uniwersytet Kalifornijski, San Francisco, USA. Częściowo zmodyfikowane wg Huang Z, Prusiner SB, Cohen FE (1995) *Folding Design* 1: 13-19





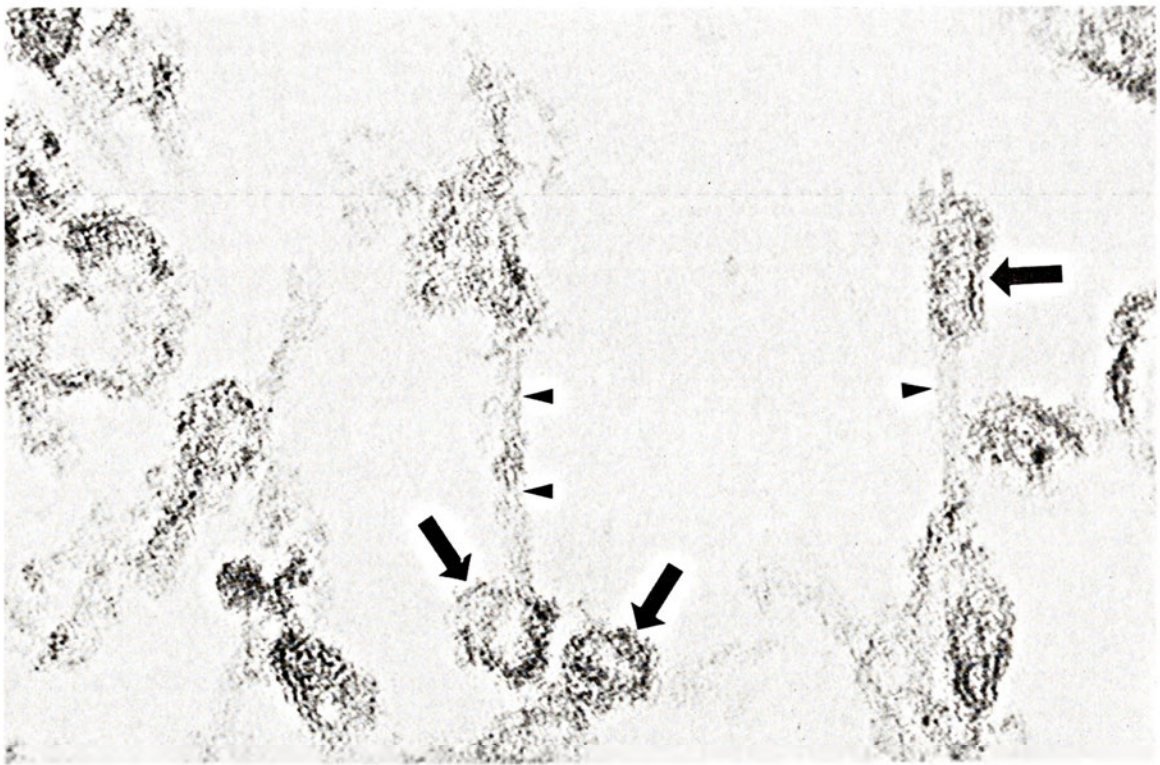
Ryc. 9 Struktura fragmentu PrP(121—231) myszy. Trzy  $\alpha$ -helisy oznaczono kolorem żółtym, zaś dwie anty-równoległe domeny  $\beta$ -wałdowe, niebieskim. Łączące pętle oznaczono kolorem zielonym. Mostek dwusiarczkowy pomiędzy resztami cysteiny 179 i 214 oznaczono kolorem białym. Dzięki uprzejmości prof. G l o c k s h u b e r a, Instytut fur Molekularbiologie und Biophysik, Zurich, Szwajcaria [117].

wielkości [123]. Konwersja PrP<sup>c</sup> w PrP<sup>sc</sup> była zależna od czasu oraz od stężenia tego ostatniego przy czym istniało progowe stężenie PrP<sup>sc</sup>, poniżej którego konwersja ustawała [124]. Co więcej, aktywność konwertująca wiązała się z agregatami PrP a nie z monomerem tego białka. Interesujące, użycie ultrafiltracji wykazało, że aktywność konwertująca jest zatrzymywana przez filtr o wielkości porów < 100 kDa; znów, zjawisko to można interpretować jako dowód, że aktywność taką wykazuje agregat a nie monomer PrP [124]. W tym miejscu należy zaznaczyć, że nie można wykluczyć, iż dodatkowy komponent (< 100 kDa) ko-sedymentujący z PrP<sup>sc</sup> jest w istocie odpowiedzialny za proces konwersji. Przytoczone eksperymenty świadczące na korzyść hipotezy nukleacji metaforycznie przypominają lód-9 z książki „Kocia kołyska” Kurta V o n n e g u t a, w której ten izomer lodu powo-

duje przekształcenie stykającej się z nim wody w kolejne molekuly lodu-9 i tak *ad infinitum* [125]. Metafory lodu-9 jako pierwszy używał D. Carleton G a j d u s e k, w swoich wykładach (patrz, 125, przypis).

## VI. Co pozostało?

W chwili obecnej hipoteza prionu jest powszechnie zaakceptowana także z powodu bezskutecznych poszukiwań struktur wiruso-podobnych. Jednak od 1968 r. kiedy to David F e r r e i r a i w s p. [126] wykryli tzw. struktury tubulopęcherzykowe w mózгах myszy zakażonych *scrapie*, struktury te udało się wykazać we wszystkich badanych modelach *scrapie*, CJD i GSS [127, 129]. Ostatnio jeden z nas (Paweł P. L i b e r s k i) oraz Martin J e f f r e y z MAFF, CVL, Lasswade Veterinary Laboratory w Edynburgu, Szkocja wyka-



**Ryc. 10** Struktury tubulopęcherzykowe (strzałki) o średnicy około 25 nm przylegające do włókienek PrP amyloidu (główki strzałek). Nieopublikowane badania PPL i Dr. Martina Jeffreya, MAFF, CVL, Lasswade Veterinary Laboratory, Edynburg, Szkocja. Transmisyjna mikroskopia elektronowa, kontrastowanie octanem uranylu i cytrynianem ołowiu; oryginalne powiększenie, 140 000 ×.

zali obecność struktur tubulopęcherzykowych w ścisłym kontakcie z włóknkami PrP-amyloidu (Ryc. 10) w tzw. luźnych blaszkach amyloidowych w obszarze podwysciółkowym mózgow chomików zakażonych *scrapie*. Jeżeli obserwacje te zostaną niezależnie potwierdzone i jeżeli struktury te okażą się cząsteczką wirusa *scrapie*, to tak bezpośredni kontakt jest w stanie wyjaśnić ścisły związek PrP i infekcyjności.

#### Podziękowania

Materiał omówiony w powyższym artykule wykorzystano w wykładzie przedstawionym na sesji „Ostępnie”, XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurologicznego, Katowice 26-29 września, 1996 r. Praca ta jest częścią projektu EC Concerted action “Prion disorders” (Project leader: Prof. Herbert Budka). Badania naukowe prowadzone przez prof. P. P. Liberskiego były finansowane przez Fogarty International Center oraz Fundację Kościuszkowską w USA, przez British Council w U.K. oraz przez KBN, Fundację Marii Skłodowskiej-Curie, Fundację Nauki Polskiej i Akademię Medyczną w Łodzi, w Polsce.

Artykuł otrzymano 23 września 1996 r.

Zaakceptowano do druku 26 września 1996 r.

#### Piśmiennictwo

- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith RG (1996) *The Lancet* **347**: 921-925
- Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D (1996) *Nature (Lond)* **381**: 743-744
- Gajdusek DC (1990) W: *Fields Virology*, Vol. 2, 2289-2324, Second edition, Fields B.N., Knipe D.M., Eds, Raven Press, New York
- Gajdusek DC (1993) W: *Light and Electron Microscopic Neuropathology of Slow Virus Disorders* 1-31, Liberski PP, Red., CRC Press, Boca Raton
- Gajdusek DC (1988) *Mount Sinai J Med* **55**: 3-5
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983) *Cell* **35**: 57-62
- Prusiner SB (1991) *Science* **252**: 1515-1522
- Prusiner SB (1991) *Biochem Molec Biol* **26**: 397-438
- Prusiner SB (1982) *Science* **216**: 136-144
- Prusiner SB (1987) W: *Prions. Novel Infectious Pathogens Causing Scrapie and Creutzfeldt-Jakob Disease* 38-53, Prusiner S.B., McKinley M.P., Academic Press, New York
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) *Cell* **46**: 417-428
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, Garon C, Haase A (1985) *Nature (Lond)* **315**: 331-333
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, Weissmann C (1985) *Cell* **40**: 735-746
- Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier REK, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB, Weiner LP (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7358-7362
- Goldmann W, Hunter N, Martin T, Dawson M, Hope J (1991) *J Gen Virol* **72**: 201-204
- Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beyreuther K, Hope J (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2476-2480
- Martin T, Hughes S, Hughes K, Dawson M (1995) *Biochimica et Biophysica Acta* **1270**: 211-214
- Schatzli HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB (1995) *J Mol Biol* **245**: 362-374
- Cervenakova L, Brown P, Goldfarb LG, Nagle J, Petrone K, Rubenstein R, Dubnick M, Gibbs

- CJ Jr., Gajdusek DC (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12159-12162
20. Windl O, Dempster M, Estibeiro P, Lathe R (1995) *Gene* **159**: 181-186
  21. Gabriel J-M, Oeach B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9097-9101
  22. Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7664-7668
  23. Westaway D, Prusiner SB (1989) *Trends Neurosci* **12**: 221-227
  24. Caughey B, Dong A, Bhat K S, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS (1991) *Biochemistry* **30**: 7672-7680
  25. Gasset M, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1-5
  26. Gasset M, Baldwin MA, Lloyd DH, Gabriel J-M, Holtzman DM, Cohen F, Fletterick RJ, Prusiner SB (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10940-10944
  27. Pan K-M, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10962-10966
  28. Stahl N, Baldwin MA, Hecker R, Pan K-M, Burlingame AL, Prusiner SB (1992) *Biochemistry* **31**: 5043-5053
  29. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987) *Cell* **51**: 229-240
  30. Stahl N, Borchelt DR, Prusiner SB (1992) *Biochemistry* **29**: 5405-5410
  31. Merz PA, Rohwer RG, Kascak R, Wisniewski HM, Somerville RA, Gibbs CJ Jr., Gajdusek DC (1984) *Science* **225**: 437-476
  32. Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal J (1981) *Acta Neuropathol (Berl.)* **60**: 63-74
  33. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DC, Glenner GG (1983) *Cell* **35**: 349-358
  34. Meggendorfer F (1930) *Z ges Neurol Psychiatr* **128**: 337-341
  35. Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr (1981) *Brain* **104**: 535-558
  36. Brown P, Goldfarb LG, Gajdusek DC (1991) *Lancet* **337**: 1019-1022
  37. Dickinson AG, Mackay JMK (1964) *Heredity* **19**: 279-288
  38. Dickinson AG, Meikle VMH, Fraser H (1968) *J Comp Pathol* **78**: 293-299
  39. Carlson GA, Kingsbury DT, Goodman PA, Coleman S, Marshall ST, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB (1986) *Cell* **46**: 503-511
  40. Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB (1989) *Nature (Lond)* **338**: 342-345
  41. Baker HF, Poulter M, Crow TJ, Frith CD, Lofthouse R, Ridley RM (1991) *Lancet* **337**: 1286
  42. Colinge J, Harding AE, Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Boughey AM, Shah T, Crow TJ (1989) *Lancet* **1**: 15-17
  43. Doh-Ura K, Tateishi J, Kitamoto T, Sasaki H, Sakaki Y (1990) *Ann Neurol* **27**: 121-126
  44. Goldabger D, Goldfarb L, Brown P, Asher D, Brown T, Lin S, Teener JW, Feinstone SM, Rubenstein R, Kascak R, Bollaard JW, Gajdusek DC (1989) *Exp Neurol* **106**: 204-246
  45. Goldhammer Y, Gabizon R, Meiner Z, Sadeh M (1993) *Neurology* **43**: 2718-2720
  46. Hsiao K, Doh-Ura, Kitamoto T, Tateishi J, Prusiner SB (1989) *Ann Neurol* **26**: 106
  47. Kretzschmar HA, Kufer P, Riethmuller G, DeArmond D S, Prusiner SB, Schiffer D (1992) *Neurology* **42**: 809-810
  48. Young K, Jones CK, Piccardo P, Lazzarini A, Golbe LI, Zimmerman TR, Dickson DW, McLachlan DC, George-Hyslop PSt, Lennox A, Perlman S, Vinters HV, Hodes ME, Dlouhy S, Ghetti B (1995) *Neurology* **45**: 1127-1134
  49. Ghetti B, Piccardo P, Frangione B, Bugiani O, Giaccone G, Young K, Prelli F, Farlow MR, Dlouhy SR, Tagliavini F (1996) *Brain Pathol* **6**: 127-145
  50. Kretzschmar HA, Honold G, Seitelberger F, Feucht M, Wessely P, Mehraein P, Budka H (1991) *Lancet* **337**: 1160
  51. Giaccone G, Verga L, Bugiani O, Frangione B, Serban D, Prusiner SB, Farlow MF, Ghetti B, Tagliavini F (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9349-9353
  52. Dlouhy SR, Hsiao K, Farlow MR, Foroud T, Conneally PM, Prusiner SB, Hodes ME, Ghetti B (1992) *Nature genetics* **1**: 64-67
  53. Hsiao K, Dlouhy SR, Farlow MR, Cass C, Da Costa M, Conneally PM, Hodes ME, Ghetti B, Prusiner SB (1992) *Nature Genetics* **1**: 68-71
  54. Bertoni JM, Brown P, Goldfarb LG, Rubenstein R, Gajdusek DC (1992) *JAMA* **268**: 2413-2415
  55. Brown P, Goldfarb LG, Cathala F, Vbrowska A, Sulima M, Nieto A, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1991) *J Neurol Sci* **105**: 240-246
  56. Brown P, Goldfarb LG, Gibbs CJ Jr., Gajdusek DC (1991) *Europ J Epidemiol.* **7**: 469-476
  57. Brown P, Kaur P, Sulima M, Goldfarb LG, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1993) *Lancet* **341**: 127-129
  58. Goldfarb L, Brown P, Goldgaber D, Garruto RM, Yanagihara R, Asher DM, Gajdusek DC (1990) *Lancet* **336**: 174-175
  59. Goldfarb L, Brown P, Mitrova E, Cervenakova L, Goldin L, Korczyn AD, Chapman J, Galvez S, Cartier L, Rubinstein R, Gajdusek DC (1991) *Europ J Epidemiol* **7**: 477-486
  60. Goldfarb LG, Korczyn AD, Brown P, Chapman J, Gajdusek DC (1990) *Lancet* **336**: 637
  61. Hsiao K, Meiner Z, Kahana E, Cass C, Kahana I, Avraham D, Scarlato G, Abramsky O, Prusiner SB, Gabizon R (1991) *New Engl J Med* **324**: 1091-1097
  62. Brown P, Galvez S, Goldfarb LG, Nieto A, Cartier L, Gibbs CJ Jr., Gajdusek DC (1992) *J Neurol Sci* **112**: 65-67
  63. Inoue I, Kitamoto T, Doh-Ura K, Shii H, Goto I, Tateishi J (1994) *Neurology* **44**: 299-301
  64. Brown P, Goldfarb LG, Kovanen J, Haltia M, Cathala F, Sulima M, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1991) *Ann Neurol* **31**: 282-285
  65. Fink JK, Warren JT, Drury I, Murman D, Peacock ML (1991) *Neurology* **41**: 1647-1650
  66. Goldfarb LG, Haltia M, Brown P, Nieto A, Kovanen J, McCombie WR, Trapp S, Gajdusek DC (1991) *Lancet* **337**: 425
  67. Nieto A, Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR, Trapp S, Asher DM, Gajdusek DC (1991) *Lancet* **337**: 662-663
  68. Kretzschmar HA, Neumann M, Stavrou D (1995) *Acta Neuropathol.* **89**: 96-98
  69. Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montanga P, Cortelli P, Jullien J, Vital C, Pendelbury WW, Haltia M, Wills PR, Hauw JJ, McKeever PE, Monari L, Schrank B, Swergold GD, Autilio-Gambetti L, Gajdusek DC, Lugaresi E, Gambetti P (1992) *Science* **258**: 806-808
  70. Medori R, Montagna P, Tritschler H-J, LeBlanc A, Cordelli P, Tinuper P, Lugaresi E, Gambetti P (1992) *Neurology* **42**: 669-671
  71. Medori R, Tritschler H-J, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P, Tinuper P, Avoni P, Mochi M, Baruzzi A, Hauw JJ, Ott J, Lugaresi L, Autilio-Gambetti L, Gambetti P (1992) *N Engl J Med.* **326**: 444-449
  72. Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen R, Mikol J, Gray F, Cortelli P, Montagna P, Ghetti B, Goldfarb LG, Gajdusek DC, Lugaresi E, Gambetti P, Autilio-Gambetti L (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2839-2842
  73. Ruder AT, Mednick AS, Brown P, Spire JP, Van Cauter E, Wollmann RL, Cervenakova L, Goldfarb LG, Garay A, Ovsiew F, Gajdusek DC, Ross RP (1995) *Neurology* **45**: 1068-1075

74. Kitamoto M, Amano N, Terao Y, Nakazato Y, Isshik 8 T, Mizutani T, Tadeishi J (1993) *Ann Neurol* **34**: 808-813
75. Pocchiari N, Salvatore M, Cutruzzola F, Genuardi M, Travaglini, Allocatelli C, Massullo C, Macchi G, Alema G, Galgani S, Xi YG, , Petraroli R, Silvestrini MC, Brunori M (1993) *Ann Neurol* **34**: 802-87
76. Ripoll L, Laplanche J-L, Salzmänn M, Jouvet A, Planques B, Dussaucy M, Chatelain J, Beaudry P, Launay J-M (1993) *Neurology* **43**: 1934-1938
77. Hitoschi S, Nagura H, Yamanouchi H, Kitamoto T (1993) *J Neurol Sci* **120**: 208-212
78. Collinge J, Owen F, Poulter M, Leach M, Crow TJ, Rossor MN, Hardy J, Mullan MJ, Janota I, Lantos PL (1990) *Lancet* **336**: 7-9
79. Goldfarb L, Brown P, Little BW, Cervenakova L, Kenney K, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1993) *Neurology* **43**: 2392-2394
80. Goldfarb L, Brown P, McCombie WR, Goldgaber D, Swergold GD, Wills PR, Cervenakova L, Baron H, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10926-10930
81. Goldfarb L, Brown P, Vrbovska A, Baron H, McCombie WR, Cathala F, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1992) *J Neurol Sci* **111**: 189-194
82. Owen F, Poulter M, Shah T, Collinge J, Lothouse R, Baker H, Ridley R, McVey J, Crow TJ (1991) *Molec Brain Res* **7**: 273-276
83. Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J (1991) *Nature (Lond)* **35**: 340-342
84. Oda T, Kitamoto T, Mitsuhashi T, Iwabuchi K, Haga C, Oguni E, Kato Y, Tominaga I, Yanai K, Kashima K, Kogure T, Hori K, Ogino K (1995) *Acta Neuropathol* **90**: 80-86
85. Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ (1991) *Lancet* **337**: 1441-1442
86. Deslys J-P, Marce D, Dormont D (1994) *J Gen Virol* **75**: 23-27
87. Miyazono M, Kitamoto T, Doh-Ura K, Iwaki T, Tateishi J (1992) *Acta Neuropathol* **84**: 349-354
88. Owen F, Poulter M, Collinge J, Crow T (1989) *Nucl Acid Res* **18**, 3103
89. Owen F, Poulter M, Collinge J, Crow T (1990) *Am J Hum Genet* **46**: 1215-1216
90. Brown P, Rodgers-Johnson P, Cathala F, Gibbs CJ, Jr, Gajdusek DC (1984) *Ann Neurol* **16**: 295-304
91. Brown P, Liberski PP, Wolff A, Gajdusek DC (1990) *Proc Natl Acad Sci* **87**: 7240-7244
92. Prusiner SB, Groth D, Serban A, Koehler R, Foster D, Torchia M, Burton D, Yang SL, DeArmond SJ (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10608-10612
93. Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan K-M, Groth M, Miranda C, Torchia M, Yang S-L, Serban D, Carlson GA, Hoppe PC, Westaway D, DeArmond SJ *Cell* **63**: 673-686
94. Hunter N (1993) *Rev Med Virol* **3**: 195-200
95. Hunter N, Dann JC, Bennett AD, Somerville A, McConnell I, Hope J (1992) *J Gen Virol* **73**: 2751-2755
96. Hunter N, Foster JD, Dickinson AG, Hope J (1989) *Vet Rec* **124**: 364-366
97. Hunter N, Hope J, McConnell I, Dickinson AG (1987) *J Gen Virol* **68**: 2711-2716
98. Ikeda T, Horiuchi M, Ishiguro N, Muramatsu Y, Kai-Uwe GD, Shinagawa M (1995) *J Gen Virol* **76**: 2577-2581
99. Westaway D, Goodman PA, Miranda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB (1987) *Cell* **51**: 651-662
100. Weissmann C (1989) *Nature (Lond)* **338**: 298-299
101. Weissmann C (1991) *Nature (Lond)* **352**: 679-683
102. Scott M, Foster D, Miranda C, Derban D, Coufal F, Walchli M, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB (1989) *Cell* **59**: 847-857
103. Hsiao K, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ, Prusiner SB (1990) *Science* **250**: 1587-1590
104. Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang S-L, Torchia M, Carlson GA, Prusiner SB (1994) *Cell* **76**: 117-129
105. Prusiner SB (1996) W: Fields Virology 2901-2950, Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et. al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
106. Hsiao K K, Groth D, Scott M, Yang S-L, Serban H, Rapp D, Foster D, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9126-9130
107. Telling GC, Scott M, Hsiao K K, Foster D, Yang S-L, Torchia M, Sidle KCL, Collinge J, DeArmond SJ, Prusiner SB (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9936-9940
108. Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen ME, DeArmond SJ, Prusiner SB (1995) *Cell* **83**: 79-90
109. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguët M, Weissmann C (1993) *Cell* **73**: 1339-1347
110. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluthmann H, Lipp H-P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguët M, Weissmann C (1992) *Nature (Lond)* **356**: 577-582
111. Brenner HR, Herczeg A, Oech B (1992) *Proc R Soc (Lond)* **250**: 151-155
112. Collinge J, Whittington MA, Sidle KCL, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jeffreys GR (1994) *Nature (Lond)* **370**: 295-297
113. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC (1996) *Nature (Lond)* **380**: 639-642
114. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T (1996) *Nature (Lond)* **380**: 528-531
115. Beyreuther K, Masters CL (1994) *Nature (Lond)* **370**: 419-420
116. Gajdusek DC (1994) *Molec Neuropathol* **8**: 1-13
117. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K (1996) *Nature (Lond)* **382**: 180-182
118. Safar J, Roller P, Ruben GC, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr (1993) *J Biol Chem* **268**: 20276-20284
119. Safar J, Roller P, Ruben GC, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr (1993) *Biopolymers* **33**: 1461-1476
120. Safar J, Roller P, Ruben GC, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr (1993) *Protein Science* **2**: 2206-2216
121. Safar J, Roller P, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr (1994) *Biochemistry* **33**: 8375-8383
122. Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B (1994) *Nature (Lond)* **370**: 471-474
123. Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT, Caughey B (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3923-3927
124. Caughey B, Kocisko DA, Raymond GJ, Lansbury PT Jr (1995) *Chem & Biol* **2**: 807-817
125. Lansbury Pr Jr, Caughey B (1995) *Chem & Biol* **2**: 1-5
126. David-Ferreira JF, David-Ferreira KL, Gibbs CJ Jr, Morris JA (1968) *Proc Soc Exp Biol Med* **127**: 313-320
127. Liberski PP, Yanagihara R, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1990) *Acta Neuropathol* **79**: 349-354
128. Liberski PP, Budka H, Sluga E, Barcikowska M, Kwieciński H (1992) *Acta Neuropathol* **84**: 238-243
129. Liberski PP, Budka H (1994) *Acta Neuropathol* (1994) **88**: 491-492

**Prenumerata „Postępow Biochemii”  
w 1997 r.  
Prenumerata dla instytucji — 60 zł  
Indywidualna — 30 zł  
50% zniżki dla członków PTBioch.**



# Rola białek kodowanych przez faga $\lambda$ w destrukcji bakteryjnej ściany komórkowej i kontroli czasu lizy

## Role of bacteriophage $\lambda$ coded proteins in destruction of bacterial cell wall and the control of lysis timing

SABINA KĘDZIERSKA<sup>1</sup>,  
ALINA TAYLOR<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Nakładające się geny rejonu lizy faga  $\lambda$ 
  - II-1. Białka S105 i S107, produkty jednego genu o antagonistycznych funkcjach fizjologicznych
  - II-2. Białko R, enzym rozszczepiający wiązania  $\beta$ -1, 4-glikozydowe przez transglikozylację
  - II-3. Lokalizowane w błonach bakteryjnych białka Rz i Rz1; rola białka Rz1 w fuzji błon bakteryjnych
- III. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Overlapping genes of the lysis region
  - II-1. Two S proteins, one gene products with antagonistic physiological function
  - II-2. R protein, the enzyme splitting  $\beta$ -1, 4-glycosidic bonds by transglycosylation
  - II-3. Rz and Rz1; proteins localized in bacterial membranes; a role of the Rz1 in membranes fusion
- III. Summary

**Wykaz stosowanych skrótów:** aa — aminokwas(y); IM — błona wewnętrzna (cytoplazmatyczna); nt — nukleotyd(y); OM — błona zewnętrzna; ORF — otwarta rama odczytu; SD — sekwencja Shine-Dalgarno, rbs; Tn — transpozon.

### I. Wstęp

Zakażenie wirusem  $\lambda$  komórki *Escherichia coli* prowadzi do lizy lub lizogenizacji czyli integracji genomu wirusowego z DNA komórkowym. Zintegrowany profag replikuje się z chromosomem bakteryjnym i przekazywany jest kolejnym pokoleniom potomnym zakażonej komórki [1]. Jego geny znajdują się w stanie represji realizowanej, przez produkt genu *cI*. W odpowiednich warunkach może nastąpić indukcja profaga polegająca na inaktywacji represora i derepresji

genów fagowych. Wówczas następuje replikacja fagowego DNA i ekspresja genów fagowych. W końcowym efekcie dochodzi do wytworzenia i uwolnienia potomnych fagów przez lizę komórki bakteryjnej. Liza polega na zniszczeniu osłony komórkowej bakterii, złożonej z IM, OM i mureiny. W procesie tym biorą udział białka, kodowane przez genom fagowy: S, R i Rz oraz prawdopodobnie Rz1 wykryte przez nas w 1993 r. [2] (Tab. 1).

### II. Nakładające się geny rejonu lizy faga $\lambda$

Geny lizy znajdują się w prawym ramieniu genomu faga  $\lambda$  [3]. Rycina 1 przedstawia uaktualnioną, uproszczoną mapę fizyczną tego rejonu. Transkrypcja genów

**Tabela 1.**

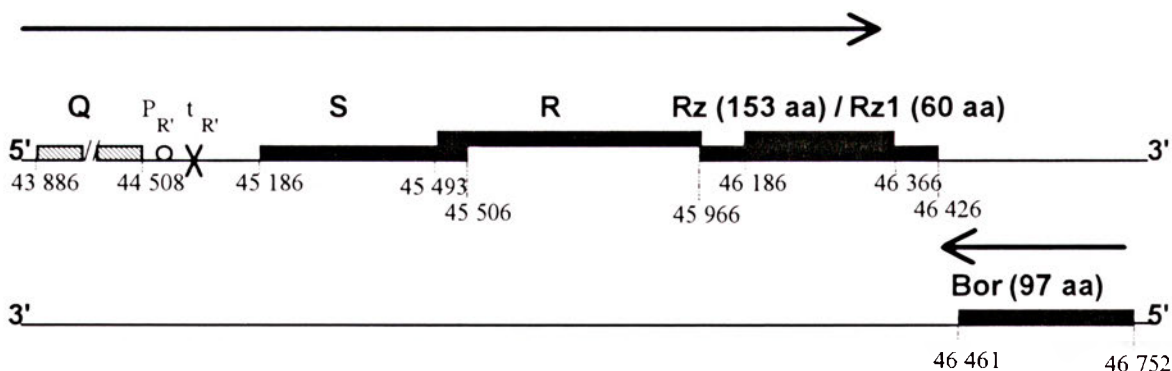
Produkty genów rejonu lizy faga  $\lambda$

Białko	kDa	pI	lokalizacja w komórce <i>E. coli</i>	proponowana funkcja
S <sup>(8,9,11)</sup>	11.6 (8.5)	?	IM	udział w translokacji transglikozylazy kontrola czasu lizy
R <sup>(17,34)</sup>	17.5	9.45	białko rozpuszczalne	(transglikozylaza) destrukcja mureiny
Rz <sup>(2,39)</sup>	17.2	9.27	strefy adhezji (A)	(endopeptydaza?) destrukcja mureiny?
Rz1 <sup>(40)</sup>	6.5 (prekursor)	9.06		
	5.1 (białko dojrzałe)	~8.3	OM	fuzja IM i OM?

Tabelkę opracowano w oparciu o prace: [2, 8, 9, 11, 17, 34, 39, 40]

<sup>1</sup>Dr, <sup>2</sup>prof. dr hab., Katedra Biochemii, Pracownia Biochemii Bakteryjnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

zależy od konstytutywnego promotora  $p_R$ , ale wkrótce po starcie ulega terminacji w miejscu terminatorowym  $t_R$ . Aktywacja tej tzw. transkrypcji późnej zależy od



Ryc. 1. Rejon lizy bakteriofaga  $\lambda$ .

Strzałki wskazują kierunek transkrypcji późnego operonu faga  $\lambda$ . Liczby odpowiadają pozycjom nt w sekwencji  $\lambda$ DNA [3]. W górnej linii podano nazwy produktów genów lizy i liczbę ich reszt aminokwasów (w nawiasach). Symbole: (▨), gen *Q*, kodujący białko antyterminatorowe; (○), nakładające się geny *S*, *R*, *Rz*, *Rz1* oraz gen *bor*, który ulega transkrypcji z drugiej nici DNA faga  $\lambda$  w przeciwnym kierunku w stosunku do transkrypcji genów *RzRz1* [37] i przypuszczalnie nie uczestniczy w lizie; (o), późny promotor; (x), późny terminator rozpoznawany przez produkt genu *Q*. (cyt. wg [40] za zgodą wyd.)

antyterminatorowego białka *Q* [4]. Powstający transkrypt koduje białka lizy, białka odpowiedzialne za pakowanie fagowego DNA oraz białka strukturalne główki i ogonka.

Transkrypcja późna zaczyna się ok. 8 min. po zakażeniu komórki *E. coli* fagiem lub po indukcji komórki lizogennej. Translacja ok. 25 genów kodowanych w późnym transkrypcie podlega skomplikowanej regulacji, w wyniku której poziom ekspresji poszczególnych genów może różnić się tysiąckrotnie [5-7]. Mechanizm tej potranskrypcyjnej regulacji nie jest znany i budzi zainteresowanie. Oczywiście, różne mechanizmy kontroli mogą dotyczyć różnych genów.

Seria prac z laboratoriów R. Younga (USA) i U. Bläsi'ego (Austria) dotyczy regulacji ekspresji genu *S*, pierwszego genu późnego transkryptu. R. Young omawia to zagadnienie w pracy przeglądowej [8], zwracając uwagę na możliwość występowania struktur drugorzędowych w sekwencji 598 nukleotydów między końcem 5' mRNA i kodonem inicjatorowym *S*, które mogłyby kontrolować translację genu *S* (Ryc. 3) [9]. Regulacja ekspresji genu *S* może mieć wpływ na ekspresję pozostałych genów lizy, *R*, *Rz* i *Rz1*.

Na uwagę zasługuje stwierdzenie, że produkt genu *R*, enzym bakteriolityczny o swoistości transglikozyazy mureinowej, jest syntetyzowany w wykrywalnych ilościach już 8 min po indukcji profaga [10], mimo że liza występuje dopiero ok. 45 min później. Wskazuje to na istnienie potranslacyjnego mechanizmu kontrolującego czas wystąpienia lizy. Według Bläsi'ego i wsp. [9, 11] główną rolę odgrywają w tym dwa produkty jednego genu *S*, S107, inhibitor lizy i S105, efektor lizy, oligomeryzujący w IM i w ten sposób tworzący w niej kanał dla translokacji produktu genu *R*, co stanowi wczesny etap lizy. Szczegóły dotyczące tego zagadnienia będą omówione w podrozdziale o genie *S* i białkach *S*.

Gen *S* zachodzi o 14 nukleotydów na gen *R* (Ryc. 1), można więc było oczekiwać, że translacja *S* ma wpływ na translację *R*. Z kolei sygnał terminacji translacji *R*, UGA, zachodzi na kodon inicjatorowy AUG(A) genu

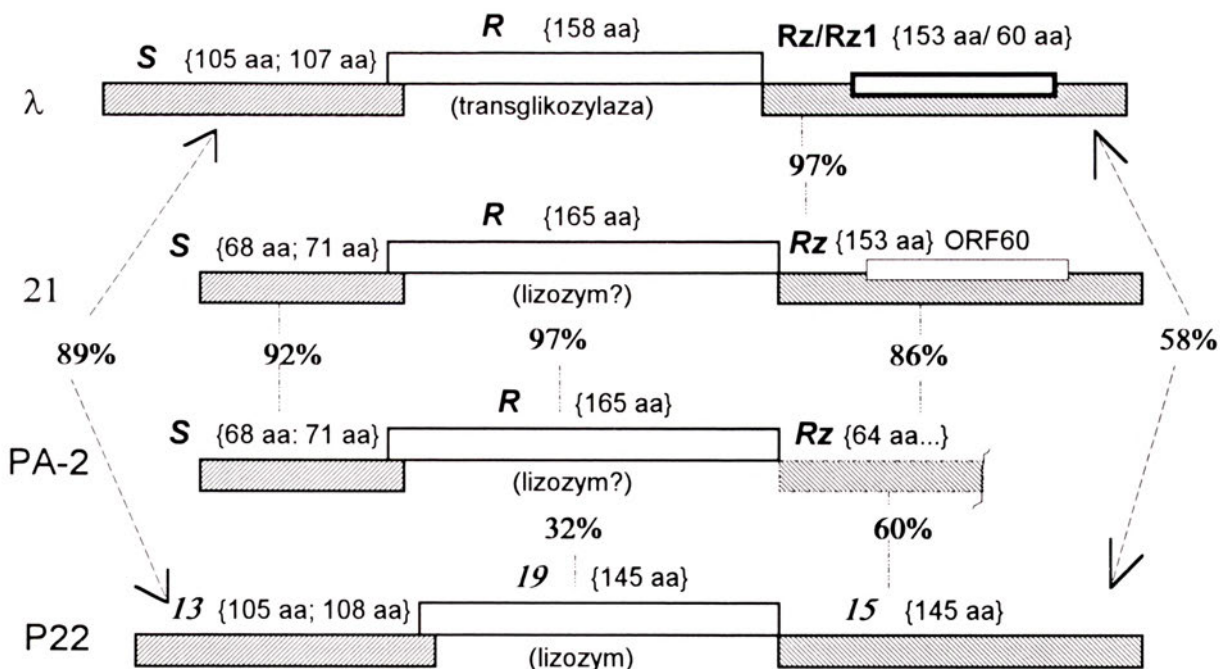
*Rz*, co sugeruje działanie mechanizmu reinicjacji translacji, polegającego na przesunięciu się małej podjednostki rybosomalnej po zakończeniu translacji genu bliższego końcowi 3' mRNA do następnego kodonu inicjacyjnego, bez odłączenia się od odczytywanego mRNA.

Gen *Rz1* znajduje się całkowicie wewnątrz genu *Rz*. Jest poprzedzony RBS, którego sekwencja pozwala sądzić, że jest to sygnał bardzo efektywny. Sekwencja ta -AAGGAG- jest bardzo zbliżona do sekwencji zgodności (consensus) i identyczna z występującą przed genem 10 faga T7 znanym z silnej ekspresji i dlatego używaną w plazmidzie ekspresyjnym pT7-7 [12].

Analogiczne geny, odpowiedniki *S*, *R* i *Rz* faga  $\lambda$ , występują także u innych fagów lambdoidalnych (Ryc. 2). Rycina 2 przedstawia geny rejonów lizy czterech fagów lambdoidalnych:  $\lambda$ , 21, PA-2 i P22 z uwzględnieniem podobieństwa między nimi, wyrażonego w procentach. Gen *Rz* spośród genów lizy wykazuje najwyższy stopień ewolucyjnego konserwatywności [8]. Interesujący jest fakt, że ORF dla białka 6,5-kDa, które byłoby analogiem *Rz1* jest również obecna w genie *Rz*<sup>21</sup> i to w tej samej pozycji jak w  $\lambda$ *Rz*. ORF (*Rz*<sup>21</sup>) jest w 98% homologiczna w sekwencji nukleotydowej z  $\lambda$ *Rz* (dane uzyskane z bazy danych EMBL; program FASTA). Ponadto sekwencja *Rz*<sup>21</sup> jest poprzedzona identyczną sekwencją SD (-AAGGAG) w odległości — 7 nukleotydów od kodonu AUG.

## II-1. Białka S105 i S107, produkty jednego genu o antagonistycznych funkcjach fizjologicznych

Gen *S* składa się z 321 par nukleotydów, co odpowiada 107 kodonom w mRNA. Obliczona na tej podstawie masa jego produktu białkowego wynosi 11.6-kDa, ale ciężar cząsteczkowy *S* wyznaczony na podstawie ruchliwości elektroforetycznej w żelu SDS-polikarylamidowym odpowiada 8500. Białko *S* niezbędne jest do wywołania lizy bakterii *E. coli*, [13]. Inaktywacja genu *S* sprawia, że po indukcji lizogenu



Ryc. 2. Geny rejonów lizy bakteriofagów lambdoidalnych: λ, 21, PA-2 i P22.

Geny „kasyety litycznej” przedstawiono w postaci prostokątów; obok podano ilość reszt aminokwasowych ich produktów. Stopień podobieństwa odpowiadających sobie białek podano w %; sekwencje aminokwasów wyznaczono na podstawie sekwencji nukleotydów odpowiednich genów. Strzałki umieszczone na zewnątrz wskazują podobieństwo między parami odpowiadających sobie genów, S faga λ i 13 faga P22 oraz λRz i 15 faga P22. Nie stwierdzono żadnego podobieństwa między genami R i 19 fagów λ i P22. Produktem genu λR jest transglikozylaza, natomiast genu 19 faga P22, lizozytm. Produkty genów R fagów 21 i PA-2 nie zostały zidentyfikowane. Sekwencja Rz faga PA-2 nie została do końca poznana. W genie Rz faga 21 jest obecna ORF60 dla białka 6.5-kDa, które byłoby analogiem produktu genu Rz1 faga λ. (cyt. za [8] zmodyfikowane)

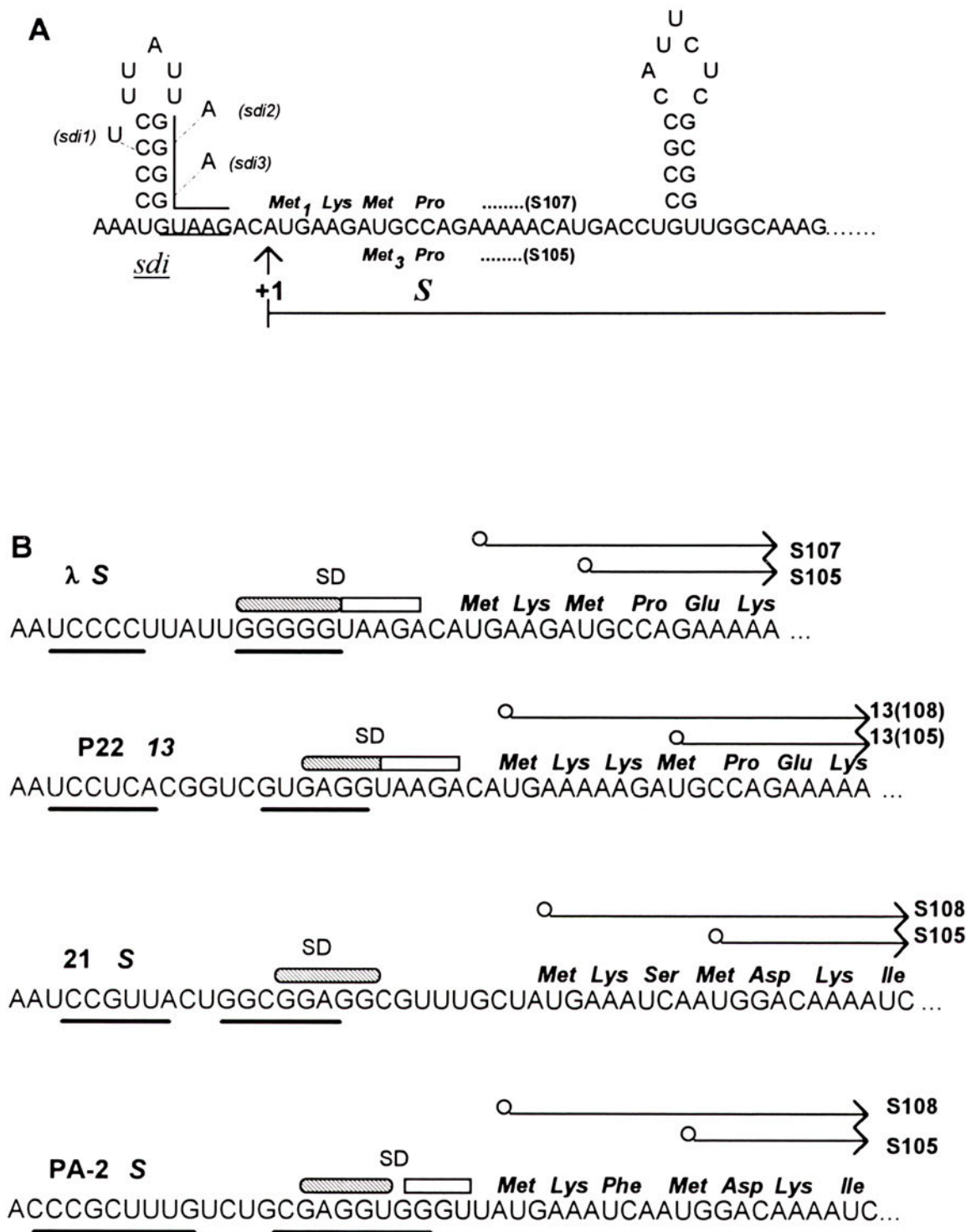
procesy metaboliczne: oddychanie, syntezy makrocząsteczek są kontynuowane w czasie, w którym w komórce zakażonej λwt zostałyby zahamowane i wystąpiłaby liza [14, 15]. W cytoplazmie *E. coli* (λS<sup>-</sup>) gromadzą się dojrzałe fagi oraz endolizyna w ilości znacznie większej niż przy zakażeniu λwt [15, 16]. Nazwa endolizyna, oznacza aktywność bakteriolityczną, która może zależeć od dwóch enzymów: produktu genu λR, transglikozylazy, a możliwe, że także od produktu genu Rz, który mógłby mieć aktywność endopeptydazy. Ta ostatnia hipoteza nie została udowodniona [17]. Dodanie chloroformu do indukowanych hodowli lizogenów λS<sup>-</sup> wywołuje prawie natychmiastową lizę bakterii, co sugeruje, że białko S musi wpływać na przepuszczalność IM [15, 18] i uczestniczyć w transporcie transglikozylazy do jej substratu, mureiny, który znajduje się w przestrzeni periplazmatycznej [13]. Te właściwości mutantów λS decydują o ich praktycznym zastosowaniu do otrzymywania dużych ilości faga λ lub wektorów skonstruowanych z DNA faga λ.

Problemy związane z detekcją małego, występującego w niewielkich ilościach, letalnego i względnie nieimmunogennego białka jakim jest białko S sprawiły, że w ciągu długich badań amerykańskich laboratoriów R. Younga i D. Wilsona, za produkt genu S uważano kolejno 6 różnych polipeptydów (!).

W myśl pierwszej propozycji Wilsona [19] produktami genu S były dwa białka znacznie różniące się ciężarem cząsteczkowym, subkomórkową lokalizacją i funkcją im przypisywaną. Jeden z polipeptydów o M<sub>r</sub>

15000 zlokalizowano w IM komórki zakażonej fagiem λ i uważano, że jest on odpowiedzialny za podwyższoną przepuszczalność IM dla związków drobnocząsteczkowych [19, 20]. Według tych autorów drugi polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 5500 występował w dużej ilości kopii w oczyszczonych wirionach i przypisywano mu udział w naprawie uszkodzeń IM, wywołanych wprowadzeniem DNA faga λ [20]. A l t m a n i w s p. [21] z produktem genu S zidentyfikowali białko o masie 8.5-kDa, które występowało w osłonie komórki bakteryjnej. Istotny postęp wniosła praca Zagotty i Wilsona [22], którzy potwierdzili poprzedni wynik (8.5-kDa) metodami immunologicznymi dzięki otrzymaniu przeciwciał anti-S. Różnicę pomiędzy ciężarem cząsteczkowym S, zidentyfikowanym (8.5-kDa) a obliczonym na podstawie sekwencji nukleotydowej genu S (11.6-kDa) tłumaczono nietypowym wiązaniem SDS do silnie hydrofobowego białka S. Jednak nie jest wykluczona proteolityczna modyfikacja potranslacyjna białka S.

Analiza genetyczna mutantów S ujawniła nieoczekiwaną złożoność ekspresji genu S [10, 23]. Według tych autorów ekspresja genu S jest kontrolowana na poziomie translacji przez drugorzędową strukturę mRNA, sekwencję *sdi* [9, 11]. Miejsce *sdi* (Ryc. 3A), obejmuje dwie struktury „szpilek do włosów” oraz dwie połączone sekwencje SD, które odpowiedzialne są za inicjację translacji od kodonu Met1 lub Met3 [11]. Zatem z tej samej ramy odczytu genu S mogą powstać dwa polipeptydy: S107 (start od Met1) i S105 (start od Met3), które różnią się tylko obecnością reszt



Ryc. 3. A — Region regulatorowy (*sdi*) genu *S*

Przedstawiono dwie struktury „szpilek do włosów” oraz połączone sekwencje SD (GGGGG i UAAG) odpowiednio dla inicjacji translacji od kodonu *Met1* i *Met3*. Powyżej sekwencji mRNA podano sekwencję N-terminalną białka S107 (inhibitora lizy), a poniżej S105 (efektora lizy). (*sdi1*), (*sdi2*), (*sdi3*) — miejsca mutacji punktowych, które umożliwiły określenie sekwencji *sdi* (*structure directed initiation*), regulującej częstotliwość inicjacji translacji od AUG<sub>1</sub> (*Met1*) lub AUG<sub>3</sub> (*Met3*) [10]; B — Motyw podwójnego startu translacji genów o funkcji analogicznej do funkcji genu *S* faga λ [cyt. za 8]. Przedstawiono regiony inicjacji translacji i N-terminalne sekwencje produktów genów *S* fagów lambdoidalnych: λ, 21 i PA-2 oraz faga P22, dla którego gospodarzem jest *Salmonella typhimurium*. Strzałki, (o→), wskazują ramy odczytu produktów genów *S*; struktury *sdi* zostały podkreślone, w nawiasach podano liczby reszt aminokwasowych odpowiednich białek. Występowanie motywu podwójnego startu translacji zostało poparte doświadczeniem tylko w przypadku fagów λ i P22. W pozostałych przypadkach obecność motywu podwójnego startu translacji wywnioskowano z sekwencji nukleotydowej genów *S*. (cyt. wg [8] za zgodą wyd.)

Met<sub>1</sub>-Lys<sub>2</sub> przy końcu N-terminalnym w S107 [9-11].

Analogiczny model podwójnego startu translacji genów o funkcji analogicznej do *S* jest zachowany wśród fagów lambdoidalnych [8, 25, 26] (Ryc. 3B).

Wykazano, że białka S107 i S105 w procesie lizy

pełnią funkcje antagonistyczne [9]: S107 jest inhibitorem polipeptydu S105, którego aktywność jest letalna dla komórki. Istnieje korelacja między czasem lizy a ilościowym stosunkiem inhibitora (S107) do letalnego efektora (S105) [9, 11, 24].

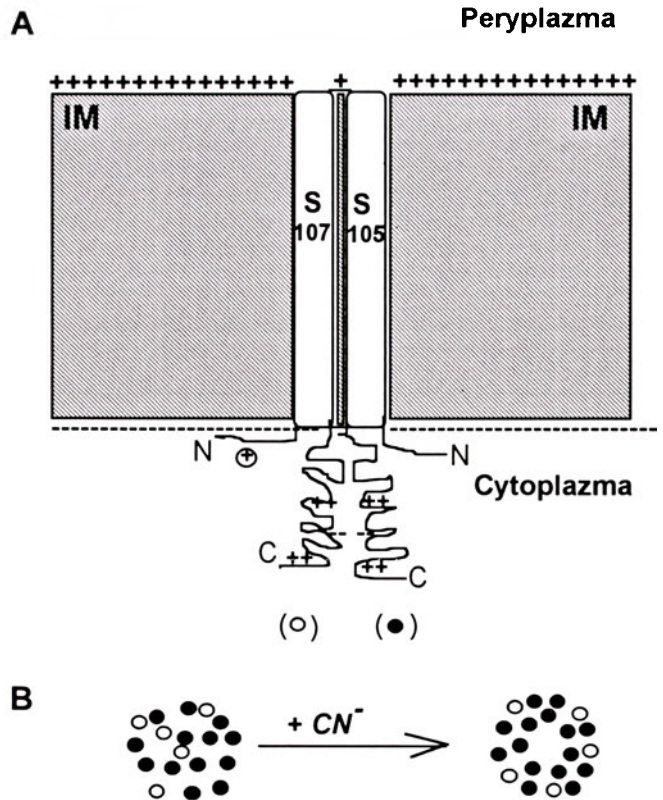
Na podstawie doświadczeń fizjologicznych i genetycznych opracowano model działania białka S zgodnie z którym, ulegając oligomeryzacji tworzyłoby ono pory w IM, co umożliwiłoby endolizynie faga  $\lambda$  dotarcie do mureiny [10, 14, 19]. Model ten został uzupełniony przez Nam i w s p. [25] oraz Bläsi'ego i w s p. [11], którzy sugerują, że S107 tworząc heterooligomery z S105 hamuje powstawanie porów w IM, przez ograniczenie poprzecznej dyfuzji monomerów S105. Według tego modelu dodatnio naładowana reszta Lys<sub>2</sub> białka S107, oddziałując z ujemnie naładowaną powierzchnią IM, ogranicza możliwość przegrupowania heterooligomerów i w związku z tym hamuje formowanie porów. Jest to próba wyjaśnienia hamującej funkcji S107 (Ryc. 4B). Autorzy proponują dwustopniowy model, działania produktów genu S: 1) dwa produkty genu S, S105 i S107 tworzyłyby w pierwszej kolejności heterooligomeryczne, nieaktywne pory w IM; 2) po przegrupowaniu się monomerów S wewnątrz pory tworzyłyby się funkcjonalne pory, umożliwiające translokację produktu genu R, transglikozylazy, do periplazmy. Autorzy sugerują również, że po zneutralizowaniu potencjału błony działaniem np. KCN, S107 zachowuje się jak letalne białko S105, uczestnicząc w tworzeniu aktywnego kanału [11] (Ryc. 4). Model ten jest o tyle niepełny, że nie uwzględnia roli białek Rz i Rz1 lokalizujących się w błonach bakteryjnych.

Można by podsumować, że letalność produktu genu S i jego udział w lizie polega na uszkodzeniu IM, umożliwiającym translokację endolizyny do mureiny zlokalizowanej w periplazmie *E. coli*. R. Young preferuje nazwę „holes” (otwory) nie pory, gdyż trudno na razie zdefiniować strukturę uszkodzeń IM przez S107/S105 [24]. Young i Bläsi proponują, aby fagowe białka zaangażowane w tworzenie „holes” nazwać „holins” [24].

## II-2. Białko R, enzym rozszczepiający wiązania $\beta$ -1,4-glikozydowe przez transglikozylację

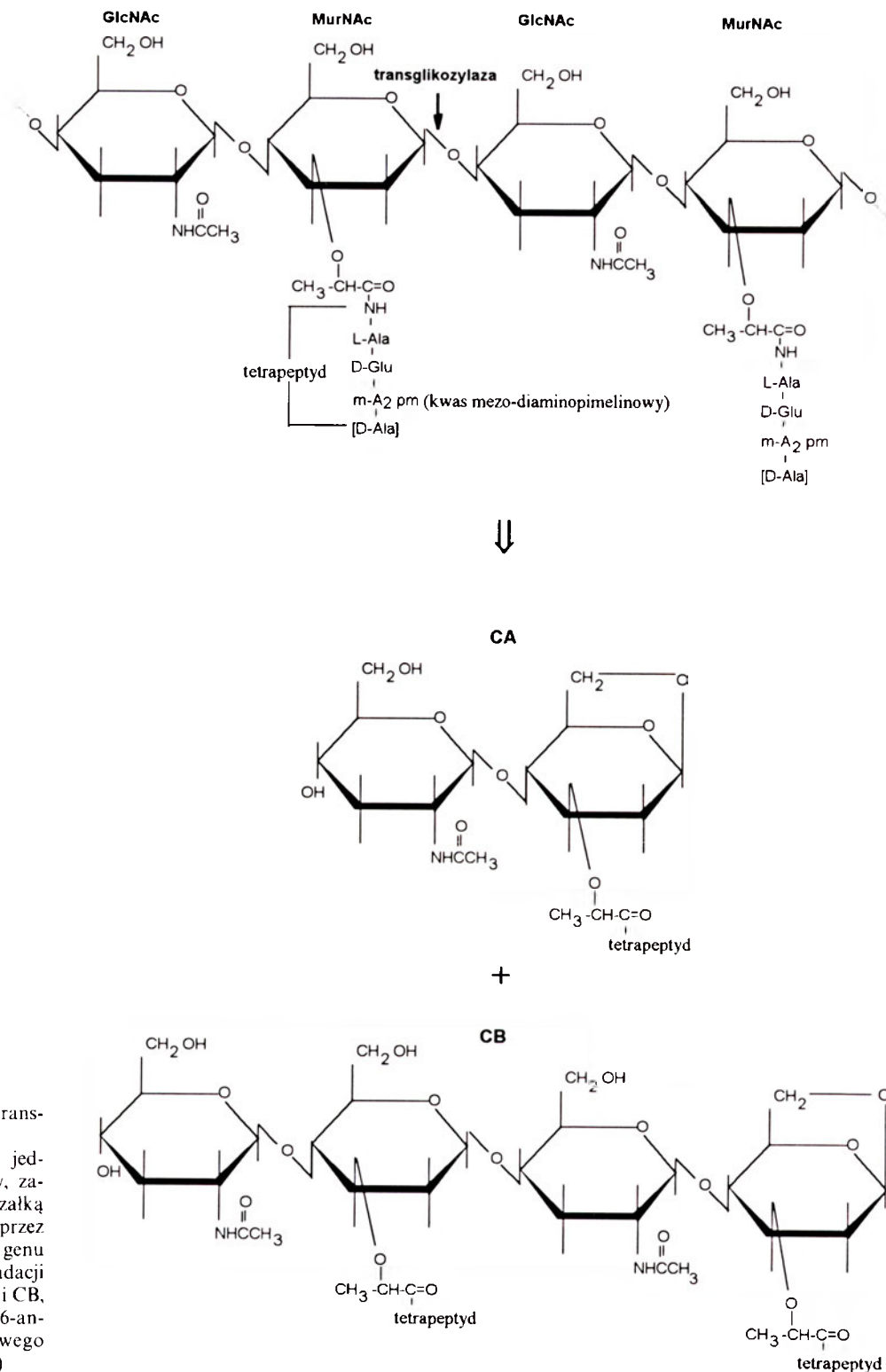
Gen R jest drugim w kolejności genem późnego transkryptu. Koduje enzym bakteriolityczny, transglikozylazę. Aktywność bakteriolityczna faga  $\lambda$  została przypisana produktowi genu R przez Campbell i [27] i oczyszczona z lizatów do homogenności przez Black i Hogensa [28]. Jednak, nie określono wówczas specyficzności enzymu bakteriolitycznego.

We wczesnych pracach zwrócono uwagę na brak własności redukcyjnych produktów degradacji mureiny przez badany enzym co odróżniało jego swoistość od lizozymu. W lizatach indukowanych *E. coli* ( $\lambda$ ) wykryto aktywność endopeptydazy, którą mylnie przypisano produktowi genu R [29]. W 1974 r. zbadano strukturę chemiczną nieredukujących produktów reakcji badanego enzymu (muropeptydów CA i CB; Ryc. 5) korzystając ze spektrometrii masowej. Okazało się, że występuje w nich kwas  $\beta$ -1,6-anhyd-



Ryc. 4. Model wyjaśniający działanie białka S107 jako inhibitora lizy  
(A) Heterooligomery S105/S107 tworzą się w IM. Dodatnio naładowana reszta Lys<sub>2</sub> (oznaczona  $\oplus$ ) białka S107 oddziałuje z ujemnie naładowaną powierzchnią IM, ograniczając w ten sposób poprzeczną dyfuzję heterooligomerów S105/S107 i hamując powstawanie porów (tworząc niefunkcjonalne pory).  
(B) Neutralizacja potencjału błonowego przez działanie inhibitorów oddychania, np. KCN lub utworzenie funkcjonalnej pory S (tzn. zniesienie jonowego oddziaływania między resztą Lys<sub>2</sub> białka S107 i IM) pozwala na reorganizację S105/S107 wymieszanych oligomerów. Przegrupowanie zachodzi dzięki poprzecznej dyfuzji i prowadzi do utworzenia funkcjonalnej pory. ● — cząsteczka S105, ○ — cząsteczka S107. (cyt. za [11] zmodyfikowane)

ro-N-acetylmuraminowy, co tłumaczyło brak własności redukcyjnych [30, 31]. Wskazuje to, że mechanizm rozszczepienia mureiny przez produkt genu R polega na transglikozylacji, a nie hydrolizie wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych jak w przypadku działania np. lizozymu faga T4 lub lizozymu kurzego. Transglikozylacja polega na przeniesieniu grupy wodorotlenowej związanej z węglem pierwszym reszty kwasu N-acetylmuraminowego mureiny na węgiel szósty tej samej cząsteczki, z utworzeniem pierścienia kwasu  $\beta$ -1,6-anhydro-N-acetylmuraminowego. Było to zaskakującym odkryciem, gdyż wcześniej nie znano enzymów tego typu a enzymy, rozkładające wielocukry klasyfikowały się do hydrolaz (EC 4.2.1) lub liaz (EC 4). Na podstawie tych prac zidentyfikowano później enzymy bakteryjne o analogicznej swoistości transglikozylaz [32, 33]. Wobec występowania w lizatach *E. coli* dwóch enzymów, dla których substratem jest mureina (transglikozylazy i endopeptydazy) pracowano dalej nad identyfikacją produktu genu R. K. Bieńkowski - Szezyk oczyszczając produkt bakteriolity-



**Ryc. 5.** Reakcja katalizowana przez transglikozylazę faga  $\lambda$ . Przedstawiono podstawową jednostkę strukturalną murciny, zaznaczając pogrubioną strzałką wiązanie rozszczepiane przez transglikozylazę, produkt genu *R* faga  $\lambda$ . Produktem degradacji murciny są muropeptydy CA i CB, zawierające reszty kwasu  $\beta$ -1,6-anhydro-N-acetylmuraminowego (cyt. za [30] zmodyfikowane)

czny z lizatów *E. coli* ( $\lambda$ c1857) obserwowano wspólne oczyszczanie się (*copurification*) obu aktywności, jednak po czterech stopniach oczyszczania na kolumnach chromatograficznych udało się uzyskać homogeny preparat transglikozylazy wolny od endopeptydazy [17]. Następnie dostarczono dowód, że transglikozylaza jest produktem genu *R* wykorzystując system minikomórek *E. coli* su<sup>o</sup> minA minB, pozbawionych własnego, chromosomalnego DNA, do których wprowadzono DNA faga  $\lambda$  i uzyskano ekspresję genu transglikozylazy [34].

Transglikozylaza faga  $\lambda$  jest syntetyzowana w cyto-

plazmie komórki i nie posiada N-terminalnej sekwencji sygnałowej, charakterystycznej dla białek sekrecyjnych. Z kolei jej substrat, muraina, znajduje się w przestrzeni periplazmatycznej, zatem pozbawiona peptydu sygnałowego transglikozylaza nie jest zdolna do pokonania bariery, między cytoplazmą a periplazmą jaką tworzy IM. Niezbędna w tym etapie jest aktywność białka S [9, 14, 15, 19].

Dwa produkty białkowe S i R, kodowane przez genom fagowy są niezbędne i wystarczające do przeprowadzenia lizy komórki *E. coli* przy niskich stężeniach Mg<sup>2+</sup> w podłożu (poniżej 10 mM). Natomiast,

Young i w s p. [35] wykazali, że w obecności jonów  $Mg^{2+}$  ( $< 10$  mM), które stabilizują bakteryjną błonę zewnętrzną, niezbędna staje się funkcja trzeciego genu z rejonu lizy, genu *Rz*. Jak się okazało później funkcja ta może zależeć od dwóch genów *Rz* i wykrytego przez nas genu *Rz1* [2].

### II-3. Lokalizowane w błonach bakteryjnych białka *Rz* i *Rz1*; rola białka *Rz1* w fuzji błon bakteryjnych

Gen *Rz* bakteriofaga  $\lambda$  został wykryty w 1979 r. przez Younga i w s p. [35]. W wyniku wprowadzenia transpozonu Tn903 (kan) w pozycji 0.951 i 0.952 mapy fizycznej faga  $\lambda$  uzyskano nowy rodzaj mutantów o upośledzonej zdolności lizy:  $\lambda dk23_{0.951}$  i  $\lambda dk6_{0.952}$ . Insercję transpozonu Tn903 w fagu  $\lambda dk23$  zlokalizowano przeprowadzając klonowanie w plazmidzie pBR327 i sekwencjonowanie fragmentu DNA, obejmującego miejsce złączenia  $\lambda$ DNA z Tn903 [36]. Pozwoliło to na określenie położenia genu *Rz* pomiędzy nukleotydami 45966-46425 genomu faga  $\lambda$ . Kodon AUG(A) genu *Rz* zachodzi na kodon terminacyjny UGA [3] poprzedzającego go genu *R*, kodującego omawianą wcześniej transglikozylazę (Ryc. 1). Między nukleotydami 46752 i 46461 położony jest gen *bor*, który ulega transkrypcji z drugiej nici, w kierunku przeciwnym do kierunku transkrypcji genu *Rz* [37] (Ryc. 1). Ramy odczytu genów *Rz* i *bor* są oddzielone 34 nukleotydami, z których 26 stanowi sekwencję palindromową. W próbach wyjaśnienia roli genu *bor* uzyskano dowody, że ulega on ekspresji podczas rozwoju lizogennego faga  $\lambda$  oraz, że ekspresja genu *bor* znacząco zwiększa przeżywalność bakterii *E. coli*( $\lambda$ ) w surowicach zwierząt. Na podstawie sekwencji nukleotydowej *bor* określono  $M_r$  jego produktu 10 387 [37]. Z analizy sekwencji aminokwasowej wynikało, że białko Bor posiada N-terminalną sekwencję sygnałową typową dla lipoprotein [37]. W ostatniej pracy Barondess i Beckwith [38] wykazali, że produkt genu *bor* jest rzeczywiście lipoproteiną zlokalizowaną w OM *E. coli*.

Fenotypowym objawem mutacji w genie *Rz* są bardzo drobne lysinki i o połowę niższa wydajność namnażania fagów w porównaniu z wydajnością szczepu dzikiego [35]. W hodowli płynnej efekt mutacji w genie *Rz* można obserwować w obecności jonów  $Mg^{2+}$  w stężeniu 10 mM i wyższym [35]. Komórki zakażone mutantem  $\lambda Rz^-$  w tych warunkach nie ulegają lizie, lecz zmieniają kształt z pałeczkowatego na kulisty, tworząc formy podobne do sferoplastów, które po usunięciu  $Mg^{2+}$  natychmiast ulegają lizie [35].

Produktem genu *Rz* jest białko o  $M_r$  17 200. Białko *Rz* jest syntetyzowane w niewielkich ilościach w komórkach *E. coli*( $\lambda$ ), posiada sekwencję transbłonową, która mimo podobieństwa do sekwencji sygnałowych nie jest odcinana i służy do zakotwiczenia *Rz* w błonach [2, 39]. Przeważająca część białka *Rz* występuje

w miejscach adhezji błony wewnętrznej (IM) i zewnętrznej (OM) [39].

Badając ekspresję genu *Rz* wykazaliśmy, że rejon lizy faga  $\lambda$  zawiera nowy gen, który oznaczyliśmy *Rz1* [2].

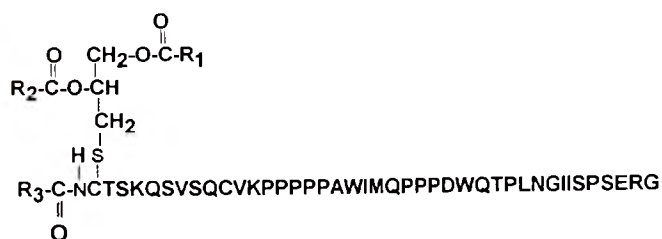
Produktem genu *Rz1* jest białko prekursorowe, syntetyzowane z 19-aminokwasową sekwencją sygnałową, typową dla lipoprotein i w związku z tym odcinaną przez peptydazę sygnałową II [40]. Potwierdzono to w dwóch różnych doświadczeniach: a) znakując komórki *E. coli*, zawierające klonowany gen *Rz1*, trytowanym kwasem palmitynowym i b) traktując je inhibitorem peptydazy sygnałowej II, globomycyną [40]. W komórkach bakteryjnych traktowanych globomycyną akumuluje się forma prekursorowa lipoproteiny [40a].

Ostateczny dowód, że sekwencja sygnałowa *Rz1* jest odcinana, uzyskano w wyniku mikrosekwencjonowania N-terminalnej części białka *Rz* [40].

Produkt dojrzały genu *Rz1* jest lipoproteiną zlokalizowaną w błonie zewnętrznej komórki *E. coli* [40]. W celu określenia lokalizacji białka *Rz1* w komórce *E. coli* wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko syntetycznej determinancie antygenowej badanego białka. Determinantę antygenową:  $_{46}WQTPNGIIS-PSERG_{60}$  wyznaczono na podstawie programu komputerowego. Następnie przeprowadzono syntezę 15 aa sekwencji immunogennej białka *Rz1* i reakcję sprzęgnięcia jej końca N-terminalnego z albuminą surowicy krwi bydlęcej [40].

Część lipidowa dojrzałego białka *Rz1* zawiera diacyloglicerol połączony wiązaniem tioeterowym z resztą N-terminalnej cysteiny oraz resztę kwasu tłuszczowego, przypuszczalnie palmitynowego, związaną wiązaniem amidowym poprzez N-terminalną grupę aminową tej samej reszty cysteiny (Ryc. 6).

Część peptydowa *Rz1* złożona jest z 41 aa, w tym trzy o ładunku dodatnim (K, K, R), dwa o ujemnym (D, E). Zwraca uwagę wysoka zawartość proliny, która stanowi ok. 25% składu aminokwasowego. W białku *Rz1* nie występuje fenyloalanina, histydyna i tyrozyna. Aminokwasy hydrofobowe stanowią 48,8%, hydrofilowe 51,2%. Punkt izoelektryczny (pI) dojrzałego białka wyznaczony przy pomocy programu komputerowego wynosi 8,33. Analiza komputerowa sekwencji



Ryc. 6. Budowa chemiczna produktu genu *Rz1*.

W lipoproteinie *Rz1* N-terminalna reszta Cys jest zmodyfikowana przez diacyloglicerol połączony wiązaniem tioeterowym i resztę kwasu tłuszczowego, związaną wiązaniem amidowym  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  — reszty kwasów tłuszczowych. Sekwencja aminokwasowa części peptydowej *Rz1* została wprowadzona do bazy danych „GenBank” (USA) pod numerem U37314. (cyt. wg [40] za zgodą wyd.)

Rz1 wg Garniera wskazała, że w peptydzie tym nie występuje konformacja  $\alpha$ -helikalna, natomiast 56% stanowi konformacja  $\beta$ -harmonijki i 26,8%  $\beta$ -skręty, pozostałe 17% opowiada układom nieregularnym. Pod względem dominacji konformacji  $\beta$ -harmonijki i skrętów część peptydowa Rz1 przypomina białka poryn OM [41], które nie są jednak lipoproteinami.

Funkcje Rz i Rz1 pozostają na razie nieudowodnione. Można jednak uważać, że uczestniczą one w lizie. Wskazuje na to efekt mutacji w genie *Rz* opisany przez Younga i wsp. [35] oraz lokalizacja genów *Rz/Rz1* w rejonie lizy genomu faga  $\lambda$ . Jak wiadomo, geny faga  $\lambda$  są ułożone w zespołach funkcjonalnych. Nie jest jednak wykluczone, że mają one także inne znaczenie dla rozwoju faga  $\lambda$ , jak np. gen *bor* faga  $\lambda$ , którego ekspresja, jak wspomniano wcześniej, zwiększa przeżywalność komórki lizogennej w surowicy zwierzęcej [37] i wywołuje tzw. konwersję lizogeniczną. Konwersja polega na zmianie struktury receptora  $\lambda$ , co uniemożliwia nadkażenie komórki lizogennej. Białko Bor jest lipoproteiną [38] podobnie jak Rz1.

Lokalizacja Rz w strefach adhezji IM i OM oraz Rz1 w OM może być sugestią, że znaczne zwiększenie stref adhezji błon po indukcji profaga tuż przed wystąpieniem lizy, które zostało opisane wcześniej przez Kucharczyka i wsp. [42] może być wynikiem bezpośrednim działania tych białek. Ekspresja klonowanego genu *Rz1* w komórkach *E. coli* wywoływała powstawanie frakcji błon o tych samych własnościach sedymentacyjnych jak opisana przez Kucharczyka i wsp. [40] frakcja zawierająca strefy adhezji błon. Zaburzenie struktury błon przez Rz i Rz1 może być niezbędne dla pełnej destrukcji osłony bakteryjnej, czyli efektywnej lizy wywoływanej przez faga  $\lambda$  dla uwolnienia potomstwa fagowego. Warto tutaj przypomnieć, że fenotyp mutantów *Rz/Rz1* polega na uzależnieniu wystąpienia lizy od nieobecności jonów  $Mg^{2+}$  w podłożu (str. 8). Na razie nie można odpowiedzieć na pytanie, czy powiększenie stref adhezji sprzyja wpływowi komórkowych jonów  $Mg^{2+}$ , co przyczyniałoby się do śmierci komórki, zakłócając liczne procesy komórkowe zależne od  $Mg^{2+}$ , np. wywołując destrukcję rybosomów i tym samym uniemożliwiając naprawę uszkodzeń osłony komórkowej. Wyjaśniałoby to spostrzeżenie, że dodanie jonów  $Mg^{2+}$  z zewnątrz hamuje lizę, wywoływaną przez faga  $\lambda$ .

Z naszych doświadczeń nad frakcjonowaniem błon bakteryjnych w gradientach gęstości sacharozy wynika, że oprócz produktów genów *Rz* i *Rz1* także inne białka, kodowane w późnym transkrypcie faga  $\lambda$  mogą mieć zdolność powiększania stref adhezji OM i IM, ponieważ odpowiadająca tym strefom frakcja A [42] powstawała także po indukcji profaga  $\lambda\Delta SRRzRz1$  [43]. Tworzenie się takiej frakcji jest cechą charakterystyczną lizę, wywoływaną nie tylko przez faga  $\lambda$ . Podobny obraz frakcjonowania błon *E. coli* po zakażeniu fagiem T4 opisali Fletcher i Earhardt [44], fagiem  $\phi X174$ , Lubitz i wsp. [45] oraz fagiem

MS2, Walderich i wsp. [46, 47]. Lokalizację fagowego białka litycznego wewnątrz strefy adhezji stwierdzono w przypadku litycznego białka L faga MS2 [46] i białka I faga fl [48]. W tym ostatnim przypadku wykazano, że białko I indukuje powstawanie stref adhezji, zapoczątkowując proces morfogenezy faga fl. Wynika z tego, że różne białka fagowe mogą wywoływać adhezję błon. Nie wiadomo jednak, jakie elementy strukturalne tych białek mogą być za taki efekt odpowiedzialne.

Warto zwrócić jeszcze uwagę na ciekawą cechę lipoproteiny Rz1, wysoką zawartość reszt proliny. Białka prolinowe wzbudzają ostatnio duże zainteresowanie, gdyż przypisuje się im wspólną cechę uczestniczenia w kontaktach białko-białko lub białko-struktury subkomórkowe. Williams [49] przedstawia ich własności w pracy przeglądowej. Zwraca uwagę, że kilka reszt proliny obok siebie tworzy strukturę rozciągniętej helisy, tzw. helisy poliprolinowej II. Struktura taka występuje w większości przypadków na powierzchni białka, stanowiąc jego ramię umożliwiające szybkie i odwracalne oddziaływanie z innymi białkami lub strukturami subkomórkowymi. W związku z tym białka poliprolinowe uczestniczą w tworzeniu szeregu funkcjonalnych kompleksów. Wydaje się, że omawiana cecha białek poliprolinowych jest zgodna z przypisywaną przez nas lipoproteinie Rz1 funkcją w tworzeniu miejsc adhezji błon OM i IM. Można by sądzić, że lokalizacja lipoproteiny Rz1 w OM, białka Rz w strefach adhezji IM i OM oraz białka S w IM wskazuje na ich związek funkcjonalny w translokacji transglikozylazy R do jej substratu, mureiny.

### III. Podsumowanie

Badania nad molekularnym mechanizmem destrukcji błony komórkowej *E. coli* wywoływanej przez faga  $\lambda$  wniosły szereg nowych danych o znaczeniu ogólnym. Aktywność bakteriolityczna produktu genu *R* wynika z działania nieznanego wcześniej enzymu katalizującego rozszczepienie wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych w mureinie przez transglikozylację, z utworzeniem nieredukujących produktów zawierających resztę kwasu  $\beta$ -1,6-anhydro-N-acetylmuraminowego. W analogicznych produktach działania lizozymu (kurzego lub faga T4) na mureinę powstają produkty zawierające na końcu redukującym resztę kwasu N-acetylmuraminowego. Enzymy o analogicznej swoistości transglikozylaz wykryto później w bakteriach, ale dotąd nie wiadomo, czy poza bakteriami występują w naturze.

Badania nad mechanizmem transportu transglikozylazy R, enzymu bez sekwencji sygnałowej, przez IM do mureiny i związanej z tym kontroli czasu lizy doprowadziły do poznania interesującego mechanizmu regulacji tej funkcji fizjologicznej na poziomie translacji [9-11]. Polega on na syntezie dwóch antagonistycznie działających produktów jednego genu,



z różnych kodonów startowych w tej samej ramie odczytu. Jeden z nich byłby efektem lizy, tworząc warunki translokacji białka R przez IM, drugi inhibitorem tego procesu. Stosunek ilościowy tych produktów decydowałby o przyspieszeniu lub opóźnieniu czasu lizy.

W translokacji białka R mogą uczestniczyć niedawno wykryte białka Rz i Rz1 [2, 39, 40], produkty nakładających się genów faga  $\lambda$ , lokalizujące się w błonach bakteryjnych. Produkt genu *Rz1*, lipoproteina Rz1 o dużej zawartości proliny, nadprodukowana z plazmidu wywołuje adhezję IM i OM [40], co może mieć związek z translokacją białka R i wywołaniem lizy. Białka prolinowe wzbudzają ostatnio znaczne zainteresowanie ze względu na ich zdolność oddziaływania z innymi białkami i strukturami komórkowymi poprzez wyeksponowaną (najczęściej na powierzchni) sekwencję poliprolinową [49]. Może to mieć znaczenie dla rozwijających się technik ukierunkowanego dostarczania leków przy użyciu liposomów.

Praca finansowana w ramach grantu UG BW/0010-5-0226-5 i program BIMOL 20/93 Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

Artykuł otrzymano 1 lipca 1996 r.

Zaakceptowano do druku 16 września 1996 r.

## Piśmiennictwo

- Hershey AD and Dove W (1983) W: Hendrix RW, Roberts, JW, Stahl FW and Weisberg RA (red) *Lambda II*. CSH, Cold Spring Harbor Laboratory NY str 3-11
- Hanych B, Kędzierska S, Walderich B, Uznański B, Taylor A (1993) *Gene* **129**: 1-8
- Daniels DL, Schroeder J L, Szybalski W, Sanger F, Coulson AR, Hong G F, Hill D F, Petersen G B, Blattner F R (1983) W: Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW and Weisberg RA (red) *Lambda II*. CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, str 519-661
- Friedman DJ, Gottesman M (1983) W: Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW and Weisberg RA (red) *Lambda II*. CSH, Cold Spring Harbor Laboratory NY str 21-51
- Murialdo H, Siminovitch L (1972) *Virology* **48**: 785-823
- Suissa M, Altuvia S, Koby S, Giladi H, Oppenheim AB (1988) *Mol Gen Genet* **214**: 570-573
- Sampson LL, Hendrix RW, Huang WM, Casjens SR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5439-5443
- Young R (1992) *Microbiol Rev* **56**: 430-481
- Bläsi U, Nam K, Hartz D, Gold L, Young R (1989) *EMBO J* **8**: 3501-3510
- Raab R, Neal G, Sohaskey Ch, Smith J, Young R (1988) *J Mol Biol* **199**: 95-105
- Bläsi U, Chang C-Y, Zagotta MT, Nam K, Young R (1990) *EMBO J* **9**: 981-989
- Studier W, Rosenberg AL, Dunn JJ, Dubendorf JW (1990) *Meth Enzymol* **185**: 60-89
- Garrett JM, Fusselman R, Hise J, Chiou L, Smith-Grillo D, Schulz J, Young R (1981) *Mol Gen Genet* **182**: 326-331
- Reader WR, Siminovitch L (1971) *Virology* **43**: 623-637
- Garrett JM, Young R (1982) *J Virol* **44**: 886-892
- Mukherjee PK, Mandal RK (1976) *Biochem Biophys Res Commun* **70**: 302-309
- Bieńkowska-Szewczyk K, Taylor A (1980) *Biochim Biophys Acta* **615**: 489-496
- Barik S, Mandal NC (1982) *J Biosci* **4**: 361-368
- Wilson DB (1982) *J Bacteriol* **151**: 1403-1410
- Wilson DB, Okabe A (1982) *J Bacteriol* **152**: 1091-1095
- Altman E, Altman RK, Garrett JM, Grimaila R J, Young R (1983) *J Bacteriol* **155**: 1130-1137
- Zagotta MT, Wilson DB (1990) *J Bacteriol* **172**: 912-921
- Raab R, Neal G, Garrett J, Grimaila R, Fusselman R, Young R (1986) *J Bacteriol* **167**: 1035-1042
- Young R, Bläsi U (1995) *FEMS Microbiol Rev* **17**: 191-205
- Nam K, Bläsi B, Zagotta M, Young R (1990) **172**: 204-211
- Bonovich MT, Young RJ (1991) *J Bacteriol* **173**: 2897-2905
- Campbell A (1961) *Virology* **14**: 22-32
- Black L W, Hogness DS (1969) *J Biol Chem* **244**: 1968-1975
- Taylor A (1971) *Nature New Biol* **234**: 144-145
- Taylor A, Das BC, van Heijenoort J (1974) *CR Acad Sci Paris* **278**: 1127-1129
- Taylor A, Das BC, Van Heijenoort J (1975) *Eur J Biochem* **53**: 47-54
- Höltje J-V, Mirelman D, Sharon N, Schwarz U (1975) *J Bacteriol* **124**: 1067-1076
- Höltje J-V, Tuomanen EI (1991) *J Gen Microbiol* **137**: 441-454
- Bieńkowska-Szewczyk K, Lipińska B, Taylor A (1981) *Mol Gen Genet* **184**: 111-114
- Young R, Way J, Yin S, Syvanen M (1979) *J Mol Biol* **132**: 307-322
- Taylor A, Benedik M, Campbell A (1983) *Gene* **26**: 159-163
- Barondess JJ, Beckwith J (1990) *Nature (lond)* **346**: 871-874
- Barondess JJ, Beckwith J (1995) *J Bacteriol* **177**: 1247-1253
- Hanych B, Kędzierska S, Walderich B, Taylor A (1993) W: De Pedro M, Höltje J-V and Löffelhardt (red) *Bacterial growth and lysis: Metabolism and structure of the bacterial sacculus*. W Plenum Publishing Corporation NY str 269-276
- Kędzierska S, Wawrzynów A, Taylor A (1996) *Gene* **168**: 1-8
- Dev IK, Harvey RJ, Ray PH (1985) *J Biol Chem*. **260**: 5891-5894
- Nikaido H (1994) *J Biol Chem* **269**: 3905-3908
- Kucharczyk K, Laskowska E, Taylor A (1991) *Mol Microbiol* **5**: 2935-2945
- Taylor A, Kędzierska S, Wawrzynów A (1996) *Microbial Drug Resistance*. **2**: 147-153
- Fletcher G, Earhardt CF (1980) *Biochim Biophys Acta* **596**: 210-222
- Lubitz W, Schmid R, Plapp R (1981) *Current Microbiol* **5**: 45-50
- Walderich B, Ursinus-Wössner A, Van Duin, Höltje J-V (1988) *J Bacteriol* **170**: 5027-5033
- Walderich B, Höltje J-V (1989) *J Bacteriol* **171**: 3331-3336
- Horabin JJ, Webster RE (1988) *J Biol Chem* **263**: 11575-11583
- Williamson PM (1994) *Biochem J* **297**: 249-260

Please contact the Editors if you wish to advertise in „Postępy Biochemii” the products and services related to biochemistry, molecular biology and cell biology.

# Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy II

## Structure and function of the major histocompatibility complex (MHC) class II antigens

BOGDAN FALKIEWICZ<sup>1</sup>,  
BOGDAN LIBEREK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Ogólne informacje o MHC klasy II
- I-1. Molekularna funkcja cząsteczek MHC II
- I-2. Mechanizm obróbki peptydów prezentowanych przez białka MHC II
- II. Schemat budowy cząsteczek MHC klasy II
- III. Budowa szczeliny wiążącej peptydy
- IV. Antygenowe peptydy prezentowane przez cząsteczki MHC II
- V. Dimery cząsteczek MHC II
- VI. Oddziaływanie cząsteczek MHC II z superantygenami
- VII. Rozpoznanie kompleksu MHC II-peptyd przez TCR $\alpha\beta$
- VIII. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** AG — aparat Golgiego; APC — komórka prezentująca antygen (ang. *Antigen Presenting Cell*); Arg — arginina; Asn — asparagina; CD — kompleks różnicowania; CLIP — peptydy pochodzące z li i wiązane przez MHC II (ang. *class II associated invariant chain peptides*); DM — białko HLA-DM; DMA, DMB — odpowiednio łańcuch  $\alpha$  i  $\beta$  białka DM; ER — siateczka śródplazmatyczna; Gln — glutamina; HA — hemaglutynina wirusa grypy; Hb — hemoglobina; His — histydyna; HLA — antygeny ludzkich leukocytów (ang. *Human Leukocyte Antigens*); Hsp70 — białko szoku termicznego 70; IFN — interferon; li lub ln — łańcuch niezmienny; limfocyt T $\alpha\beta$  — limfocyt T posiadający receptor  $\alpha\beta$ -CD3; Lys — lizyna; MHC — główny kompleks zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*); Pn — n-ta reszta aminokwasowa w sekwencji prezentowanego peptydu; SAG — superantigen; SEA, SEB — enterotoksyny gronkowcowe A i B; TCR — receptor limfocyty T $\alpha\beta$ ; TGF $\beta$  — transformujący czynnik wzrostowy  $\beta$ ; TNF — czynnik martwicy nowotworu; Thr — treonina; Trp — tryptofan; TSST-1 — toksyna wstrząsu toksycznego 1; Tyr — tyrozyna.

### I. Ogólne informacje o MHC klasy II

Białka głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) wykazują wiele cech podobnych do białek klasy I [1], omówionych częściowo w poprzedniej pracy [2]. Są to także glikoproteiny powierzchniowe błon komórkowych, stanowiące heterodimery nieko-

### Contents:

- I. General information about the MHC class II molecules
- I-1. Molecular function of the MHC II antigens
- I-2. Processing of antigenic peptides presented by the MHC II proteins
- II. Structure of the MHC II molecules
- III. Structure of the binding groove and the mechanism of peptide presentation
- IV. Antigenic peptides bound by the MHC II molecules
- V. Dimers of the MHC II molecules
- VI. Interaction of the MHC II molecules with superantigens
- VII. Recognition of the MHC II-peptide complex by TCR $\alpha\beta$
- VIII. Concluding remarks

walencyjnie połączonych łańcuchów białkowych  $\alpha$  i  $\beta$ ; mają charakter alloantygenów.

W skład klasy drugiej ludzkich antygenów MHC (HLA) wchodzi trzy izotypy cząsteczek. Stanowią je produkty genów HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR. Region HLA-D, kodujący cząsteczki klasy II, znajduje się na chromosomie 6, centromerycznie w stosunku do regionu kodującego łańcuchy ciężkie klasy I. Zlokalizowane są w nim geny łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  cząsteczek klasy II, co różni te białka od antygenów MHC I. Antygeny MHC II to jedne z najbardziej polimorficznych białek, jakie dotychczas poznano [3]. Ich różnorodność jest skutkiem współistnienia przynajmniej trzech zjawisk: — obecności kilku genów kodujących podobne strukturalnie produkty (izotypy MHC II); — występowania wielu alleli pojedynczego genu; oprócz łańcucha  $\alpha$  cząsteczek HLA-DR każdy łańcuch białkowy HLA II może być kodowany przez różne allele; — występowania krzyżowego łączenia (transkomplementacji) pomiędzy produktami alleli łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  należącymi do różnych izotypów.

Cząsteczki klasy II występują na powierzchni grupy komórek obejmowanych nazwą APC. Są to makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty B. W wyniku oddziaływania niektórych cytokin, szczególnie IFN $\gamma$  i TNF, mogą się one pojawiać na innych rodzajach komórek [4]. Ujemnym regulatorem ekspresji MHC II są  $\alpha$ -fetoproteina, glikokortykosteroidy, wiele leków immunosupresyjnych, prostaglandyny i TGF $\beta$  [5-7].

<sup>1</sup> Mgr chemii, lek. med., <sup>2</sup> prof. dr hab. inż., Zespół Chemii Aminokwasów i Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk.

Cząsteczki klasy II w niewielkich ilościach obecne są w tzw. miejscach uprzywilejowanych immunologicznie, za wyjątkiem jąder [8]. Ich izotypy mogą być syntezowane selektywnie w danej komórce, tzn. mogą w niej powstawać cząsteczki tylko jednego lub dwóch izotypów; mogą też one występować na różnych poziomach ekspresji. Oznaczanie białek MHC II ma duże znaczenie w praktyce klinicznej, a przeprowadza się je metodami serologicznymi, komórkowymi i genetycznymi [9].

### I-1. Molekularna funkcja cząsteczek MHC II

Główną funkcją molekularną białek MHC obu klas jest wiązanie, transport i prezentacja na zewnętrznej powierzchni komórki antygenowych peptydów limfocytom  $T\alpha\beta$ . Cząsteczki klasy II różni funkcjonalnie od klasy I pochodzenie prezentowanych ligandów i populacja komórek rozpoznających (limfocyty  $T\ CD4+$ ). Białka MHC II wiążą oligopeptydy powstałe z antygenów białkowych podlegających obróbce na szlaku endocytozy. Większość pochodzi z białek potencjalnie endogennych dla komórki prezentującej (identycznych z występującymi w niej białkami) [10]. Najliczniej reprezentowane są produkty cięcia białek błonowych i endogennych białek endosomalnych i lizosomalnych [11]. Inne prezentowane białka komórkowe mogą się dostawać do endosomów w procesach autofagii własnych białek, endocytozy białek wydzielanych przez komórki sąsiednie lub poprzez bezpośredni transport wewnątrzkomórkowy. Źródłem mniejszej części prezentowanych peptydów są egzogenne białka pochłaniane przez komórki APC. Peptydy z białek egzogennych prezentowane są w większych ilościach jedynie wówczas, gdy białka te są obecne w środowisku zewnątrzkomórkowym w wysokich stężeniach lub gdy komórka ma receptory błonowe, służące ich endocytozie [11].

Drugim zadaniem MHC II, związanym z prezentacją peptydów pochodzących z własnych białek organizmu, jest udział w eliminacji limfocytów autoreaktywnych. W procesie selekcji negatywnej ulegają likwidacji klony tymocytów (prekursory limfocytów) rozpoznające peptydy pochodzące z białek endogennych. U człowieka selekcja odbywa się w grasicy, w trakcie rozwoju ontogenetycznego układu odpornościowego. Białka MHC obu klas są także kluczowym elementem selekcji pozytywnej, prowadzącej do różnicowania niedojrzałych  $CD4+CD8+$  tymocytów w dojrzałe limfocyty  $CD4+$  lub  $CD8+$  [12, 13].

Trzecia funkcja białek MHC II jest związana z ich rolą receptora, przekazującego sygnały do wnętrza komórki prezentującej [14].

### I-2. Mechanizm „obróbki” peptydów prezentowanych przez białka MHC II

Proces prezentacji peptydów przez białka MHC II

składa się z kilku etapów [15]. W przypadku antygenów pochodzących ze środowiska zewnątrzkomórkowego pierwszym jest jego endocytoza przez komórkę prezentującą. Powstały endosom wnika do wnętrza komórki, gdzie przechodzi dojrzewanie od wczesnego do późnego endosomu i lizosomu. W nich antygen białkowy podlega obróbce, polegającej m.in. na ograniczonej proteolizie do oligopeptydów. W lizosomach zachodzi głównie liza peptydów do dipeptydów i aminokwasów, jednak część peptydów przyłączanych do MHC II pochodzi z lizosomów, gdyż ma tam miejsce np. redukcja wiązań disulfidowych białek [16].

Po syntezie łańcuchy  $\alpha$  i  $\beta$  cząsteczek MHC II dzięki odcinkowi sygnałowemu przechodzą z cytoplazmy do wnętrza ER [11]. Sekwencje sygnałowe MHC II są następnie odcinane. Cechą charakterystyczną cząsteczek klasy II jest związek ich metabolizmu ze specyficznym białkiem nazwanym łańcuchem niezmiennym (Ii lub In) [17, 18]. Jest to jednołańcuchowa cząsteczka o niskim polimorfizmie, kodowana poza kompleksem MHC. Ii tworzy w ER trimery, powstające poprzez łączenie fragmentów C-końcowych domen tego białka [19]. Trimery Ii tworzą stechiometryczny kompleks z trzema dimerami  $\alpha\beta$  MHC II [20-22]. Wiążą się one z C-końcową domeną Ii i równocześnie wiążą N-końcową część Ii w swojej szczelinie wiążącej [19]. W formowaniu i utrzymywaniu kompleksów MHC-II-Ii we wnętrzu ER uczestniczy białko chaperonowe, kalneksyna [23]. W skład kompleksu mogą wchodzić różne izotypy MHC II [24]. Taki heteronamer transportowany jest do strefy dojrzewania lub strefy trans AG. We wnętrzu ER i cystern AG cząsteczki MHC II podlegają N-glikozylacji, łańcuch Ii N- i O-glikozylacji, ponadto w strefie trans następuje sialylacja wszystkich reszt cukrowcowych [25, 26]. Ze strefy dojrzewania AG kompleks MHC II-Ii przechodzi do przedziału endosomalnego, gdzie zachodzi przyłączenie peptydu do cząsteczki MHC II. Sygnał kierunkowy przemieszczający cząsteczki MHC II z ER do endosomów zawarty jest w początkowym odcinku Ii, dlatego w komórkach nie syntezujących Ii cząsteczki MHC II w większości gromadzą się wewnątrz ER [16]. Ii wpływa na właściwą drogę transportu, stabilizuje molekuly MHC II, prawdopodobnie pozwala na prawidłowe uformowanie szczeliny wiążącej peptydy i chroni cząsteczkę MHC II przed wiązaniem peptydów we wnętrzu ER (gdzie peptydy łączą się przede wszystkim z cząsteczkami MHC I, choć w pewnym stopniu także z MHC II [27]) [17]. W komórkach nie wykazujących ekspresji Ii cząsteczki MHC klasy II prezentowane są na powierzchni w znacząco mniejszej ilości, ponadto ich stabilność jest obniżona, co wynikać może z nieefektywnego wiązania peptydów [28-32].

Aby cząsteczka MHC II mogła opuścić endosomy, potrzebne jest oddzielenie Ii na drodze proteolizy [32]. Gdy do niego w pełni nie dochodzi, z połączenia z cząsteczkami MHC II izoluje się peptydy pochodzące

z fragmentu 81-104 N-końcowej domeny II, tzw. CLIP. W komórkach wykazujących defekt prezentacji antygenów wraz z MHC II, CLIP stanowią do 50% peptydów prezentowanych przez MHC II [33, 34]; prezentowane są jednak także przez część cząsteczek MHC II na niedefektywnych APC [35, 36]. CLIP łączą się z HLA-DR3 w szczelinie wiążącej MHC II, w sposób niemalże identyczny do ligandów peptydowych prezentowanych przez cząsteczki HLA-DR1 [37]. Blokują w ten sposób wiązanie peptydów antygenowych [34].

Do właściwego wiązania peptydów przez HLA II konieczna jest ekspresja nieklasyycznej cząsteczki klasy II, białka HLA-DM (jego mysim odpowiednikiem jest H-2M) [38-40]. Dwa łańcuchy białka DM kodowane są przez geny HLA-DMA i HLA-DMB, zlokalizowane w obrębie regionu HLA-D. HLA-DMA koduje łańcuch odpowiadający łańcuchowi  $\alpha$  MHC II, podczas gdy HLA-DMB odpowiednik łańcucha  $\beta$ . Białko DM potrzebne jest do oddzielenia CLIP od cząsteczki MHC II, w jego nieobecności cząsteczki MHC II prezentują głównie peptydy CLIP [41-44]. Jak się przypuszcza, oddziaływanie HLA II z DM faworyzuje dysocjację peptydów nie posiadających reszt kotwiczących optymalnych do wiązania z daną cząsteczką klasy II [37]. Cząsteczki DM są bardzo rzadko wykrywane na powierzchni komórek. Myszy pozbawione genu H-2M lub posiadające gen z mutacją w jednym z łańcuchów H-2M wykazują wyraźnie obniżoną zdolność do prezentacji egzogennych antygenów [45, 46].

Podczas przechodzenia kompleksu MHC II-II do przedziału proteolitycznego następuje odcięcie C-końcowego odcinka II i katalizowane przez DM uwolnienie miejsca wiążącego. II ma także autokatalityczny wpływ na swoją dysocjację [47]. Następnie dochodzi do wiązania odpowiedniego do prezentacji peptydu. Peptydy stabilizują strukturę heterodimeru MHC II [48]. Cząsteczka MHC II w pierwszej kolejności oddziaływać może z nie do końca pociętym łańcuchem białkowym, chroniąc swoją szczeliną wiążącą fragment komplementarny. Końce takich polipeptydów jeszcze przed opuszczeniem szlaku endocytarnego zostają częściowo przycięte [10].

Dyskutuje się możliwość przechodzenia cząsteczek MHC II do endosomów poprzez autofagię po wstępnej ekspresji na powierzchni komórki [49]. Białka MHC II mogłyby więc krążyć pomiędzy powierzchnią błony komórkowej i endosomami, „wymieniając” w endosomach prezentowane peptydy na inne. Prawdopodobnie jednak większość prezentowanych kompleksów MHC II-peptyd stanowi połączenie z cząsteczką MHC II zsyntezowaną *de novo* [50].

Z endosomów kompleksy MHC II-peptyd wracają do cystern AG lub przechodzą bezpośrednio na powierzchnię komórki. Proces od syntezy cząsteczki MHC II do jej ekspresji na powierzchni komórki trwa 2-6 godzin.

Stabilność natywnych kompleksów MHC II-peptyd

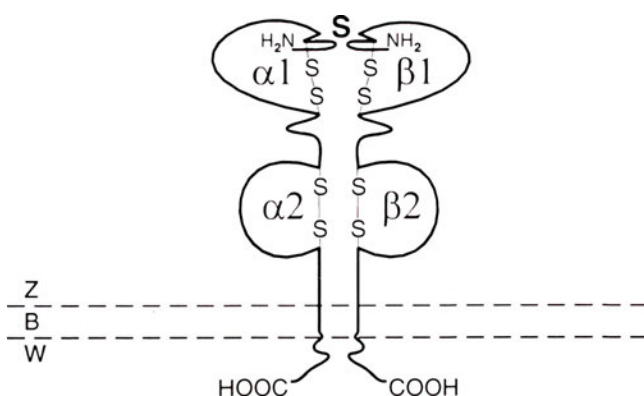
jest bardzo duża [51]. Limfocyty B zachowują zdolność do stymulacji podlegających restrakcji MHC II specyficznych komórek T przez kilka dni [52]. Okres półtrwania kompleksu MHC II-peptyd na powierzchni komórki zależy od odmiany białka prezentującego i sekwencji prezentowanego peptydu; dla cząsteczek I-A<sup>k</sup> i różnych peptydów oceniano go na od 6,8 do około 25 godzin [53]. Różnice te odzwierciedlać mogą szybkość dysocjacji peptydów z cząsteczek MHC II lub selektywną degradację cząsteczek MHC II z którymi związane są różne peptydy.

## II. Schemat budowy cząsteczek MHC II

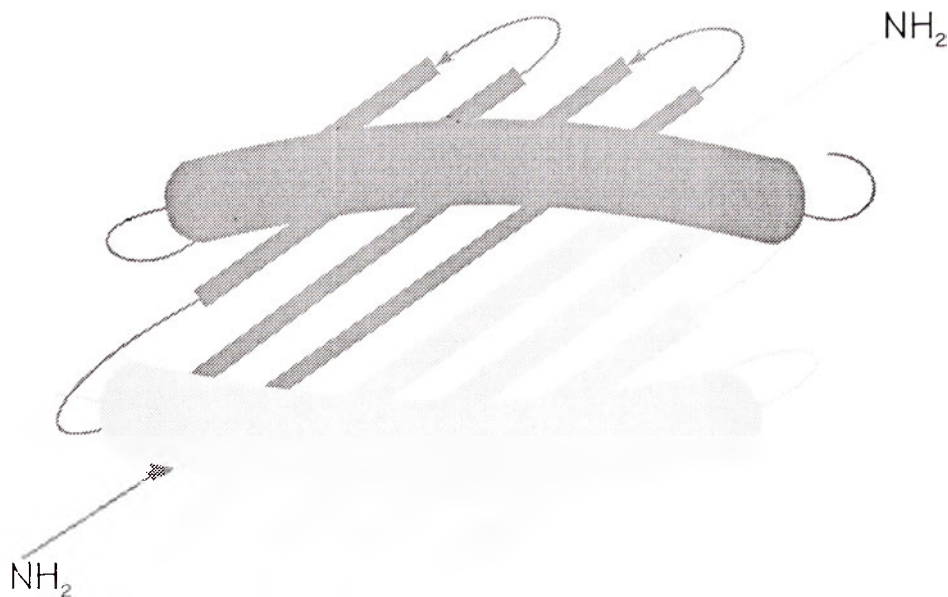
Znana jest struktura rentgenowska trzech cząsteczek klasy II, ludzkich antygenów HLA-DR1 i HLA-DR3 oraz mysiego antygeny I-E<sup>k</sup>. DR1 krystalizowano z natywnie związanymi peptydami [54], syntetycznym trzynasto-peptydem hemaglutyniny wirusa grypy (HA306-318) [55], lub też z natywnie prezentowanymi peptydami i dodatkowo związanymi superantygenami SEB [56] albo TSST-1 [57]. Cząsteczkę DR3 wykrytalizowano w kompleksie z peptydami CLIP [37]. Łącznie zbadano 5 struktur krystalicznych obu ludzkich cząsteczek. Białko I-E<sup>k</sup> wykrytalizowano wraz ze związanym kowalencyjnie peptydem pochodzącym z mysiej hemoglobiny (Hb67-76) lub z mysiego białka szoku termicznego 70 (Hsp236-248) [58].

Cząsteczki MHC klasy II składają się z łańcuchów  $\alpha$  o masie 31-34 kDa i  $\beta$  o masie 26-29 kDa. Oba łańcuchy są integralnymi białkami błonowymi, posiadającymi wewnątrzkomórkowy odcinek C-końcowy. Fragment zewnątrzkomórkowy każdego z łańcuchów białkowych MHC II tworzy dwie domeny, tak więc polipeptydy te możemy podzielić na cztery regiony (Ryc. 1):

1. N-końcowa domena zewnątrzkomórkowa (odpowiednio  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  w łańcuchach  $\alpha$  i  $\beta$ );
2. druga, położona bliżej błony komórkowej domena zewnątrzkomórkowa (odpowiednio  $\alpha 2$  i  $\beta 2$ );
3. odcinek błonowy (20-25 reszt aminokwasowych);



Ryc. 1 Budowa cząsteczki MHC klasy II.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  — odpowiednio domeny łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$ ; S-S — wiązania disulfidowe; Z — obszar zewnątrzkomórkowy; B — błona komórkowa; W — wewnątrz komórki; S — szczelina wiążąca peptydy.



**Ryc. 2** Schemat szczeliny wiążącej peptydy cząsteczki MHC II w nieobecności peptydu. Zaznaczono wkład domen  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  w budowę regionu wiążącego.

■ -  $\alpha 1$  □ -  $\beta 1$

4. odcinek wewnątrzkomórkowy (3-15 reszt w łańcuchu  $\alpha$  i 8-20 w łańcuchu  $\beta$ ).

Domeny zewnątrzkomórkowe składają się z 90-100 reszt aminokwasowych, w większości tworzących pętlę zamkniętą przez wiązanie disulfidowe. Silnie polimorficzne domeny  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  budują wspólnie najbardziej oddaloną od błony komórkowej strukturę cząsteczki, szczelinę wiążącą peptydy (Ryc. 2). Jest ona podobna do wnęki cząsteczek MHC I. Szczelina składa się z podłogi utworzonej z ośmiu pasm  $\beta$ , otoczonej dwoma  $\alpha$  heliksami. Domeny  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  stanowią po połowie tej struktury, każda z nich wnosi do jej budowy wkład w postaci czterech pasm  $\beta$  i jednego  $\alpha$  heliksu. Cząsteczki MHC II w swojej szczelinie wiążącej zawierają 6 kieszeni wiążących łańcuchy boczne reszt aminokwasowych prezentowanych peptydów lub fragmenty ich łańcucha głównego.

Domeny  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  mają strukturę jednostki immunoglobulinowej typu stałego, podobnie jak analogiczna para  $\alpha 3$  i  $\beta 2m$  w cząsteczkach MHC I. Są także nisko polimorficzne.

Cząsteczki MHC I i II są niezwykle podobnymi strukturami, mimo różnicy kombinacji tworzących je białek [59]. Nie dziwi to, gdyż musi je rozpoznawać taki sam TCR. Różnice strukturalne sprowadzają się do niewielkich przemieszczeń domen  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  relatywnie do odpowiadających im w cząsteczkach klasy I domen  $\alpha 3$  i  $\beta 2m$  oraz do zmian w obrębie szczeliny wiążącej peptydy.

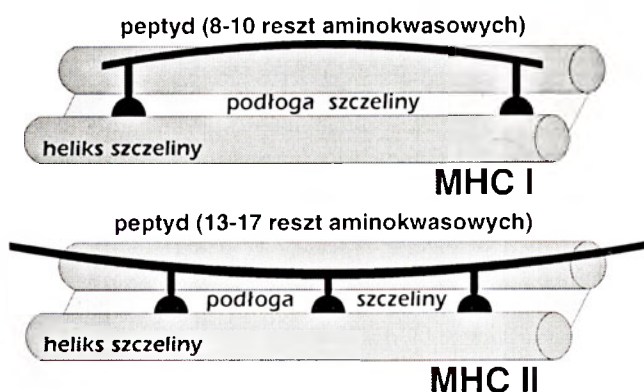
Łańcuchy MHC II są glikozylowane, reszty węglowodanowe zawierają m.in. galaktozę, glukozaminę i fukozę. Różnica w masach cząsteczkowych obu łańcuchów wynika przede wszystkim z niejednorodności w podstawieniach cukrowych — łańcuch  $\alpha$  podstawiony jest dwukrotnie, po jednym podstawieniu w każdej domenie zewnątrzkomórkowej (pozycja 78 i 118), natomiast w łańcuchu  $\beta$  reszta cukrowa przyłączona

jest jedynie do domeny  $\beta 1$  (pozycja 19) [37]. Różnorodność podstawień cukrowych jest przyczyną zmienności masy cząsteczkowej łańcuchów MHC II pomiędzy gatunkami, ponadto typ glikozylacji może być odmienny pomiędzy różnymi typami komórek nawet u tego samego osobnika.

### III. Budowa szczeliny wiążącej peptydy

Szczegóły budowy szczeliny wiążącej i struktura wiązanych peptydów różni cząsteczki klasy I i II (Ryc. 3). Analiza rentgenowska wykazuje, że ligandy peptydowe mocowane są w centralnej części szkieletu peptydu, natomiast ich końce po obu stronach swobodnie wystają ze szczeliny. Peptydy różnej długości wiążą się w postaci łańcuchów nie wybrzuszających się w środku, odmiennie niż w klasie I. Cząsteczki MHC II wiążą łańcuchy dłuższe niż MHC I, długości 10 do 30 reszt aminokwasowych (najczęściej 13-17 reszt) [11].

Różnice w długości wiązanych peptydów wynikają



**Ryc. 3** Porównanie sposobu wiązania peptydów przez cząsteczki MHC klasy I i II. Struktury typu „lebków od szpilek” symbolizują wiązania wodorowe pomiędzy peptydami i resztami aminokwasowymi cząsteczek MHC.

z niewielkich zmian konformacyjnych miejsca wiążącego. Powodują one, że w cząsteczkach MHC II szczelina ma oba końce bardziej otwarte. Dodatkowymi czynnikami odblokowującymi końce szczeliny wiążącej w znanych cząsteczkach MHC II jest podstawienie szeregu reszt aminokwasowych, których łańcuchy boczne ograniczają szczelinę w cząsteczkach klasy I. Trzy zachowywane reszty Tyr (7, 59, 171), które wiążą N-końce peptydów oraz zachowywane reszty Tyr-84, Lys-146, Thr-143, wiążące w MHC I C-końce peptydów, nie występują w sekwencjach MHC II. Ponadto w sekwencjach klasy II nieobecne są: prawie że zachowywana reszta Trp-167 oraz tworzące wiązanie jonowe reszty Glu-55 i Arg-170, które wspólnie zamykają N-koniec wnęki MHC I. Warto zaznaczyć, że fragmenty różniące się strukturą drugorzędową w stosunku do MHC I, różnią się także wzorcem polimorfizmu; są raczej zachowywane w klasie I i stosunkowo zmienne w klasie II.

#### IV. Antygenowe peptydy prezentowane przez cząsteczki MHC II

Różnorodność antygenowa czynników potencjalnie patogennych powoduje, że każda cząsteczka MHC musi być zdolna do prezentowania znacznej liczby peptydów. Wiązanie peptydów jest więc oddziaływaniem z dużym powinowactwem, ale umiarkowaną selektywnością. Polimorfizm aminokwasowy cząsteczek MHC II koncentruje się wokół szczeliny wiążącej, a budowa szczeliny i szczególnie charakter chemiczny jej kieszeni determinuje sekwencje przyłączanych przez daną cząsteczkę MHC peptydów. Prowadzi to do powstania wielu specyficzności peptydowych (tzw. motywów sekwencyjnych) cząsteczek MHC. Każda z tych cząsteczek może wiązać bardzo różne, ale nie wszystkie peptydy. Obecność odmiennych białek MHC II u poszczególnych osobników powoduje różnice w przebiegu ich odpowiedzi immunologicznej.

Odpowiedź limfocytów  $T\alpha\beta$  przeciwko pewnemu antygenowi może zaistnieć, gdy spełnione są przynajmniej trzy warunki:

1. w wyniku jego „obróbki” powstaje przynajmniej jeden odpowiedniej długości peptyd o sekwencji różnej od sekwencji peptydów w stosunku do których układ odpornościowy nabył tolerancję (głównie pochodzących z własnych białek organizmu);
2. organizm posiada cząsteczki MHC zdolne do wiązania peptydu o takiej sekwencji;
3. w organizmie występuje klon limfocytów  $T\alpha\beta$  zdolnych do rozpoznania powstałego kompleksu MHC-peptyd.

Istnienie wielu odmian każdego izotypu MHC redukuje niebezpieczeństwo, że jakiś patogen mógłby być niewykrywalny dla układu odpornościowego dzięki niezdolności do rozpoznawania jego antygenów. Z drugiej strony to, że różnorodność MHC realizuje się głównie na drodze allotypowej (poprzez odmiany

alleliczne), a nie izotypowej, zabezpiecza przed możliwością wystąpienia potencjalnie niebezpiecznej odpowiedzi immunologicznej, która obejmowałaby większość osobników danego gatunku.

Dane analityczne, dotyczące motywów sekwercyjnych peptydów prezentowanych przez cząsteczki MHC II nie są na razie tak bogate, jak dla MHC I. Sekwencje peptydów wyizolowanych z różnych cząsteczek MHC II zostały ostatnio zebrane [60], dostępne są też w banku MHCPEP [61]. Procedura badawcza zbliżona jest stosowanej w wypadku ligandów białek klasy I [2].

Większość peptydów wiążących się z daną cząsteczką MHC II ma pewne wspólne lub podobne kotwiczące reszty aminokwasowe [62]. Równocześnie możliwe jest występowanie dużego zróżnicowania w wielkości wystających ze szczeliny fragmentów prezentowanych cząsteczek. W konsekwencji cechą odróżniającą ligandy klasy II od peptydów wiążących się z cząsteczkami MHC I jest różna odległość pomiędzy końcami peptydów, a resztami kotwiczącymi. Pozycje kotwiczące są więc trudne do określenia na podstawie wspólnego sekwencjonowania zestawu eluowanych peptydów, ponieważ nie umożliwia to ustalenia sekwencji pojedynczych ligandów peptydowych. Można natomiast zastosować porównywanie sekwencji izolowanych wybiórczo peptydów. Alternatywnie próbuje się określić reszty aminokwasowe ważne w wiązaniu wybranych peptydów, np. poprzez podstawianie pojedynczych reszt w znanych ligandach cząsteczek MHC II (analiza substytucyjna). Wiele tak określonych zależności nie ma jednak swoich odpowiedników w innych natywnie wiązanych ligandach.

Motywy sekwencyjne cząsteczek MHC II zawierają więcej reszt kotwiczących, ale pozycje kotwiczące mają wymagania zaznaczone słabiej niż w cząsteczkach MHC I (motyw zdegenerowany) [10, 62]. Ocenia się, że z pojedynczą odmianą cząsteczki MHC II może się wiązać ponad 2000 różnych peptydów [63]. Ligandy prezentowane w największych ilościach zwykle stanowią dużo mniej niż 1% całej mieszaniny peptydowej związanej przez dane białko [11]. W niektórych przypadkach może występować dominacja jednego lub kilku peptydów — np. sześć peptydów eluowanych z cząsteczek I-A<sup>b</sup> i I-E<sup>b</sup> wspólnie stanowiło odpowiednio 50% i 75% izolowanego materiału [35]. Przybliżona średnia liczba kompleksów danej odmiany MHC II z określonym peptydem, prezentowanych równocześnie na powierzchni komórki wynosi około 100-500 cząsteczek na komórkę [11].

Przeciętna dostępność powierzchni peptydu na zewnątrz szczeliny wiążącej wynosi 19-29% w MHC I, 30% w kompleksie HA z DR1 [64], a 20,4% w kompleksie Hb z I-E<sup>k</sup> [58]. W DR1 300-500 Å<sup>2</sup> powierzchni peptytu dostępne jest dla TCR, nie licząc N- i C-końców HA, które mogą nie oddziaływać bezpośrednio z receptorem. Powierzchnia ta oraz zmiany konformacji MHC zależne od wiązania różnych peptydów

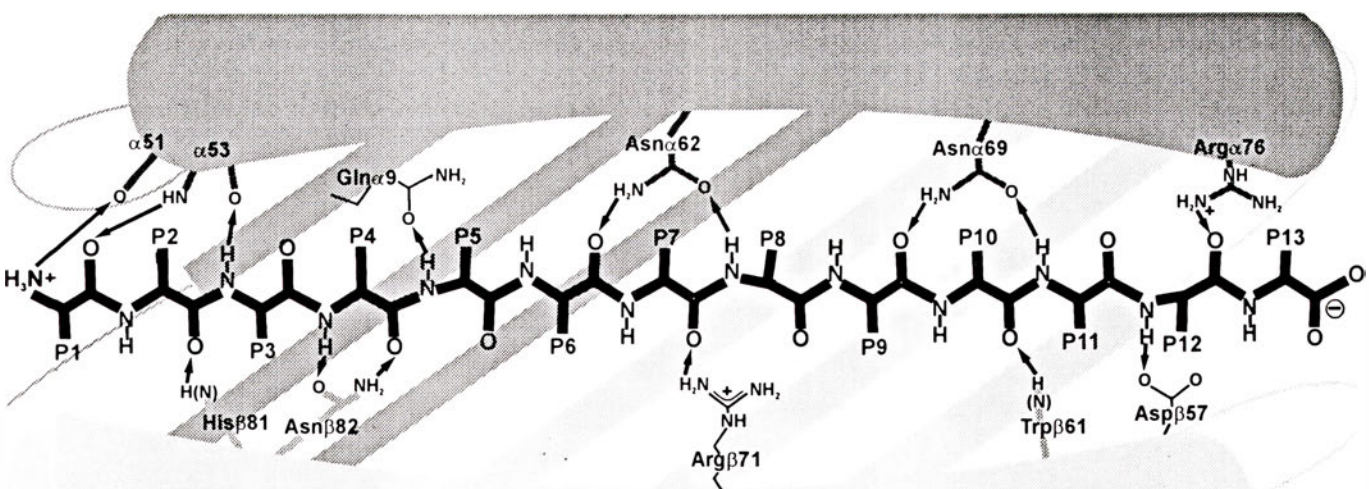
mogą służyć TCR do rozpoznawania ligandów.

Druga klasa antygenów MHC także wykorzystuje dwa typy oddziaływań wiążących ligandy peptydowe (Ryc. 4). Zachowywane reszty MHC II oddziałują głównie z atomami łańcucha głównego prezentowanego peptydu, natomiast reszty zmienne wchodzą w skład kieszeni wiążących jego łańcuchy boczne. Selekcja peptydów podlegających prezentacji odbywa się głównie poprzez interakcje drugiego typu, pomiędzy polimorficznymi resztami MHC i łańcuchami bocznymi aminokwasów peptydu. Odcinek 9-15 reszt aminokwasowych rozpoczynający się mniej więcej od 3 do 6 reszty całej sekwencji izolowanego peptydu warunkuje jego zdolność do wiązania się z MHC II, odpowiadając części peptydu wiązanej przez szczelinę wiążącą. W większości poznanych dotychczas motywów pozycja pierwsza tego odcinka (oznaczana jako P1 niezależnie od odległości od N-końca) stanowi hydrofobową kotwicę. Odpowiada ona ważnej kieszeni szczeliny wiążącej, widocznej w kryształach DR1, DR3 i I-E<sup>k</sup>. Nie jest ona obecna w sekwencjach MHC I. Kieszeń powstaje, gdyż w wielu cząsteczkach MHC II znacząco mniejszy łańcuch boczny (Gly lub Val) w pozycji 86 łańcucha  $\beta$  zastępuje Tyr-171 z MHC I. Dzięki temu tworzy się głębokie wgłębienie, otoczone głównie niepolarnymi resztami domen  $\alpha 1$  i  $\beta 1$ . W mysim białku I-E<sup>k</sup> w pozycji tej występuje większa reszta Phe, co pozwala na wiązanie w kieszeni P1 łańcuchów bocznych mniejszych reszt hydrofobowych (Ile, Val). Reszty tworzące kieszeń dla P1 są w dużej mierze zachowywane pomiędzy różnymi białkami HLA-DR i jest ona prawdopodobnie obecna w innych cząsteczkach MHC II. Dodatkowo do P1 występuje kilka

innych reszt kotwiczących. Dla DR1 są to P4, P6, P7 i P9, natomiast dla I-E<sup>k</sup> P4, P6 i P9, które także wiążą się we wnętrzu odpowiednich kieszeni szczeliny wiążącej. Różnice motywu charakterystyczne dla danej odmiany MHC II mogą występować w każdej pozycji. Szczególnie wyraźne są wymagania dotyczące ładunku łańcuchów bocznych reszt kotwiczących. W kompleksach DR1 i DR3 po pięć, w I-E<sup>k</sup> cztery łańcuchy boczne reszt aminokwasowych peptydów są prawie w całości zagłębione w kieszeniach. Są one rozmieszczone co około trzecią resztę. Utrata energii oddziaływań wiążących końce peptydu w MHC I kompensowana jest przez sieć wiązań wodorowych pomiędzy szczeliną wiążącą i szkieletem peptydu, zwłaszcza jego centralną częścią.

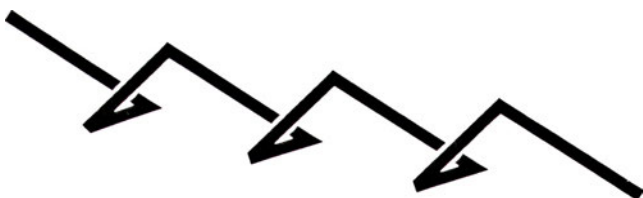
W przypadku MHC II można (podobnie jak w MHC I) przewidywać specyficzność kieszeni na podstawie porównania jej budowy (w zakresie tworzących powierzchnię kieszeni reszt aminokwasowych) z analogiczną kieszenią innego białka o znanej strukturze i specyficzności. W DR1 wspomniana wyżej kieszeń dla P1 całkowicie skrywa łańcuch boczny Tyr peptydu, odpowiadającej głównej kotwicy ligandów DR1. Specyficzność kieszeni modulowana jest przez zmieniający wielkość kieszeni dimorfizm Gly/Val w pozycji  $\beta 86$ . Podstawienie Gly- $\beta 86$  przez Val powoduje, że łańcuch boczny waliny lokuje się w miejsce zajmowane w badanej cząsteczce HLA-DR1 przez grupę hydroksylową Tyr-HA308 peptydu, ograniczając rozmiar łańcucha bocznego możliwego do umieszczenia w kieszeni.

Wszystkie wykrystalizowane dotychczas wspólnie z cząsteczkami MHC II peptydy wiążą się w specyfic-



Atomy łańcuchów głównych i bocznych reszt aminokwasowych HLA-DR1 tworzących wiązania z trzynastopeptydem HA 306-318: — polimorficzne, — zachowywane pochodzące z  $\alpha 1$ , — zachowywane pochodzące z  $\beta 1$ ; ■ -  $\alpha 1$  □ -  $\beta 1$  — - wiązanie wodorowe

Ryc. 4 Schemat wiązania peptydu w szczelinie wiążącej MHC II (HLA-DR1). Zaznaczono wiązania wodorowe polimorficzne (charakterystyczne dla DR1) oraz prawdopodobnie zachowywane, tworzone przez elementy cząsteczki HLA-DR1 występujące w sekwencjach większości cząsteczek MHC klasy II.



Ryc. 5 Uproszczony rzut konformacji poliproliny II, którą przyjmują peptydy w czterech wykrystalizowanych dotychczas kompleksach MHC II-peptyd. Wszystkie wiązania amidowe występują w konfiguracji trans ( $\omega = +180^\circ$ ), kąty torsyjne wynoszą:  $\Phi = -78^\circ$ ,  $\Psi = +149^\circ$ .

nej konformacji lewoskrętnego heliksu poliproliny II (Ryc. 5) [37, 55, 58]. Struktura ta nie angażuje atomów szkieletu peptydu do formowania wewnętrznych stabilizujących wiązań wodorowych (w odróżnieniu od heliksu  $\alpha$ ) i jest jedną z częstszych konformacji przyjmowanych przez peptydy w miejscach rozpoznawania molekularnego [65]. Na jedną pętlę przypada 2,8 reszty aminokwasowej. Konformacja ta jest prawdopodobnie wspólna dla peptydów wiązanych przez różne białka klasy II, choć doświadczenia modelowe dopuszczają także konformację rozciągniętą.

Trzy zachowywane reszty Asn (62 i 69 z domeny  $\alpha 1$  oraz 82 z  $\beta 1$ ) cząsteczki MHC II zlokalizowane są w taki sposób, że ich grupy  $\beta$ -amidowe mogą tworzyć wielokrotne wiązania wodorowe z łańcuchem głównym peptydu. Zachowywana reszta Trp- $\beta 61$  także zajmuje miejsce umożliwiające udział jej azotu indolowego w powstawaniu wiązania wodorowego z grupą karbonylową szkieletu peptydu, podobnie do lokalizacji i funkcji Trp-147 w domenie  $\alpha 2$  MHC klasy I.

Prawie każda reszta aminokwasowa sekwencji rdzeniowej prezentowanego peptydu poprzez atomy łańcucha głównego bierze udział w tworzeniu przynajmniej jednego wiązania wodorowego z cząsteczką MHC II. Pomiedzy peptydem, a powierzchnią szczeliny wiążącej powstaje 18 (DR1) lub 17 (DR3) wiązań wodorowych. Spośród nich 15 w przypadku DR1 nie angażuje łańcuchów bocznych peptydu, tylko jego szkielet, a więc element stały w prezentowanych peptydach. Wśród wiązań jest 11-12 takich, w których biorą udział atomy szkieletu lub łańcuchów bocznych zachowywanych reszt aminokwasowych cząsteczek MHC II i mogą być one wykorzystywane przez inne odmiany MHC II. Wiązania wodorowe nie są skoncentrowane na obu końcach szczeliny, jak w MHC I, lecz są rozmieszczone wzdłuż miejsca wiążącego. Nie jest pewne, czy wzór wiązań wodorowych wykorzystywanych przez HA306-318, CLIP, Hb68-76 i Hsp238-246 jest ogólny dla różnych peptydów i cząsteczek MHC II, ale przeważające zaangażowanie zachowywanych reszt MHC i podobieństwo gęstości elektronowej odpowiadającej mieszaninie endogennych peptydów wiążących się z DR1 wydaje się potwierdzać taką możliwość. Wiązania ze szkieletem i łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych peptydu usztywniają konformację peptydu w szczelinie wiążącej, tak że może on być rozpoznawany przez TCR.

Istnieją pewne sekwencje peptydowe, które mogą się wiązać z wieloma, jeśli nie ze wszystkimi cząsteczkami DR [62, 66]. Przykładem takich peptydów są CLIP. Nie wszystkie kotwice motywu sekwencyjnego peptydów izolowanych z danego białka MHC II muszą być używane przez każdy ligand peptydowy [67]. Niekorzystne oddziaływania w jednej lub kilku kieszeniach mogą być kompensowane przez korzystne oddziaływania w innych miejscach wiązania peptydu. Zwiększa to znacznie liczbę peptydów, które mogą ulegać prezentacji wspólnie z odmianami cząsteczek MHC II obecnymi u poszczególnego osobnika.

Cząsteczki MHC II mogą wiązać glikopeptydy [68], które izolowano m.in. z HLA-DR11 [16] i z HLA-DR8 [36].

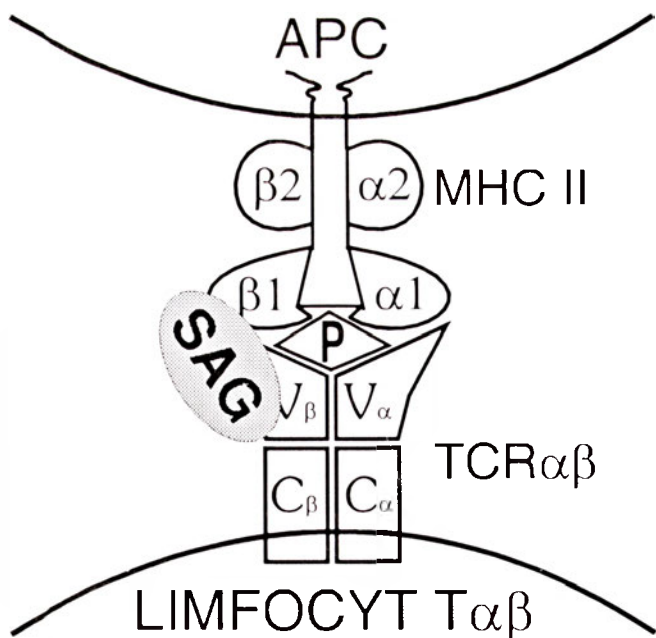
## V. Dimery cząsteczek MHC II

W postaciach krystalicznych cząsteczki DR1, DR3 i I-E<sup>k</sup> występują jako dimer heterodimeru  $\alpha\beta$  (heterodimer  $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> [37, 54, 55, 58]. Łańcuchy MHC II są w obu dimerach DR prawie równoległe, orientują się w tym samym kierunku. Pomiedzy oboma heterodimerami znajdują się cztery powierzchnie kontaktowe. Duża część reszt aminokwasowych DR1 biorących udział w oddziaływaniach pomiedzy dimerami jest zachowywana pomiedzy różnymi odmianami cząsteczek DR lub w całej klasie II. Dimery I-E<sup>k</sup> wykazują nieco inną strukturę, ich szczeliny wiążące ustawione są po prawie przeciwległych stronach dimeru. Tendencja do dimeryzacji może okazać się wspólną cechą cząsteczek tej klasy, choć powstawanie dimerów w krystalicznych formach MHC II może być tylko artefaktem wynikającym z niefizjologicznych warunków krystalizacji. Przypuszcza się, że cząsteczki MHC II mogą występować jako dimery na powierzchni błony komórkowej, lub w takiej postaci być rozpoznawane przez receptory TCR, choć w wypadku I-E<sup>k</sup> wymagałoby to od łańcuchów MHC pozycji niemalże równoległej do powierzchni błony komórkowej [54, 58]. Dimeryzacja może mieć znaczenie we wzmocnieniu sygnału przekazywanego poprzez TCR.

## VI. Oddziaływanie cząsteczek MHC II z superantygennami

Superantygenny (SAG) to nietypowe ligandy MHC II, które z cząsteczkami MHC wiążą się bez wstępnej „obróbki”. Są to produkty różnych bakterii i wirusów. Przyłączają się w całości do antygenów klasy II już po ich ekspresji na powierzchni błony komórkowej. Miejsce wiązania SAG zwykle odbiega od regionu wiązania peptydów. Po związaniu SAG nie oddziałują z „obszarem rozpoznającym” kompleks MHC-peptyd (paratopem) TCR [2], tworzonemu wspólnie przez domeny zmienne łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  TCR, ale z boczną powierzchnią domeny zmiennej (V) łańcucha  $\beta$  (Ryc. 6). Dlatego też SAG są cząsteczkami rozpoznawanymi





**Ryc. 6** Schemat oddziaływania cząsteczek MHC II i TCR z superantygenem. APC — komórka prezentująca antygen; MHC II — cząsteczka MHC klasy II;  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  — odpowiednio domeny łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$ ; TCR $\alpha\beta$  — receptor limfocyta T $\alpha\beta$ ; V $\alpha$  i V $\beta$  — domeny zmienne łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  TCR $\alpha\beta$ ; C $\alpha$  i C $\beta$  — domeny stałe łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  TCR $\alpha\beta$ ; SAG — superantygen; P — peptyd prezentowany przez cząsteczkę MHC II.

przez wszystkie klony limfocytów posiadających określoną domenę V łańcucha  $\beta$  w receptorze TCR. Mogą to być zarówno limfocyty T CD4+ i T CD8+. Typowy peptyd antygenowy aktywuje tylko określony klon limfocytów T $\alpha\beta$  (1 na około  $10^5$ - $10^6$ ), posiadający kombinację odpowiednich domen zmiennych łańcucha  $\alpha$  i łańcucha  $\beta$  TCR. Rezultatem wiązania SAG jest pobudzenie dużej liczby limfocytów T (nawet 30-40%). Limfocyty pod wpływem SAG mogą także przechodzić w stan inaktywacji (anergii) lub ginąć. SAG są w stanie indukować procesy autoimmunologiczne.

W odróżnieniu od „zwykłych” antygenów, prezentacja SAG nie podlega restrykcji MHC, jednakże wiążą się one z różnymi powinowactwami do różnych cząsteczek MHC II [69-71].

Wykryto dotychczas i określono strukturę dwóch kompleksów MHC II z SAG. W obu wypadkach była to cząsteczka HLA-DR1, której ligandami były SEB [56] i TSST-1 [57]. Wiążą się one z DR1 w częściowo odmienny sposób. SEB wiąże się w dwu regionach domeny  $\alpha 1$ . Wiązanie zachodzi po jednej stronie miejsca wiążącego peptydy, nie obejmując peptydów zajmujących szczelinę wiążącą [56]. SEB oddziałuje z łańcuchami bocznymi heliksu oraz pętlami łączącymi pierwsze i trzecie pasmo  $\beta$ . Wiązanie SEB nie wpływa na zdolność DR1 do wiązania peptydów. TSST-1 wiąże się z powyższymi dwoma regionami oraz z heliksami szczeliny wiążącej i prezentowanym przez DR1 peptydem. Przykrywa on ponad połowę szczeliny wiążącej, prawdopodobnie uniemożliwiając lub znacznie zaburzając kontakt TCR z MHC II i peptydem. Wiązanie TSST-1 zależy od konformacji i właściwości fizykochemicznych peptydu prezentowa-

nego przez MHC II [57, 71]. Inny SAG, SEA wiąże się z MHC II wykorzystując dodatkowo skoordynowany jon cynkowy ( $Zn^{2+}$ ) [69].

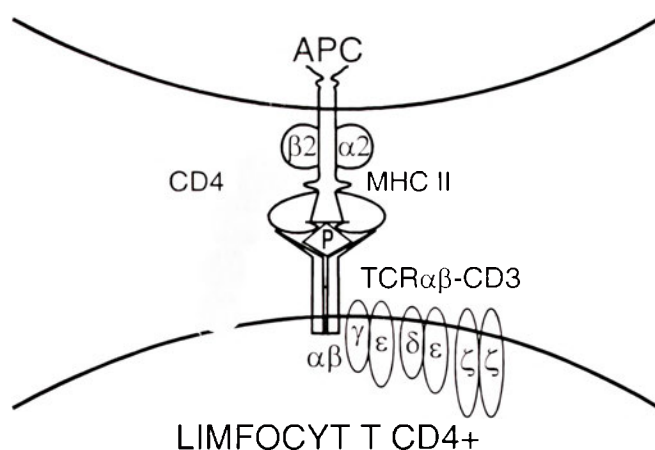
Oba SAG nie wykazują kompetycyjności w wiązaniu. Sugeruje to, że choć wiążą się one w pokrywającym się w dużej części regionie DR, to każdy z nich jest ligandem innej subpopulacji cząsteczek DR1 [71].

Jak wykazano w bieżącym roku, superantygen SEB może się wiązać także z cząsteczkami MHC I, wywołując podobnie jak przy wiązaniu z cząsteczkami MHC II, poliklonalną aktywację limfocytów T [72].

## VII. Rozpoznawanie kompleksu MHC II-peptyd przez TCR $\alpha\beta$

Peptydy połączone z MHC II rozpoznawane są wspólnie z cząsteczką MHC przez TCR limfocytów T CD4+. Sposób rozpoznawania nie odbiega zasadniczo od rozpoznawania kompleksu MHC I-peptyd przez receptor limfocytów T CD8+ (Ryc. 7) [2]. TCR rozpoznaje nie sekwencję peptydu, ale jego powierzchnię dostępną w szczelinie wiążącej epitop [73]. Limfocyty CD4+ stanowią grupę komórek funkcjonalnie przede wszystkim pomocniczych. Funkcja koreceptorowa CD4 polega na wiązaniu MHC II jako wtórny, niezależny od peptydu ligand. Dopiero połączenie oddziaływania antygenowo specyficznego (TCR) oraz koreceptorowego (CD4) i innych koreceptorów [2] powoduje właściwą aktywację limfocyta T CD4+. Rozpoznanie antygenowego peptydu przez ten limfocyt prowadzi do zwiększenia syntezy DNA, podziału komórki, a przede wszystkim do uwolnienia cytokin, które pośredniczą w amplifikacji odpowiedzi immunologicznej (m.in. IL-2, IL-12, IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  i  $\beta$ ).

CD4 jest monomeryczną glikoproteiną z fragmentem zewnątrzkomórkowym zbudowanym z czterech domen immunoglobulinopodobnych [74, 75]. Regionem wiążącym CD4 na cząsteczce MHC II są prawdopodobnie fragmenty domen:  $\beta 1$ (35-46) i  $\beta 2$ (133-148)



**Ryc. 7** Rozpoznawanie cząsteczki MHC II prezentującej peptyd przez limfocyt T CD4+. APC — komórka prezentująca cząsteczkę MHC II wiążącą peptyd;  $\beta 2$  — domena  $\beta 2$  MHC II;  $\alpha 2$  — domena  $\alpha 2$  MHC II; TCR — receptor limfocyta T $\alpha\beta$ -CD3;  $\alpha$ ,  $\beta$  — łańcuchy receptora limfocyta T;  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\xi$  — poszczególne łańcuchy białka CD3.

[75, 76]. Drugi z nich odpowiada fragmentowi domeny  $\alpha 3$  wiązanej przez CD8 w cząsteczkach MHC I [75, 77, 78]. Część doświadczeń wykazuje, że CD4 może wiązać się z MHC II dopiero po oligomeryzacji na powierzchni limfocyta T $\alpha\beta$  [79].

### VIII. Uwagi końcowe

Badanie oddziaływań MHC II — peptyd może mieć wiele ważnych implikacji praktycznych.

Osobnicy posiadający określone allele MHC mają zwiększone lub zmniejszone ryzyko wystąpienia pewnych schorzeń [1, 80-83]. Na drodze badań genetycznych i strukturalnych można już w pewnych wypadkach określić molekularne podłoże podatności/oporności na dany zespół chorobowy; badania przesiewowe mogłyby więc niekiedy pozwolić na eliminację czynników ryzyka u osób potencjalnie podatnych [80, 84].

Geny i cząsteczki MHC klasy II mają duże znaczenie w wywoływaniu i podtrzymywaniu supresji lub autoagresji immunologicznej [85]. Rozpoznawanie ligandów peptydowych wraz z MHC II wieść może do tolerancji. Zjawisko to występuje nie tylko w czasie rozwoju ontogenetycznego limfocytów T. Na przykład komórka B, prezentując peptydy wspólnie z MHC II, może posiadać zdolność indukowania anergii wśród rozpoznających ją dojrzałych limfocytów T [86]. Być może jest to jeden z mechanizmów powstawania tolerancji w populacji dojrzałych limfocytów T. Mechanizm ten mógłby być użyteczny do sztucznego indukowania tolerancji w stosunku do określonych antygenów [10, 87].

Na podstawie znajomości motywów sekwencyjnych białek MHC można wybierać ze znanych sekwencji białek podjednostki peptydowe szczepionek przeciwko określonym patogenom [88]. Szczepionki takie składać się powinny z mieszaniny ligandów różnych odmian MHC II lub ligandów zdolnych do wiązania się z różnymi odmianami [89]. Pewną trudnością w tego rodzaju immunizacji mogą być obserwowane różnice w antygenowości pomiędzy kompleksami MHC II-peptyd powstającymi poprzez przyłączenie syntetycznych peptydów do „pustych” cząsteczek MHC II, a tymi powstającymi w wyniku obróbki natywnych antygenów o tej samej sekwencji [90].

Białka klasy II związane z występowaniem chorób autoimmunologicznych lub podatnością/opornością na wystąpienie określonych chorób charakteryzują się często obecnością unikatowych (w stosunku do innych cząsteczek MHC II) reszt aminokwasowych w regionie wiążącym [62, 91]. Mogą wówczas wiązać specyficzne peptydy [92]. Blokowanie cząsteczek MHC II może być więc skuteczne w zapobieganiu i/lub leczeniu np. schorzeń autoimmunologicznych [62, 93, 94]. W wypadku dodatniego sprzężenia obecności określonego białka MHC z zespołem chorobowym obserwowano poprawę stanu klinicznego chorych zwierząt po zastosowaniu skierowanych przeciwko temu białku przeciwciał, peptydów blokujących, wiążących się sil-

niej niż natywne ligandy lub też fragmentów białka MHC II indukujących powstawanie endogennych przeciwciał przeciwko antygenom MHC. W odniesieniu do ludzi próbowano stosować przeciwciała monoklonalne przeciwko HLA-DR w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Skuteczność takiej strategii wykazano w odniesieniu do modeli zwierzęcych stwardnienia rozsianego [95], sprawdza się ją u chorych na tę chorobę. Peptydowe blokery cząsteczek MHC II wydają się mieć małą szansę na skuteczność terapeutyczną z powodu trudności w utrzymaniu efektywnego do blokowania stężenia peptydów nawet w warunkach *in vitro* [96]. Natomiast znajomość szczegółów budowy miejsca wiążącego jest konieczna do projektowania niepeptydowych antagonistów wiązania peptydów przez cząsteczki MHC. Blokery takie nie wymagają poznania konkretnych autoantygenów odpowiedzialnych za indukcję procesu chorobowego, ponadto pozwalają na blokowanie określonej odmiany MHC II bez wywoływania supresji wynikającej z blokowania innych odmian [62].

### Podziękowanie

Praca została zrealizowana w związku z projektem KBN nr 208019101.

Artykuł otrzymano 14 lutego 1996 r.  
Zaakceptowano do druku 27 lipca 1996 r.

### Piśmiennictwo:

1. Jakóbisiak M (1995) W: Jakóbisiak M (red) *Immunologia* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
2. Falkiewicz B, Liberek B (1996) *Post Bioch* 42: 41-48
3. Kuśnierczyk P (1996) *Post Hig Med Dośw* 50: 1-8
4. Radwan P, Lowes J, Priddle J, Jewell D (1989) *Immunol Pol* 14: 37-43
5. Nowaczyk M, Pluta M, Modlińska M, Bukowska J, Górski A (1990) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 38: 415-419
6. Nowaczyk M, Górski A, Modlińska M, Ranciewicz Z, Bukowska J, Ołdakowska U, Morzycka-Michalik M, Lao M (1991) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 39: 291-296
7. Krzymański M, Muller-Ruchholtz W (1992) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 40: 177-181
8. Klin M (1989) *Pol Tyg Lek* 44: 820-822, 835
9. Brojer E (1995) *Acta Haematol Pol* 26: 247-256
10. Rammensee H-G, Falk K, Rotzschke O (1993) *Curr Opin Immunol* 5: 35-44
11. Engelhard VH (1994) *Annu Rev Immunol* 12: 181-207
12. von Boehmer H, Swat W, Kisielow P (1993) *Immunol Rev* 135: 67-79
13. Kisielow P, von Boehmer H (1995) *Adv Immunol* 58: 87-209
14. Wade WF, Davoust J, Salamero J, Andre P, Watts TH, Cambier JC (1993) *Immunol Today* 14: 539-546
15. Busch R, Mellins ED (1996) *Curr Opin Immunol* 8: 51-58
16. Cresswell P (1994) *Annu Rev Immunol* 12: 259-293
17. Sant AJ, Miller J (1994) *Curr Opin Immunol* 6: 57-63
18. Cresswell P (1996) *Cell* 84: 505-507
19. Park S-J, Sadegh-Nasseri S, Wiley DC (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11289-11293
20. Roche P, Marks M, Cresswell P (1991) *Nature (Lond)* 354: 392-394
21. Lamb C, Cresswell P (1992) *J Immunol* 148: 3478-3482
22. Roche PA, Cresswell P (1990) *Nature (Lond)* 345: 615-618

23. Arunachalam B, Cresswell P (1995) *J Biol Chem* **270**: 2784-2790
24. Riberdy JM, Cresswell P (1992) *J Immunol* **148**: 2586-2590
25. Machamer CE, Cresswell P (1982) *J Immunol* **129**: 2564-2569
26. Machamer CE, Cresswell P (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1287-1291
27. Hedley ML, Urban RG, Strominger JL (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10479-10483
28. Neefjes JJ, Momburg F (1993) *Curr Opin Immunol* **5**: 27-34
29. Layet C, Germain RN (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2346-2350
30. Anderson MS, Miller J (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2282-2286
31. Bikoff EK (1993) *J Exp Med* **17**: 1699-1712
32. Germain RN, Hendrix LR (1991) *Nature (Lond)* **353**: 134-139
33. Riberdy JM, Newcomb J, Surman M, Barbosa J, Cresswell P (1992) *Nature (Lond)* **360**: 474-477
34. Sette A, Ceman S, Kubo R, Sakaguchi K, Appella E, Hunt D, Davis T, Michel H, Shabanowitz J, Rudersdorf R (1992) *Science* **258**: 1801-1804
35. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong S-C, Barlow A, Janeway CA Jr (1991) *Nature (Lond)* **353**: 622-627
36. Chicz RM, Urban R, Gorga J, Vignali D, Lane W, Strominger J (1993) *J Exp Med* **178**: 27-47
37. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC (1995) *Nature (Lond)* **378**: 457-462
38. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, Verwoerd D, Tulp A, Neefjes JJ, Geuze HJ, Trowsdale J (1994) *Science* **266**: 1566-1573
39. Fling SP, Arp B, Pious D (1994) *Nature (Lond)* **368**: 554-560
40. Ceman S, Rudersdorf RA, Petersen JM, Demars R (1995) *J Immunol* **154**: 2545-2556
41. Denzin LK, Cresswell P (1995) *Cell* **82**: 155-165
42. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, Zaller DM (1995) *Nature (Lond)* **375**: 802-806
43. Sherman MA, Weber DA, Jensen PE (1995) *Immunity* **3**: 197-205
44. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Godman S, Bergman C, Monaco JJ, Mellins E (1994) *Nature (Lond)* **368**: 551-554
45. Martin WD, Hicks GG, Mendiratta SK, Leva HI, Ruley HE, Kaer LV (1996) *Cell* **84**: 543-550
46. Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, Waltzinger C, Dierich A, Baroist N, Ploegh H, Benoist C, Mathis D (1996) *Cell* **84**: 531-541
47. Kropshofer H, Vogt AB, Stern LJ, Hammerling GJ (1995) *Science* **270**: 1357-1359
48. Witt SN, McConnell HM (1992) *J Am Chem Soc* **114**: 3506-3511
49. Pinet V, Vergelli M, Martin R, Bakke O, Long EO (1995) *Nature (Lond)* **375**: 603-606
50. Lanzavecchia A, Reid PA, Watts C (1992) *Nature (Lond)* **357**: 249-252
51. Davis JE, Cresswell P (1990) *J Immunol* **144**: 990-997
52. Adorini L, Appella E, Doria G, Cardinaux F, Nagy ZA (1989) *Nature (Lond)* **342**: 800-803
53. Nelson CA, Petzold SJ, Unanue ER (1994) *Nature (Lond)* **371**: 250-271
54. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) *Nature (Lond)* **364**: 33-39
55. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1994) *Nature (Lond)* **368**: 215-221
56. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi Y, Stauffacher C, Strominger JL, Wiley DC (1994) *Nature (Lond)* **368**: 711-718
57. Kim J, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1994) *Science* **266**: 1870-1874
58. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J (1996) *Science* **272**: 1001-1004
59. Bjorkman PJ, Burmeister WP (1994) *Curr Opin Struct Biol* **4**: 852-856
60. Rammensee H-G, Friede T, Stevanović S (1995) *Immunogenetics* **41**: 178-228
61. Brusica V, Rudy G, Harrison LC (1994) *Nucleic Acids Res* **22**: 3663-3665
62. Sinigaglia F, Hammer J (1994) *APMIS* **102**: 241-248
63. Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox AL, Sakaguchi K, Appella E, Grey HM, Sette A (1992) *Science* **256**: 1817-1820
64. Stern LJ, Wiley DC (1994) *Structure* **2**: 245-251
65. Siligardi G, Drake AF (1995) *Biopolymers (Pept Sci)* **37**: 281-292
66. Hammer J, Valsasnini P, Tolba K, Bolin D, Higelin J, Takacs B, Sinigaglia F (1993) *Cell* **74**: 197-203
67. Hammer J, Takacs B, Sinigaglia F (1992) *J Exp Med* **176**: 1007-1013
68. Harding CV, Kihlberg J, Elofsson M, Magnusson G, Unanue ER (1993) *J Immunol* **151**: 2419-2425
69. Abrahamsen L (1995) *Curr Opin Struct Biol* **5**: 464-470
70. Mollick JA, Chintagumpala M, Cook RG, Rich RR (1991) *J Immunol* **146**: 463-468
71. Thibodeau J, Cloutier I, Lavoie PM, Labrecque N, Mourad W, Jardetzky T, Sekaly R-P (1994) *Science* **266**: 1874-1878
72. Haffner AC, Zepter K, Elmets CA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3037-3042
73. Quarantino S, Thorpe CJ, Travers PJ, Londei M (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10398-10402
74. Leahy DJ (1995) *FASEB J* **9**: 17-25
75. Vignali DAA (1994) *Behring Inst Mitt* **94**: 133-147
76. Nag B, Wada G, Passmore D, Clark BR, Sharma SD, McConnell HM (1993) *J Immunol* **150**: 1358-1364
77. Bowman MR, MacFerrin KD, Schreiber SL, Burakoff SJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9052-9056
78. Moebius U, Clayton LK, Abraham S, Diener A, Yunis JJ, Harrison SC, Reinherz EL (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 12008-12012
79. Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6444-6448
80. Thomson G (1995) *Crit Rev Clin Lab Sci* **32**: 183-219
81. Matej H, Kałamarz M, Nowakowska B, Prusek W, Podwysocka M, Wieczorek E, Zahorska Z (1987) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **35**: 787-94
82. Matej H, Nowakowska B, Kałamarz M, Paradowski B, Podemski R, Brzecki A (1987) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **35**: 795-801
83. Matej H, Kacprzak-Bergman I, Pacyńska J, Nowakowska B, Kałamarz M (1992) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **40**: 117-118
84. Richeldi L, Sorrentino R, Saltini C (1993) *Science* **262**: 242-244
85. Górski A (1990) *Immunologia Polska* **15**: 5-11
86. Eynon EE, Parker DC (1992) *J Exp Med* **175**: 131-138
87. Rammensee H-G (1991) *Bone Marrow Transplant* **7** (suppl 1): 26-28
88. Davenport MP, Hill AVS (1996) *Mol Med Today* **3**: 38-45
89. Germain RN (1995) *Ann NY Acad Sci* **754**: 114-125
90. Viner NJ, Nelson CA, Deck B, Unanue ER (1996) *J Immunol* **156**: 2365-2368
91. Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, Anstey MN, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM (1991) *Nature (Lond)* **352**: 595-600
92. Wraith DC, Smilek DE, Mitchell DJ, Steinman L, McDevitt HO (1989) *Cell* **59**: 247-255
93. Kingsley G (1992) *Clin Exp Rheumatol* **10**: 297-300
94. de Vries RRP (1994) *Nether J Med* **45**: 302-308
95. Topham DJ, Nag B, Arimilli S, Sriram S (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8005-8009
96. Ishioka GY, Adorini L, Guery J-C, Gaeta FCA, LaFond R, Alexander J, Powell MF, Sette A, Grey HM (1994) *J Immunol* **152**: 4310-4319

# Wewnątrzkomórkowy transport enzymów lizosomalnych — Rola receptorów mannozo-6-fosforanu

## Mannose-6-phosphate receptors in intracellular transport of lysosomal enzymes

BARBARA CZARTORYSKA\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Receptory mannozo-6-fosforanu — występowanie i budowa
- III. Rola receptorów M6P w transporcie enzymów lizosomalnych
- IV. Inne funkcje receptorów M6P

**Wykaz stosowanych skrótów:** M6P — mannozo-6-fosforan; M6PR-300, duży R — receptor mannozo-6-fosforanu o m. cz. 300.000; M6PR-46, mały R — receptor mannozo-6-fosforanu o m. cz. 46.000; IGFII — insulinopodobny czynnik wzrostu; TGN — region trans siateczki aparatu Golgi'ego.

### I. Wstęp

Mówiąc o receptorach zazwyczaj myślimy o ich roli w przekazywaniu sygnałów oraz w imporcie rozmaitych substancji do wnętrza komórki. Receptory mannozo-6-fosforanu (M6P) biorą udział w innym procesie, a mianowicie w wewnątrzkomórkowym transporcie białek z miejsca dojrzewania (modyfikacji) tj. aparatu Golgi'ego do miejsca działania tj. lizosomu.

Na temat transportu enzymów lizosomalnych ukazało się kilka artykułów przeglądowych [1-3] a ostatnio, w trakcie przygotowania niniejszej pracy, obszerny artykuł Annete Hille-Rehfeld [4]. W tym ostatnim zainteresowany Czytelnik znajdzie odnośniki do ponad 200 prac. Tu więc ograniczę się do najważniejszych i najnowszych pozycji bibliograficznych.

Pierwsze etapy powstawania białek sekrecyjnych oraz enzymów lizosomalnych są wspólne i obejmują: syntezę polipeptydu, jego transport do światła cystern siatki śródplazmatycznej, odcięcie sekwencji sygnałowej od N końca, glikozylację i wreszcie kolejny transport do aparatu Golgi'ego. W ciągu dalszej wędrówki, od regionu cis do trans aparatu Golgi'ego, białka są modyfikowane, i kierowane do miejsca przeznaczenia. Znacznikiem większości enzymów lizosomalnych jest ugrupowanie M6P\*, a do ich segregacji konieczny jest właściwy receptor. Dotyczy to nie tylko większości hydrolaz lizosomalnych, lecz również innych białek lizosomalnych np. mieloperoksydazy [5].

\* Dr. Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa

### Contents:

- I. Introduction
- II. Mannose-6-phosphate receptors — localisation and structure
- III. M6P receptors in lysosomal enzymes transport
- IV. Other functions of M6P receptors

### II. Receptory mannozo-6-fosforanu — występowanie i budowa

Znane są dwa receptory rozpoznające ugrupowanie M6P — oba są transbłonowymi glikoproteinami:

1) receptor oznaczany skrótem M6PR-300, CI-M6PR, lub IGFII/M6PR, o m. cz. około 300 kDa; jego działanie nie zależy od obecności dwuwartościowych kationów, a rozpoznaje on również tzw. insulinopodobny czynnik wzrostu II, IGF II; dla uproszczenia w niniejszym artykule został on określony jako „duży R”.

2) receptor oznaczany skrótami M6PR-46 lub CD-M6PR, o m. cz. 46 kDa; jego działanie wymaga obecności jonów dwuwartościowych warunkujących powstawanie czynnych oligomerów; dla potrzeb naszego artykułu określony został jako „mały R”.

Receptory M6P izolowane z komórek różnych ssaków m.in. człowieka, wołu, gryzoni [2, 4] a także krabów [6], są bardzo do siebie podobne. Na przykład homologia receptorów izolowanych z komórek ludzkich i wołowych sięga 89%. Co więcej, chimery, w których poszczególne domeny pochodzą od różnych gatunków działają jak „dziki” receptor [7]. Nie będę więc podawała, jakiego organizmu dotyczyć będą poszczególne informacje.

Ilość i wzajemny stosunek obu receptorów M6P zależy od rodzaju komórek i tkanek. Duży R (M6PR-300) występuje we wszystkich tkankach w ilości rzędu kilkaset tys. miejsc wiążących/komórkę (np. w komórkach nadnerczy wołu 280 tys./komórkę [9]). W tkankach szczura można następująco uszeregować narządy wg jego zawartości: serce > płuca

\* Informacje na temat fosforylacji mannozy i powstawania znacznika M6P znajdzie Czytelnik w artykule przeglądowym G. P a l a m a r c z y k (1987) *Post Biochem* 33: 297-307.

= łożysko > mięśnie = nerki > wątroba > mózg [10]. W komórkach płodu jest go więcej niż w komórkach osobników dorosłych [11]. W komórkach nabłonkowych jelita grubego występuje w błonie zarówno części wiechołkowej (*apical*), jak i podstawnej (*basal*) [12]. W niektórych komórkach nowotworowych jest go więcej, a jego ilość wzrasta równolegle ze wzrostem ilości katepsyny D i bywa miarą złośliwości nowotworu [13]. W hodowanych fibroblastach skóry jest niemal 4 razy więcej dużego R niż małego; w limfoblastach odwrotnie, małego R jest 7 razy więcej niż dużego i jest go niemal 20 razy więcej niż w fibroblastach [14]. W komórkach osób chorych na chorobę wtrętów komórkowych (brak fosforylacji mannozy w enzymach lizosomalnych) ilość receptorów jest podwyższona [15].

Ciekawostką jest, że w komórce aktywny jest allel pochodzenia matczyne kodujący syntezę dużego R (M6PR-300) [16-18]. W przypadku IGF II aktywny jest gen ojcowski [4, 18].

Oba receptory M6P występują przede wszystkim wewnątrz komórki. Na powierzchni odnajduje się zaledwie 5-10% całkowitej ilości dużego R zaś jego pobyt na powierzchni wynosi 5-6 godz [19]. Receptory znajdujące się na powierzchni i wewnątrz komórki są w dynamicznej równowadze [1-4]. Nadmiar zewnątrzkomórkowego IGF II [20], M6P lub estrów forbolu [4] wywołuje szybką redystrybucję receptora w komórce, to jest jego przemieszczenie z błon wewnętrznych do błony plazmatycznej. Przemieszczenia takie są niezależne od obecności trójfosforanu inozytolu, dwuacyloglicerolu czy cAMP [20]. W komórkach niektórych nowotworów stwierdzono upośledzenie segregacji dużego R [21].

Rozmieszczenie obydwu receptorów wewnątrz komórki jest podobne, lecz nie identyczne: oba są obecne w regionie trans aparatu Golgi'ego (TGN) oraz w tych samych endosomach — zarówno wczesnych jak i późnych. Jednakże występują one w innych miejscach endosomu: duży R (M6PR-300) znajduje się raczej w małych, centralnych wakuolach, zaś mały (M6PR-46) w połączonych kanalikach i pęcherzykach (ATV) [22]. Dojrzałe lizosomy nie zawierają receptorów. Zjawisko to jest wykorzystywane do identyfikacji frakcji subkomórkowych — tj. do rozróżniania endosomów i lizosomów [1].

Pewna ilość dużego R krąży w postaci rozpuszczalnej w krwiobiegu. Jest to ilość zmienna, zależy m.in. od wieku — najwyższa jest w krwi płodowej i u noworodków; z wiekiem maleje [23], maleje też w czasie głodzenia [24]. Krążący receptor pochodzi u płodu głównie z mięśnia szkieletowego i sercowego zaś u osobników dorosłych z wątroby [23]. Niektórzy autorzy uważają, że to właśnie w przestrzeni pozakomórkowej zachodzi degradacja receptora i że pierwszym jej etapem jest działanie nielizosomalnych proteaz [25]. Okres półtrwania małego receptora wynosi ponad 40 godz [26].

Geny kodujące oba receptory M6P w komórkach ludzkich, mysich i bydłych zostały sklonowane, a sekwencja aminokwasowa oznaczona [1-4]. Podstawowe informacje dotyczące budowy obu ludzkich receptorów M6P zebrano w tabeli 1.

Wiązanie liganda warunkuje domena zewnętrzna, a więc ta, która skierowana jest albo na zewnątrz komórki albo do wnętrza światła organelli (cystern i kanalików aparatu Golgi'ego oraz endosomów).

Domena zewnętrzna dużego receptora (M6PR-300) zawiera powtarzające się podjednostki (15-38% homologii). Charakterystyczną cechą jest obecność cysteiny flankującej reszty hydrofobowe w konserwatywnej sekwencji

Cys—(Thr/Glu)—Tyr—X—Phe(Glu)—Trp—X—Thr—X—(Ala/Val—Ala—Cys\*\* [2]. Układ ten różni się od układów spotykanych w innych receptorach, natomiast podobny znaleziono w XII czynniku krzepnięcia. W 13-tej podjednostce znajduje się 43 aminokwasowa insercja, wysoce homologiczna z regionem II fibronektyny [1]. Receptory izolowane z różnych komórek różnią się rodzajem łańcuchów oligosacharydowych, głównie stosunkiem ilości łańcuchów jedno- i dwuantenowych [27].

Uderzające jest podobieństwo sekwencji aminokwasów zewnętrznej domeny małego R (M6PR-46) i bogatej w cysteinę, powtarzającej się podjednostki analogicznej domeny dużego R (identyczność rzędu 14-28% a więc taka sama, jak podjednostek między sobą, p. tabela 1). Stąd hipoteza o wspólnym antenacie obu receptorów: fragment genu kodujący syntezę domeny zewnętrznej M6PR-300 powstał być może na drodze amplifikacji części genu kodującego syntezę małego R [2].

Domena cytoplazmatyczna warunkuje odpowiednie przemieszczanie się receptora wewnątrz komórki [4, 28]. Nie stwierdzono homologii sekwencji aminokwasów tej domeny w dużym i małym receptorze, choć widoczne są pewne podobieństwa. W obu przypadkach domena cytoplazmatyczna zawiera miejsca potencjalnej fosforylacji oraz skupienia kwaśnych reszt aminokwasowych, podobnie jak to ma miejsce w innych receptorach transportujących. W przypadku dużego R domena cytoplazmatyczna jest dłuższa od analogicznej domeny wielu innych receptorów transportujących np. asjaloglikoproteiny czy lipoproteiny, a także receptora małego. W małym R cysteina może ulegać palmitylacji a alifatyczny łańcuch palmitynianu służy prawdopodobnie do zakotwiczenia receptora w warstwie lipidowej błony [26].

Informacje o fosforylacji receptorów są fragmentaryczne i często sprzeczne. Nie ulega jednak wątpliwości, że domena cytoplazmatyczna obu receptorów jest w ciągu ich wędrówek wewnątrzkomórkowych kilkakrotnie fosforylowana i defosforylowana. Czas pół-

\*\* — reszty w nawiasach oznaczają niższy % konserwatywności, x — jej brak

**Tabela 1.**

Wybrane informacje o budowie i własnościach receptorów mannozo-6-fosforanu.

Informacja		DUŻY RECEPTOR	MAŁY RECEPTOR
Stosowane skróty:		M6PR-300, CI-MOR, IGF II-M6PR	M6PR-46, CD-M6PR
Chromosom, gen		6q25—27, 130kb, 48 eksonów [wg 4]	12, 12 kb, 7 eksonów [wg 4]
B i a ł k o	Liczba aminokwasów w domenach:	40 — 2264 — 23 — 164 [wg 1] sygnał-zewnętrzna-śródbłonowa-cytoplazmatyczna	20/26 — 164/170 — 20 — 67 [wg 1] sygnał-zewnętrzna-śródbłonowa-cytoplazmatyczna
	M. cz. polipeptydu/ /białka	270 kDa/275-300 kDa [wg 1]	30 kDa/43—46 kDa [wg 1]
	Domena zewnętrzna:	15 powtórzeń (podjednostek) po 147 aminokwasów, 16-38% homologii między nimi [wg 1]  19 miejsc możliwej glikozylacji, 2 z nich są glikozylowane [wg 1] 3-4 mostków S—S na podjednostkę [wg 4]	14-28% homologii z zewnętrzną domeną dużego R [wg 1]  5 możliwych miejsc glikozylacji, 4 z nich są glikozylowane [wg 1] 3 mostki S—S, w pozycji: 32/78, 132/167, 145/179 [34]
	Domena cytosolowa:	charakter kwaśny [wg 1], przejściowo fosforylowana <i>in vivo</i> seryna 82 <sup>8a</sup> i 157 <sup>1a</sup> <i>in vitro</i> 20 <sup>1a</sup> i ? [30]	charakter kwaśny, brak homologii z dużym R [wg 1], bywa fosforyl. Ser 56 <sup>1a</sup> [2], palmitylowana Cys 30 <sup>1a</sup> i 34 <sup>1a</sup> [26]
	Oligomeryzacja:	monomer	monomer Mn <sup>++</sup> , 4 <sup>o</sup> ⇔ dimer ⇔ Mn <sup>++</sup> , 4 <sup>o</sup> tetramer [73, 73a]
	Ligandy:	wolny i związany M6P oraz IGF II	wolny i związany M6P
wł. re- cep- tora	Miejsce wiązania M6P:	dwa miejsca w 3 i 9 podjednostce, opt. pH 6,0-7,4; [wg 4] udział 435 i 1334 argininy [74]	jedno miejsce wiążące M6P, opt. pH 6,0-6,3 [wg 4] udział 137 argininy i 131 histydyny [42]
	Miejsce wiązania IGF II:	jedno w 11 podjednostce, udział lizyny [75]	brak wiązania
	Zależność od kationów:	wiązanie M6P nie zależy od obecności kationów	wiązanie M6P wymaga obecności kationów dwuwartościowych np. Mn <sup>++</sup>
Transport enzymów lizosomalnych		Transport TGN → endosom i endocytoza	Transport TGN → endosom i TGN → bł. plazmat.

obrotu fosforanu w cząsteczce dużego R wynosi 1,4 h, podczas gdy czas półtrwania całej cząsteczki wynosi 40 godzin [29]. Kinazy — kazeinowa I, II i pokrewne — fosforylują *in vivo* wyłącznie serynę 82 i 157 tej domeny, a fosforylację tę warunkuje reakcja z nieznanym białkiem cytosolu. *In vitro* tę samą domenę w innych miejscach (20-sta i X seryna) fosforyluje kinaza A [30]. Enzymem defosforylującym jest fosfataza 2A [31]. Receptor izolowany z mózgu wykazuje aktywność kinazy białkowej co oznacza, że reszty seryny lub treoniny receptora mogą ulegać autofosforylacji. Ligandy zawierające ugrupowanie M6P stymulują związaną z receptorem aktywność fosfatazową, a defosforylacji ulegają oba aminokwasy. IGF II nie ma wpływu na tę aktywność. Nie wiadomo, czy obserwowana aktywność jest właściwością samego receptora czy też związanego z nim innego białka [32].

Fosforylacja małego R nie ma wpływu na jego stabilność ani na ujawnianie się na powierzchni komórki [29]. *In vitro* fosforyluje go kinaza kazeinowa II, zaś defosforyluje fosfataza 2. Warunkiem fosforylacji jest obecność w pozycji 26-32 sekwencji Ala—Asp—Gly—Cys—Asp—Phe—Val [33].

Duży R (M6PR-300) ma 2 miejsca wiążące o wysokim powinowactwie do mannozo-6-fosforanu (M6P). Znajdują się one w 3 i 9 powtarzającej się podjednostce domeny zewnętrznej receptora. Ugrupowania te nie biorą udziału w sekrecji, glikozylacji ani w reakcji receptora z przeciwciałem [1, 4], jak również w wiązaniu czynnika wzrostu IGFII. Miejsce wiążące IGFII znajduje się w 11 podjednostce domeny zewnętrznej (Tab. 1).

Mały R (M6PR-46) wiąże zawierające M6P ligandy jedynie w obecności kationów, np. Mn<sup>++</sup>, warunkujących powstawanie oligomerów, głównie dimerów (Tab. 1). Jedna cząsteczka (monomer) M6PR-46 może związać jedną cząsteczkę wolnego M6P albo 0,5 mola oligosacharydu lub glikoproteiny zawierających 2 reszty M6P. W każdym aktywnym, dwufunkcyjnym dimerze są dwa miejsca mogące związać ugrupowanie M6P, wiąże on jednak tylko jedną cząsteczkę glikoproteiny zawierającej dwa ugrupowania M6P. Ważną rolę w tym wiązaniu spełniają wszystkie trzy pary mostków dwusiarczkowych, które warunkują odpowiednią konformację [34]. Również łańcuchy cukrowe, choć nie biorą udziału w wiązaniu M6P, grają

istotną rolę w utrzymaniu struktury IV-to rzędowej receptora zapewniającej wysokie powinowactwo do liganda [4].

Optymalne pH wiązania liganda wynosi 6,0-7,4 w przypadku dużego R, zaś 6,0-6,3 w przypadku małego [4].

Powinowactwo obydwu receptorów do wolnego M6P oraz do oligosacharydów i glikoprotein zawierających jedną grupę M6P jest takie samo; w przypadku związków zawierających dwa lub więcej ugrupowań M6P wyższe powinowactwo ma receptor duży.

*In vivo* najważniejszymi ligandami omawianych tu receptorów są enzymy lizosomalne. Swoistość obu receptorów jest podobna, ale nie identyczna. Są doniesienia o istnieniu, wśród całej puli enzymów lizosomalnych, subgrup wiązanych wyłącznie, lub przede wszystkim, przez jeden z receptorów [35]. Być może w swoistości wiązania grają rolę łańcuchy oligosacharydowe enzymów lub receptorów.

Jak powiedziano powyżej, duży receptor (M6PR-300) wiąże również insulinopodobny czynnik wzrostu II (IGF II). Miejsce wiązania mieści się daleko od miejsc wiązających M6P, a mianowicie w podjednostce 11-tej, a dla wiązania ważną rolę gra lizyna [41] (Tab. 1). Mimo to wiązanie IGF II nie pozwala na wiązanie enzymów lizosomalnych (ale nie wolnego M6P) i *vice versa*, prawdopodobnie ze względów konformacyjno-sferycznych. Niektórzy autorzy [4, 14, 15] uważają, że wiązanie IGFII nie wpływa na rozmieszczenie enzymów lizosomalnych w komórce. Jednak według większości autorów [36, 39, 41, 42], wiązanie IGF II zmienia istotnie profil rozmieszczenia enzymów lizosomalnych mimo, że miejsca wiążące oba ligandy są odległe (Tab. 1).

### III. Rola receptorów M6P w transporcie enzymów lizosomalnych

Ilustracją znaczenia omawianych tu receptorów jest choroba zwana chorobą wtrętów komórkowych (ang. *I-cell disease*). Jest to bardzo ciężka choroba spichrzeniowa. Jej przyczyną jest błąd genetyczny\*\*\*, w wyniku którego nie następuje ufosforylowanie mannozy, a w konsekwencji brak jest ugrupowania M6P w cząsteczkach enzymów lizosomalnych. Błąd w strukturze enzymów, nie wpływając na aktywność enzymatyczną ani na trwałość, wpływa drastycznie jedynie na ich rozmieszczenie w komórce. Enzymy bowiem, zamiast kierować się do lizosomu i tam działać uciekają poza komórkę i odnajduje się je w surowicy, moczu, łzach itp. W lizosomach jest ich o wiele za mało [37, 37a].

Hodowane komórki, którym zablokowano duży R przeciwiałem oraz mutanty pozbawione tego receptora wydają około 70% enzymów lizosomalnych poza komórkę [1]. (Prawidłową kompartmentację enzymów można przywrócić mutantom transfekując komórki odpowiednim cDNA). Zablokowanie obu receptorów M6P swoistymi przeciwiałami powoduje

dalszy wzrost wydalania enzymów [2]. Ten sam rezultat obserwuje się u mutantów pozbawionych obu receptorów [35]. Można więc przypuszczać, że pozostałe 30% enzymów trafia do lizosomu *via* mały R lub też z udziałem innych mechanizmów transportu, niezależnych od receptorów M6P.

Komórki pozbawione małego R również wykazują nieprawidłową kompartmentację enzymów lizosomalnych [4, 35]. Zmutowane myszy, które go nie syntetyzują, żyją normalnie, ale w płynach pozakomórkowych mają podwyższony, wewnątrz zaś komórek obniżony poziom enzymów lizosomalnych niosących grupę M6P. W endosomach/lizosomach tych zwierząt obserwuje się wzmożoną akumulację substancji wielkocząsteczkowych. [4].

Dodanie hodowanym komórkom do pożywki nadmiaru IGF II [38] lub też transfekowanie ich cDNA powodujące nadprodukcję IGF II [39], obniża wewnątrzkomórkową aktywność enzymów lizosomalnych, zwiększa ich wydalanie do pożywki [39] oraz hamuje endocytozę enzymów z pożywki [40-42]. Zachwianie równowagi stężeń ligandów i receptora (np. transformacja nowotworowa lub zaburzenia hormonalne) zaburza też segregację enzymów lizosomalnych [21, 42].

Podstawową różnicą między dużym i małym receptorem jest udział w endocytozie: wprawdzie zarówno jeden jak i drugi bierze udział w transporcie enzymów lizosomalnych do endosomów, a obydwa potem wracają do regionu trans aparatu Golgi'ego (TGN), oba też przemieszczają się do błony plazmatycznej, lecz jedynie mały R pośredniczy w eksporcie enzymów poza komórkę [2-4], zaś jedynie duży bierze udział w ich endocytozie, tj. wychwytywaniu z przestrzeni pozakomórkowej. Sam mały R też ulega endocytozie. Tak więc w przypadku braku dużego R lub zablokowania go przez wolną M6P [4] enzymy przetransportowane przez mały R do błony plazmatycznej nie mogą zostać odzyskane drogą endocytozy.

Duży R (M6PR-300) uczestniczy także w endocytozie takich białek jak prekursor czynnika wzrostu  $\beta$ , proliferyn, tyreoglobuliny, a także białka obce np. glikoproteina D wirusa *Herpes* [43].

Enzymy lizosomalne trafiają do miejsca przeznaczenia dwiema trasami: bezpośrednio lub na drodze endocytozy.

Jak już powiedziano powyżej, większość enzymów lizosomalnych otrzymuje znacznik M6P w regionie cis aparatu Golgi'ego, a więc mogłyby tam wiązać receptor i albo przesuwać się jako kompleks wzdłuż cystern i kanalików aparatu Golgi'ego albo też natychmiast go opuszczać. Istotnie w regionie tym stwierdzono sporą koncentrację dużego R. Z drugiej jednak strony wiadomo, że cząsteczki receptorów na ogół zawierają zmo-

\*\*\* błąd dotyczy N-acetyloglukozominylo-1-fosfotransferazy UDP — N-acetyloglukozoamina [EC 2. 7. 8. 17] lub glukozoamino-1-fosfotransferazy [EC 3. 1. 4. 45] [37a]

dyfikowany łańcuch oligosacharydowy, a modyfikacja (transglikozylacja) zachodzi w regionie trans. W tym też regionie stwierdzono obecność opłaszczonych klatryną pęcherzyków, zawierających zarówno receptory jak i enzymy [1]. Pierwsza fosforylacja seryny w receptorze zachodzi równocześnie z przyłączeniem kwasu sjałowego, a więc w momencie wychodzenia białka z regionu trans aparatu Golgi'ego (TGN) [44].

Badania nad wędrówką znakowanych receptorów w rozmaitych komórkach hodowanych wskazują, że oba receptory opuszczają region trans siateczki Golgi'ego (TGN) *via* te same opłaszczone pęcherzyki [1]. Kompleks enzym/receptor gromadzi się w opłaszczonych klatryną wgłębieniach, które odpączkują tworząc opłaszczone pęcherzyki dalej transportowane do endosomów. W skład takiego kompleksu transportowego, „płaszczomeru” (ang. *coatomers*), wchodzi białko adaptorowe, HA-1 (lub AP-1, *adaptor clatrin associated protein*) oraz białko zwane Rab 4. Rab 4 jest to podobna do białek Ras, drobnocząsteczkowa GTP-aza, zwana inaczej ARF (ang. *ADP-ribosilation factor*) [3, 45]. Powstawaniu kompleksu towarzyszy wymiana nukleotydu. Warunkiem tworzenia „płaszczomeru” przez duży R jest ufosforylowanie seryny [47-49] przez kinazę inozytoli. Enzym ten spełnia analogiczną rolę w transporcie hydrolaz do wakuoli trawiennych w drożdżach [49]. Ludwig i w.s.p. [3] uważają, że receptor i Rab 4 są niezbędnymi składnikami „płaszczomeru” i że warunkują utworzenie miejsca wiązania białka HA-1 wiązaniem o wysokim powinowactwie oraz jego transport. Hydroliza GTP wywołana działaniem Rab-4, przy współdziałaniu białek szoku termicznego hsp 70, powoduje uwolnienie płaszczomeru z pęcherzyków transportowych i rozpad na składniki o niskim powinowactwie do HA-1. Podczas tego transportu wewnątrz pęcherzyków następuje dalsze „dojrzwianie” białka enzymatycznego pod wpływem działania różnych peptydaz [50]. Kwaśne środowisko endosomu powoduje dysocjację kompleksu, enzymy są uwalniane do wnętrza endosomu [2, 4] i powstaje lizosom pierwszorzędowy. Receptor powraca do regionu trans aparatu Golgi'ego. Wewnątrz lizosomu następuje odłączenie grupy fosforanowej od mannozy, dojrzała więc cząsteczka enzymu nie zawiera ugrupowania M6P. Szybkość defosforylacji zależy od enzymu, rodzaju komórki oraz od środowiska zewnątrzkomórkowego [51]. W komórkach niektórych nowotworów złośliwych defosforylacja bywa nieprawidłowa [52].

Mały R szybciej niż duży przemieszcza się do kanalików i pęcherzyków. Są to prawdopodobnie struktury przeznaczone do powrotu do regionu trans aparatu Golgi'ego. Wydaje się, że istnieje „przedział pośredni”, położony blisko regionu trans aparatu Golgi'ego. Obserwowane bowiem struktury zawierają niewielkie ilości białka Rab 4, o którym wiadomo, że uczestniczy w powrocie innych białek do TGN, natomiast nie zawierają markerów wczesnych i późnych

endosomów, a mianowicie białek rab 5 i rab 7 [53]. Wydaje się, że warunkiem powrotu małego R do TGN jest palmitylacja 34 cysteiny w domenie cytoplazmatycznej. Mutacja polegająca na zamianie 34-tej cysteiny na alaninę powoduje bowiem akumulację receptora w lizosomach i utratę zdolności transportu katepsyny do lizosomu. Palmitylacja zachodzi ze stosunkowo dużą szybkością: okres półobrotu wynosi 2 godziny wobec 40 godzin obrotu całego receptora [26]. Białka adaptorowe HA-1 (AP-1) towarzyszą w transporcie w obu kierunkach. W powrocie do TGN uczestniczy też inna podobna do białka Ras GTP-aza, zwana Rab 9 [45, 54].

Tak więc wydaje się, że receptory M6P są istotnym elementem niezbędnym do powstania „płaszczomeru” i odpączkowania opłaszczonych klatryną pęcherzyków oraz ich powrotu do TGN, i że jest to ich funkcja niezależna od transportu enzymów lizosomalnych [3, 55, 56].

Niewielka ilość enzymów lizosomalnych jest wydalana poza komórkę, tak samo jak białka sekrecyjne. Odbywa się to albo bez udziału receptora, pasywnie, w strumieniu innych białek, albo też przy udziale małego R (M6PR-46), nigdy zaś dużego (M6PR-300). Mechanizm transportu do błony plazmatycznej jest nieznan. Po dojściu do błony plazmatycznej część enzymów dostaje się do płynów pozakomórkowych — w surowicy krwi występują głównie cząsteczki „niedojrzałe”, niezmodyfikowane, a więc wywodzące się z regionu cis aparatu Golgi'ego [57]. Inna część enzymów wiąże się w błonie plazmatycznej z dużym R i, *via* opłaszczone klatryną pęcherzyki, na drodze endocytozy, wchodzi do kwaśnych przedziałów endosomalnych. W procesie tym bierze udział tzw. białko adaptacyjne HA-2 (zwane też AP-2) [45, 54]. W endosomie receptor oddysocjowuje, enzym wchodzi do lizosomu, receptor wraca na powierzchnię (lub do TGN) i może być ponownie użyty do tego samego celu. Ufosforylowanie receptora nie wpływa na endocytozę, natomiast jest warunkiem jego redystrybucji w błonie plazmatycznej [31]. Podczas powrotu z błony plazmatycznej do TGN białko jest fosforylowane i resjaliowane [44]. Istnieje dynamiczna równowaga między receptorami na powierzchni i wewnątrz komórki [1]. Recyklicacji podlegają zarówno receptory wolne jak i związane z ligandem.

Oba receptory zawierają w domenie cytoplazmatycznej kilka „miejsz sygnałowych”, które pośredniczą w starciu i dojściu do trzech różnych miejsc przeznaczenia: aparatu Golgi'ego, błony plazmatycznej i endosomy [1]. Świadczy o tym m.in. wynik prac C o n i - b e a r a i P e a r s e ' a [28]. Stwierdzili oni, że chimery zbudowane z co najmniej 121 aminokwasów końcowych (od strony C-końca) domeny cytoplazmatycznej i domeny śródbłonowej dużego R i lizozymu (który gra rolę domeny zewnętrznej) rozmieszczają się w komórce tak samo jak sam receptor, tj. większość gromadzi się w TGN zaś około 10% odnajduje się w błonie



plazmatycznej. W tych samych też regionach komórki odnajduje się endocytowaną chimere, zbudowaną z domeny zewnętrznej dużego R, a śródblonowej i cytoplazmatycznej receptora LDL lub naskórkowego czynnika wzrostu [59]. Jednakże rozmieszczenie chimery zbudowanej z domeny cytoplazmatycznej dużego R i domen śródblonowej oraz zewnętrznej naskórkowego receptora wzrostu jest inne [58]. Doświadczenia te wskazują, że domena zewnętrzna ma również jakiś udział w recyklicacji receptora oraz zatrzymywaniu go w endosomach. Oba receptory docierają do błony plazmatycznej prawdopodobnie razem z białkami wydzielniczymi. Ekspresji dużego receptora na powierzchni komórki towarzyszą zmiany fosforylacji seryny [31].

Znaczenie poszczególnych krótkich sekwencji aminokwasowych badano albo blokując je swoistymi przeciwciałami, albo zmieniając na drodze ukierunkowanej mutagenyzy.

Sygnałem internalizacji (endocytozy) dużego R (M6PR-300) jest sekwencja Tyr—Liz—Tyr—Ser—Liz—Val w pozycji 24—29 ogona cytoplazmatycznego, a szczególnie ważna 26-ta Tyr i 29-ta Val [4]. Wydaje się, że aromatyczny pierścień tyrozyny stanowi uniwersalny sygnał-wytrych bezpośredniej endocytozy różnych białek (m.in. receptora LDL, transferyny itp.) [60].

Dla endocytozy małego R (M6PR-46) ważne są dwa miejsca w domenie cytoplazmatycznej: jedno to 12 i 14 Phe, drugie to 44 Tyr w sekwencji Ala—Tyr—Arg—Gly—Val [61].

Jednym z sygnałów do opuszczenia regionu trans aparatu Golgi'ego przez duży R jest motyw -Leu-Leu domeny cytoplazmatycznej. Zmodyfikowany bowiem receptor nie zawierający sekwencji Leu—Leu—His—Val [61] lub His—Leu—Leu—Pro—Met [62] nie transportuje katepsyny D do lizosomów nie wpływając na jej transport do błony plazmatycznej. Wydaje się, że motyw -Leu-Leu- ma bardziej uniwersalne znaczenie, że warunkuje wszelki transport z regionu trans aparatu Golgi'ego (TGN) do endosomów [63], natomiast nie ma wpływu na powrót z błony plazmatycznej do TGN [61]. Ten sam motyw w sekwencji —Asp—Asp—Ser—Asp—Glu—Asp—Leu—Leu—His—Leu— jest sygnałem powrotu do TGN, przy czym istotna jest rola seryny — miejsca fosforylacji. Prawdopodobnie jest to miejsce rozpoznawane przez białko adaptorowe [7].

W przypadku małego R warunkiem wiązania białka HA-1 jest sekwencja Glu—Ser—Glu—Glu—Arg, a więc również miejsce fosforylowane przez kinazę —Leu—Leu— kazeinową II. Motyw -leu-leu- nie wpływa na powinowactwo receptora do HA-1 natomiast warunkuje dalsze etapy transportu [64]. Sygnał powrotu małego receptora do TGN to m.in. sekwencja 43-47 Ala—Tyr—Arg—Gly—Val—, również na tym etapie gra rolę tyrozyna [53].

#### IV. Inne funkcje receptorów M6P

Jak powiedziano wyżej, duży R pochodzący z komórek ssaków wiąże również IGF II. Właściwości tej nie ma receptor z komórek ptasich ani żab [65], posiada receptor oposa, choć powinowactwo jest w tym przypadku niższe [66]. Wydaje się więc, że nabycie tej cechy w rozwoju filogenetycznym nastąpiło tuż przed rozdzieleniem się ssaków i torbaczy.

Kompleks IGF II/receptor też trafia do lizosomu gdzie następuje modyfikacja IGF II. Na skutek działania dipeptydyloaminopeptydazy I (katepsyny C) od cząsteczki IGFII odszczepia się dwupeptyd co nie wpływa na aktywność tego czynnika wzrostu [67].

Dotychczas nie wiadomo, czy wiązanie liganda do receptora uruchamia system sygnałów wewnątrzkomórkowych. Nie potwierdzają się doniesienia, iż przyłączenie IGF II powoduje aktywację białek typu Gi [68], towarzyszy mu natomiast stymulacja swoistej fosfolipazy inozytolu [27]. Są doniesienia, że duży R wiąże jakieś inne białko cytosolowe, zaś warunkiem wiązania jest fosforylacja kinazą podobną do kinazy kazeinowej II — nie znane jest znaczenie tego procesu [46].

Powstają pytania dlaczego M6P i IGFII mają wspólny receptor? Czy pozostałe powtarzające się podjednostki dużego receptora służą jedynie do rozdzielenia miejsc wiążących M6P i IGFII czy też zawierają miejsca receptorowe innych czynników? Wiadomo, że insulinopodobny czynnik wzrostu IGF II odgrywa szczególną rolę w rozwoju podczas życia płodowego, być może w różnicowaniu tkanek [69]. Nie można wykluczyć, że IGF II moduluje pozakomórkowy transport enzymów lizosomalnych.

W osteoklastach duży R uczestniczy w transporcie enzymów lizosomalnych do błony części szczytowej (*apical*); enzymy te są stamtąd wydalane do przestrzeni, w której następuje resorbcja kości. Wolna M6P stymuluje produkcję fosfatazy alkalicznej przez osteoklasty [70]. Badania na sztucznym modelu kostnienia wykazały, iż w trakcie tego procesu zmienia się ilość dużego R oraz mRNA [71]. Niektórzy uważają więc, że wspólny receptor IGFII/M6P może mieć znaczenie np. w procesie modulacji kości podczas rozwoju szkieletu, przez okresowe hamowanie reinternalizacji enzymów albo wpływając na rozmieszczenie dużego R w błonach aparatu Golgi'ego.

O'Brien i wsp. [72] wysunęli hipotezę, że receptory M6P grają również istotną rolę w różnicowaniu komórek rozrodczych. Stwierdzili bowiem istotne różnice w ilości i wzajemnych stosunkach obu receptorów w spermatocytach, okrągłych spermatydach oraz komórkach Sertolliego, które to wydalają 10 różnych glikoprotein zawierających ugrupowanie M6P.

Poznanie roli receptorów M6P rzuciło światło na skomplikowany system wewnątrzkomórkowego transportu białek. Poznanie dróg internalizacji enzymów lizosomalnych ma ogromne znaczenie nie tylko

poznawcze ale również praktyczne. Podejmuje się bowiem próby substytucyjnego leczenia chorób lizosomalnych.

Artykuł otrzymano 30 kwietnia 1996 r.  
Zaakceptowano do druku 6 września 1996 r.

## Piśmiennictwo

1. Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S (1989) *J Biol Chem* **264**: 12115-12118
2. Kiess W, Hoeflich A, Yang Y, Kessler U, Flyvbjerg A, Berenton B (1993) *Adv Exp Med Biol* **343**: 175-188
3. Ludwig T, Le Borgne R, Hoflack B (1994) *Trends Cell Biol* **5**: 202-205
4. Hille-Rehfeld A (1995) *Biochim Biophys Acta* **1241**: 177-194
5. Nauseef WM, McCormick S, Yi H (1992) *Blood* **80**: 2622-2623
6. Alvarez V, Paroli A, Couso R (1995) *Biochem J* **310**: 589-595
7. Chen HJ, Remmler J, Delaney JC, Messner DJ, Lobel P (1993) *J Biol Chem* **268**: 22338-22346
8. Ludwig T, Tenscher K, Remmler I, Hoflack B (1994) *Gene* **143**: 311-312
9. Weber MM, Kiess W, Beikler T, Simmler P, Reichel M, Adelmann B, Kessler U, Engelhardt D (1994) *Eur J Endocrin* **130**: 265-70
10. Nissley P, Kiess W, Skler M (1993) *Mol Reprod Dev* **35**: 408-413
11. Funk B, Kessler U, Eisenmenger W, Hansmann A, Kolb HJ, Kiess W (1992) *J Endocrinol Metab* **75**: 424-431
12. Pillion DJ, Grizzle WE, Yang M, Meezan E, Stockard CR, Ganapathy V, Leybach FH, Myers RB, Heskkei JF (1993) *Am J Physiol* **264**: R 1101-1110
13. Zhao Y, Escot C, Maudelonde T, Puech C, Rouanet P, Rochefort H (1993) *Cancer Res* **53**: 2901-2905
14. Diciocio RA, Miller AL (1992) *Glycoconj* **9**: 56-62
15. Braulke T, Tippmer S, Matzner U, Gartung C, von Figura K (1992) *Biochim Biophys* **1138**: 334-342
16. Wang ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wagner EF (1994) *Nature (Lond)* **372**: 464-467
17. Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart C (1994) *Genes Dev* **8**: 2953-2963
18. Reppolee DA, Sturm KS, Behrendtsen O, Schultz GA, Pedersen RA, Werb Z (1992) *Genes Dev* **6**: 939-952
19. Green SA, Kelly RB (1992) *J Cell Biol* **117**: 47-55
20. Damke H, Bouterfa H, Braulke T (1994) *Mol Cell Endocrin* **99**: R 25-29
21. Braulke T, Mach L, Hoflack B, Glossl J (1992) *Arch Biochem Biophys* **298**: 176-178
22. Klumperman J, Hille A, Veenendaal T, Oorschot V, Stoorvogel W, von Figura K, Geuze HJ (1993) *J Cell Biol* **121**: 997-1010
23. Bobek G, Scott CD, Baxter RC (1992) *Endocrin* **130**: 3387-3394
24. Gallaher BW, Oliver MH, Einhorn K, Kessler U, Kiess JE, Gluck PD, Breier BH (1994) *Eur J Endocrin* **131**: 398-404
25. Clairmont KB, Czech MP (1991) *J Biol Chem* **266**: 12131-12134
26. Schweitzer A, Kornfeld S, Rohrer J (1996) *J Cell Biol* **132**: 577-584
27. Miyagishima T (1993) *Hokkaido Igotu Zasshi* **68**: 414-430
28. Conibear E, Pearse BM (1994) *J Cell Sci* **107**: 923-932
29. Hemer F, Korner C, Braulke T (1993) *J Biol Chem* **268**: 17108-17113
30. Rosorius O, Mieskes G, Issinger OG, Korner C, Schmidt B, von Figura K, Braulke T (1993) *Biochem J* **292**: 833-838
31. Braulke T, Mieskes G (1993) *J Biol Chem* **267**: 17347-53
32. Panneerselvam K, Balasubramanian AS (1993) *Cell Signal* **5**: 269-277
33. Korner C, Herzog A, Weber B, Rosorius O, Hemer F, Schmidt B, Braulke T (1994) *J Biol Chem* **269**: 16529-16532
34. Wendlandt M, von Figura K, Pohlmann R (1991) *J Biol Chem* **266**: 7132-7136
35. Ludwig T, Munier-Lehmann H, Bauer L, Hollinshead M, Ovitt C, Lobel P, Hoflack B (1994) *EMBO J* **13**: 3430-3437
36. Jacobsen C, Jessen H, Flyvbjerg A (1995) *Biochem Biophys Acta* **1235**: 85-92
37. Kornfeld S, Sly WS, (red) Scriver CS, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (1995) w: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, str. 2495-2508
- 37a. Hasilik A, Waheed A, von Figura K (1981) *Biochem Biophys Res Com* **98**: 761-767
38. De Ceuninck F, Poiraudeau S, Pagano M, Tsagris L, Blanchard O, Willeput J, Corvol M (1995) *Molec Cell Endocrin* **113**: 205-213
39. Hoeflich A, Wolf E, Braulke T, Koepf G, Kessler U, Brem G, Rascher W, Blum W, Kiess W (1995) *Europ J Biochem* **232**: 172-178
40. Schmitz F, Bresciani R, Hartmann H, Braulke T (1995) *J Hepatol* **22**: 356-363
41. Kessler U, Aumeier S, Funk B, Kiess W (1992) *Mol Cell Endocrin* **90**: 147-153
42. Vignon F, Rochefort H (1992) *Breast Cancer Res Tract* **22**: 47-57
43. Brunetti CR, Burke RL, Kornfeld S, Gregory W, Mosiaryz FR, Dingwell KS, Johnson DC (1994) *J Biol Chem* **269**: 17067-17074
44. Meresse S, Hoflack B (1993) *J Cell Biol* **120**: 67-75
45. Novick P, Garnett MD *Nature (Lond)* **369**: 18-19
46. Rosorius O, Jessinger OG, Braulke T (1993) *J Biol Chem* **268**: 21470-21473
47. Le Borgne R, Schmidt A, Mauxion F, Griffiths G, Hoflack B (1993) *J Biol Chem* **268**: 22552-22556
48. Davidson HW (1995) *J Cell Biol* **130**: 797-805
49. Brown WJ, De Wald DB, Emr SD, Plutner H, Balch WE (1995) *J Cell Biol* **130**: 781-796
50. Delbruck R, Desel C, von Figura K, Hille-Rehfeld A (1994) *J Cell Biol* **64**: 7-14
51. Feinstein R, Gobel CA (1991) *J Cell Biol* **112**: 81-94
52. Sleat DE, Chen TL, Raska J Jr, Lobel P (1995) *Cancer Res* **55**: 3424-3430
53. Schluzer-Garg C, Böker C, Nadimpalli SK, von Figura K, Hille-Rehfeld A (1993) *J Cell Biol* **122**: 541-551
54. Riederer MA, Soldati T, Shapiro A, Lin J, Pfeffer SR (1994) *J Cell Biol* **125**: 573-582
55. Le Borgne R, Schmidt A, Mauxion F, Griffiths G, Hoflack B (1993) *J Biol Chem* **268**: 22552-22556
56. Tamigawa G, Orci L, Amhendt M, Ravwrella M, Helms JB, Rothman JE (1993) *J Cell Biol* **123**: 1365-1371
57. Izakson A, Hultberg B (1995) *Scand J Clin Lab Invest* **55**: 433-440
58. Dintzis SM, Pfeffer SR (1990) *EMBO J* **9**: 77-84
59. Dintzis SM, Velsculescu VE, Pfeffer SR (1994) *J Biol Chem* **269**: 12159-12166
60. Collawn KF, Kuhn LA, Liu LF, Tainer JA, Trowbridge JS (1991) *EMBO J* **10**: 3247-3253
61. Johnson KF, Kornfeld S (1992) *J Biol Chem* **267**: 7110-7111
62. Johnson KF, Kornfeld S (1992) *J Cell Biol* **119**: 249-257
63. Pond L, Kuhn LA, Teyton L, Schultze MP, Tainer JA, Jackson MR, Peterson PA (1995) *J Biol Chem* **270**: 19989-29997
64. Mauxion F, Leborgne R, Mounier-Lehmann H, Hoflack B (1996) *J Biol Chem* **271**: 2171-2178
65. Yang YW, Robbins AR, Nissley SP, Rechler MM (1991) *Endocrin* **128**: 1177-1189
66. Dams NM, Brzycki-Wessel MA, Ramannjam KS, Seethara B (1993) *Endocrin* **193**: 440-446
67. Kiess W, Terry C, Burgess WH, Linder B, Lopaczynski W, Nissley P (1994) *Eur J Biochem* **226**: 179-184
68. Korner C, Nurnberg B, Uhde M, Braulke T (1995)

- J Biol Chem* **270**: 287-295
69. Kiess W, Yang Y, Kessler U, Hoeflich A (1994) *Hormon Res* **41** Supl 2: 66-73
70. Ishibe M, Rosier RN, Puzas JE (1991) *Endocrin Res* **17**: 357-366
71. Yu-Ym, Sklar MM, Nissley SP, Redd AH (1993) *Biochem Biophys Res Com* **195**: 516-524

72. O'Brien DA, Gabel CA, Welch JE, Eddy EM (1991) *Ann NY Acad Sci* **637**: 327-329
73. Ma Z, Grubb JH, Sly WS (1992) *J Biol* **267**: 19017-19022
74. Dahms NM, Rose PA, Malkentin JD, Zhang Y, Brzycki MA (1993) *J Biol Chem* **268**: 5457-5463
75. Gormundi F, McDonald RG (1994) *J Biol Chem* **269**: 26944-26952

# Kwas arachidonowy w fizjologii i patologii tkanki nerwowej

## Arachidonic acid in physiology and pathology of nervous tissue

LUDMIŁA ŻYLIŃSKA<sup>1</sup>,  
LILLA LACHOWICZ<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Właściwości ogólne
- III. Bezpośredni mechanizm uwalniania kwasu arachidonowego z błon neuronalnych przez fosfolipazę A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)
- IV. Pośrednie drogi uwalniania kwasu arachidonowego
  - IV-1. Rola fosfolipazy C (PLC)
  - IV-2. Udział fosfolipazy D (PLD)
- V. Kwas arachidonowy w modulacji procesów neuronalnych
- VI. Znaczenie kwasu arachidonowego w patologii tkanki nerwowej

### Contents:

- I. Introduction
- II. General characteristics
- III. Mechanism of direct release of arachidonic acid from neuronal membranes by phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)
- IV. Indirect mechanisms of arachidonic acid release
  - IV-1. Role of phospholipase C (PLC)
  - IV-2. Participation of phospholipase D (PLD)
- V. Arachidonic acid in modulation of neural processes
- VI. Relevance of arachidonic acid in pathology of nervous tissue

**Wykaz stosowanych skrótów:** CaM — kalmodulina; CaM-kinaza II — wielofunkcyjna kinaza białkowa zależna od Ca<sup>2+</sup> i kalmoduliny; cAMP — cykliczny adenozyńmonofosforan; DAG — diacyloglicerol; GTP — guanozynotrifosforan; HETE — kwas 10-hydrokso-11,12 epoksyeko-zatrienowy; HPETE — kwas hydroperokso-5, 8, 14, -cis-10-trans-eikozatetraenowy; IP<sub>3</sub> — inozytolotrifosforan; IP<sub>4</sub> — inozytolotetrafosforan; AA — kwas arachidonowy; LTD — długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *long term depression*); LTP — długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long term potentiation*); NMDA — kwas N-metylo-D-asparaginowy; PA — kwas fosfatydowy; PI — fosfatydyloinozytol; PKC — kinaza białkowa zależna od Ca<sup>2+</sup> i fosfolipidów; PLA<sub>2</sub> — fosfolipaza A<sub>2</sub>; PLC — fosfolipaza C; PLD — fosfolipaza D; ROS — wolne rodniki tlenowe (ang. *reactive oxygen species*).

### I. Wstęp

Rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie ssaków znana jest od 1929 r., dzięki pionierskim pracom G. i M. Burr [cyt. za 1]. U młodych szczurów karmionych dietą beztłuszczową zaobser-

wowano wówczas opóźnienie wzrostu, łuszczące zapalenie skóry, utratę wody w naskórku i niewydolność reprodukcyjną. Jak się następnie okazało, żywienie ze śladową zawartością kwasów wielonienasyconych, a zwłaszcza α-linolenowego i kwasu arachidonowego, wywoływało nie tylko zaburzenia funkcji reprodukcyjnej czy wzrostu, ale stwarzało problemy neurologiczne. Oprócz niekorzystnych zmian w procesie uczenia, występowało także obniżenie ostrości widzenia u młodych, rozwijających się osobników gryzoni, małp i ludzi. Błony komórek nerwowych są bogato wyposażone w kwasy polienowe, stanowiące 40-60% glicerofosfolipidów. Obecnie przypisuje się im decydujące znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu błon pobudliwych ośrodkowego układu nerwowego [1].

W ostatnich latach pojawiło się wiele publikacji dotyczących udziału kwasu arachidonowego oraz jego metabolitów, w procesach zachodzących w tkance nerwowej. Ich rola związana jest zarówno z fizjologicznymi, jak i patologicznymi zjawiskami. Intencją autorów było usystematyzowanie i przybliżenie aktualnie dostępnej wiedzy na temat roli kwasu arachidonowego oraz jego metabolitów — eikozanoidów, w ośrodkowym układzie nerwowym.

<sup>1</sup> Dr, <sup>2</sup> prof. dr hab., II Zakład Biochemii, Instytutu Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

## II. Właściwości ogólne

Kwas arachidonowy, AA, integralny składnik lipidów błon neuronalnych, jest biologicznie aktywnym czynnikiem regulującym m.in. funkcje kinaz białkowych, kanałów jonowych, uwalnianie neurotransmiterów oraz transmisję synaptyczną. Wątroba jest głównym organem wytwarzającym kwas arachidonowy w organizmie, skąd poprzez układ krążenia AA dostarczany jest do neuronów. Neurony nie posiadają zdolności syntezy AA *de novo*, ale wychwytyują go z krwi i po estryfikacji wbudowują w fosfolipidy. O szybkości wychwytu AA świadczą wyniki wykazujące, że w korze mózgowej szczura około 85% kwasu arachidonowego podanego dożylnie, uległo w ciągu 1 min. wbudowaniu w fosfolipidy [2]. W ludzkich astrocytach zaobserwowano, że kwas arachidonowy (20:4) może powstawać *in vivo* w wyniku konwersji kwasu linolenowego (18:2) [3-5]. W warunkach fizjologicznych stężenie wolnego AA zarówno w błonach, jak i w cytosoiu jest wyjątkowo niskie (submikromolarne), ponieważ AA ma trzy możliwości dalszych przemian:

- wbudowanie w fosfolipidy przeprowadzane przez acylotransferazy,
- dyfuzję na zewnątrz komórki,
- przekształcanie w eikozanoidy w tzw. kaskadzie przemian arachidonianu, przy udziale enzymów cyklooksygenazy (E.C. 1.14.99.1), lipoksygenazy (E.C. 1.13.11.12) i epoksygenazy współdziałającej z cytochromem  $P_{450}$ .

Proces wbudowania AA w fosfolipidy — poprzez deacylację i reacylację — przeprowadzają dwa enzymy. Są to: zależna od jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  syntaza arachidonoyloCoA oraz acylotransferaza arachidonoyloCoA: lizofosfolipid [6]. Czynnikiem ograniczającym ten proces jest dostępność lizofosfolipidów. W ekstraktach mózgu oba te enzymy znaleziono we frakcji

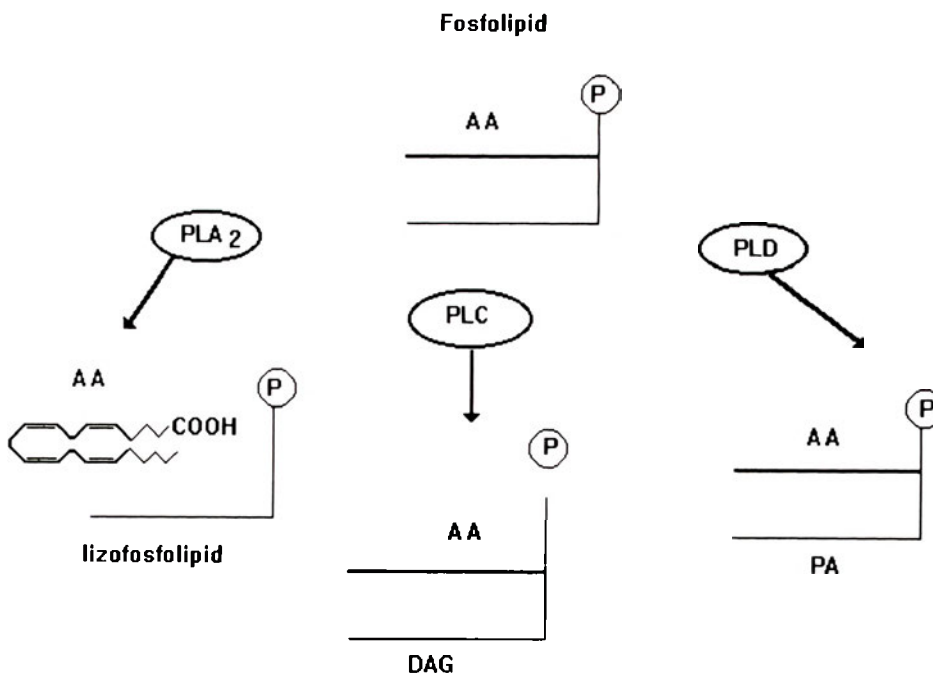
błonowej (ang. *particulate fraction*) [7].

Arachidonian może także być przeniesiony z jednej klasy fosfolipidów do innej poprzez transfer grupy acylowej. Działają wówczas transacylazy zależne lub niezależne od koenzymu A [8].

## III. Bezpośredni mechanizm uwalniania kwasu arachidonowego z błon neuronalnych przez fosfolipazę $A_2$ (PLA<sub>2</sub>)

Wzrost stężenia AA wewnątrz komórek następuje głównie na skutek jego uwalniania z błonowych lipidów. Impulsem do uwolnienia kwasu arachidonowego jest stymulacja wielu receptorów obecnych w błonie komórki. Induktorami mogą być neurotransmitery, hormony, przeciwciała, czynniki wzrostu, białka, peptydy lub toksyny. Uwalnianie kwasu arachidonowego z błon może zachodzić bezpośrednio poprzez działanie fosfolipazy  $A_2$ , oraz pośrednio — przy udziale fosfolipaz C i D (Ryc. 1).

Jedyną znaną bezpośrednią drogą uwalniania kwasu arachidonowego jest hydroliza fosfolipidów przeprowadzana przez fosfolipazę  $A_2$  (E.C.3.1.1.4). PLA<sub>2</sub> stanowi w istocie rodzinę wielu enzymów, których aktywność jest zależna lub niezależna od jonów  $Ca^{2+}$  [6, 9]. Izoenzymy PLA<sub>2</sub> zależne od wapnia sklasyfikowano w IV grupy. Obecność jonów  $Ca^{2+}$  konieczna jest do ich aktywności katalitycznej lub do asocjacji enzymu z błonami. Wzrost stężenia  $Ca^{2+}$  powoduje wiązanie się z błoną 140 aminokwasowego fragmentu N-końca PLA<sub>2</sub>, a w konsekwencji wzrost aktywności enzymu. Grupy I, II oraz III do których należą izoenzymy o ciężarze cząsteczkowym ~ 14 kDa, określane jako sPLA<sub>2</sub> są stosunkowo nieźle poznane [6]. Do grupy IV zalicza się cytozoolową PLA<sub>2</sub>, (cPLA<sub>2</sub>) o masie cząsteczkowej 85 kDa, która wykazuje wyraźny brak homologii sekwencyjnej z fosfolipazami grup



Ryc. 1 Udział fosfolipaz w uwalnianiu kwasu arachidonowego. Bezpośrednie uwalnianie kwasu arachidonowego następuje wskutek stereospecyficznej hydrolizy fosfolipidu w pozycji *sn-2*, przeprowadzanej przez PLA<sub>2</sub>. Fosfolipazy C i D bezpośrednio generują pochodne lipidowe, diacyloglicerol (DAG) i kwas fosfatydowy (PA), potencjalne źródła AA. (Zmodyfikowane wg [7])

I-III [10]. Enzym ten specyficznie hydrolizuje kwas arachidonowy z pozycji *sn*-2 fosfolipidów, przy czym ilość enzymu znacznie wzrasta w warunkach stymulacji komórek cytokinami [11].

Ostatnio notuje się wyraźny postęp w badaniach nad regulacją cytosolowej PLA<sub>2</sub>. Zaobserwowano, że zewnątrzkomórkowe czynniki zwiększające wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca<sup>2+</sup> stymulują uwalnianie AA. Wraz ze zmianą stężenia Ca<sup>2+</sup> z < 100 nM do ~ 300 nM, następuje 10-krotny wzrost aktywności cPLA<sub>2</sub> [12]. Obecność jonów wapnia powoduje także translokację cPLA<sub>2</sub> do błon komórkowych, oraz jak ostatnio wykazano, do błon siateczki śródplazmatycznej [13]. Zdolność translokacji związana jest prawdopodobnie z obecnością w cząsteczce cPLA<sub>2</sub> specyficznej domeny wiążącej jony wapniowe. Zależność aktywności PLA<sub>2</sub> od Ca<sup>2+</sup> wydaje się być dwufazowa. Początkowy wzrost aktywności enzymu zachodzący przy submikromolarnym stężeniu jonów wapnia pozostaje niezmienny aż do 100 μM Ca<sup>2+</sup>, a następnie wzrasta o rząd wielkości w zakresie stężeń Ca<sup>2+</sup> od 0,1 do 10 mM [12]. Sugeruje się, że wysokie stężenie Ca<sup>2+</sup> może zmieniać orientację przestrzenną substratu, ułatwiając dostęp enzymu do pozycji *sn*-2 fosfolipidu.

Aktywność PLA<sub>2</sub> w błonach synaptosomalnych regulują procesy fosforylacji i defosforylacji. cPLA<sub>2</sub> zawiera liczne miejsca podatne na fosforylację, wśród których Ser-505 (fosforylowana przez kinazę MAP) wydaje się odgrywać szczególną rolę w aktywacji enzymu [14]. Funkcjonalne znaczenie fosforylacji Ser-505 podkreśla fakt, że mutant cPLA<sub>2</sub> nie ulegający fosforylacji, w podobnych warunkach nie uwalnia arachidonianu w komórkach stymulowanych agonistami takimi, jak cytokiny IL-1, IL-6 czy TNF (*tumor necrosis factor*) [15]. Odmienny, hamujący wpływ na aktywność PLA<sub>2</sub> wywiera natomiast proces fosforylacji przeprowadzany przez kinazę białkową zależną od kompleksu Ca<sup>2+</sup>/CaM (CaM-kinaza II) [9, 16, 17].

Wykazano, że aktywność PLA<sub>2</sub> regulowana jest również przez specyficzne białka inhibitorowe i aktywatorowe. Do białek hamujących aktywność PLA<sub>2</sub> zalicza się lipokortyny. Należą one do rodziny aneksyn — białek wiążących Ca<sup>2+</sup> i lipidy. Budowa i rola aneksyn w układzie nerwowym omówiona była uprzednio w *Postęпах Biochemii* [18]. W tkankach mózgowia stężenie tych białek jest raczej niskie. W czasie stymulacji komórki nerwowej aneksyny ulegają fosforylacji przy udziale kinazy białkowej C, co prowadzi do utraty ich własności inhibitorowej. Mechanizm regulacji PLA<sub>2</sub> przez białka tej grupy nie jest na razie w pełni jasny, choć sugeruje się, że wiązanie aneksyn z fosfolipidami blokuje dostęp PLA<sub>2</sub> do substratu [19].

Wyizolowano oraz częściowo oczyszczono białko aktywujące PLA<sub>2</sub>, występujące w korze mózgowej szczura [19]. Białko to po ufosforylowaniu przez kinazę C jest stymulatorem aktywności PLA<sub>2</sub> w neuronach. Przypisuje mu się ważną rolę w rozszerzaniu się

stanów zapalnych.

Należy podkreślić, że wzrost aktywności PLA<sub>2</sub> powoduje również nasilenie procesów peroksydacji błonowych fosfolipidów. Obecność witaminy E, znanego antyoksydanta wiążącego się z fosfolipidami błon, blokując dostęp PLA<sub>2</sub> do substratu uniemożliwia powstanie kompleksu enzym-substrat [20]. Aktywność PLA<sub>2</sub> regulowana jest także przez wolne kwasy tłuszczowe oraz białka G [21]. Odłączenie podjednostki α od kompleksu z βγ białka G powoduje aktywację PLA<sub>2</sub>, podczas gdy rekombinacja wolnej podjednostki α z βγ do heterotrimeru inaktywuje ten enzym. Tak więc wykazano wiele rodzajów stymulacji aktywności fosfolipazy A<sub>2</sub> zapoczątkowanej wzrostem stężenia Ca<sup>2+</sup>, a następnie przedłużanej poprzez proces fosforylacji i udział białek G, co pozwala na precyzyjną regulację poziomu uwalnianego kwasu arachidonowego.

Mało dotąd wiadomo o strukturze i mechanizmie działania fosfolipaz PLA<sub>2</sub> niezależnych od obecności jonów wapnia. W mózgowiu wołu wykazano obecność dwóch cytosolowych izoform PLA<sub>2</sub>, których aktywność hamowana była w różnym stopniu przez gangliozyny, kwas sjałowy i sjałoglikoproteiny [22, 23]. Wolf i w s.p. stwierdzili natomiast, że w hipokampie szczura niezależna od jonów Ca<sup>2+</sup> PLA<sub>2</sub> stanowi główny typ enzymu w tym obszarze i aktywność jej jest 20-krotnie wyższa, niż Ca<sup>2+</sup> — zależnej PLA<sub>2</sub> [24]. Ponadto autorzy ci sugerują istotny udział tej właśnie formy fosfolipazy A<sub>2</sub> w procesie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w hipokampie szczura.

#### IV. Pośrednie drogi uwalniania kwasu arachidonowego

Dwie pośrednie drogi na których uwalniany jest kwas arachidonowy wymagają udziału fosfolipazy C i fosfolipazy D. Stymulacja komórki przez hormony, czynniki wzrostu czy neurotransmitery uruchamia kaskadę przemian fosfatydyloinozytoli i fosfolipidów takich, jak fosfatydylocholina, fosfatydyloetanoloamina czy fosfatydyloglicerol. W efekcie tworzy się odrębna pula związków, będących potencjalnym źródłem kwasu arachidonowego.

##### IV-1. Rola fosfolipazy C (PLC)

Jedna z pośrednich dróg uwalniania w komórce AA wymaga aktywności fosfolipazy C (E.C. 3.1.4.3). PLC występuje zarówno w cytozolu, jak i we frakcji związanej z błonami. W tkance nerwowej ponad 30 odmiennych farmakologicznie receptorów pośredniczy w procesie aktywacji PLC, indukując rozpad fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) do diacyloglicerolu (DAG) i inozytolotrifosforanu (IP<sub>3</sub>), funkcjonujących jako przekaźniki II rzędu [25]. Wyczerpujące informacje dotyczące przekazywania sygnałów w komórce, związanych z rozpadem fosfolipidów, może czytelnik

znaleźć w monografii prof. J. Barańskiej [26].

Podczas stymulacji komórki około 50% całkowitego PIP<sub>2</sub> obecnego w komórce może ulegać hydrolizie. PIP<sub>2</sub> stanowi niewielki procent lipidów błonowych (< 5%), natomiast głównym kwasem tłuszczowym występującym w pozycji *sn-2* fosfatydyloinozytoli jest kwas arachidonowy [27]. Z badań Tsutsumi i w s.p. [28] wynika, że w błonach synaptosomalnych mózgu szczura obecny jest także enzym lizoPI-PLC, specyficznie hydrolizujący lizofosfatydyloinozytyle.

Diacyloglicerol, potencjalne źródło AA, może także powstawać na drodze przemian innych lipidów, zwłaszcza fosfatydylocholiny [26, 29]. Jest ona przede wszystkim substratem PLA<sub>2</sub> i PLD, lecz w warunkach stymulacji np. wazopresyną, może także ulegać hydrolizie przy udziale PLC tworząc DAG. Mimo niskiej aktywności PLC wobec fosfatydylocholiny jest ona bogatym, a być może i najważniejszym źródłem AA, ponieważ fosfatydylocholina stanowi około 45% błonowych fosfolipidów [30].

W świetle badań molekularnych w grupie zależnych od jonów Ca<sup>2+</sup> fosfolipaz C wyróżnia się trzy klasy: PLC: β, γ i δ. Każda z nich zawiera dodatkowo kilka izoform [31, 32]. Ponadto wykazano też obecność dwóch rodzin: PLC: α i ε. Występujące w mózgu izoenzymy wrażliwe są na działanie hormonów, czynników wzrostu oraz neurotransmiterów [33]. Z mózgu ssaków wyizolowano i oczyszczono wiele izoform fosfolipazy C, a sekwencja jednej z nich, PLC-γ, została poznana. Interesującą obserwacją było wykazanie obecności regionów homologicznych z kinazą tyrozynową, choć ich funkcjonalne znaczenie jak dotąd jest nieznanne. Regulacja aktywności PLC związana jest z procesami odwracalnej fosforylacji. Naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) i czynnik wzrostu płytek (PDGF) stymulują fosforylację PLC z udziałem kinazy tyrozynowej, a także indukują przemieszczanie en-

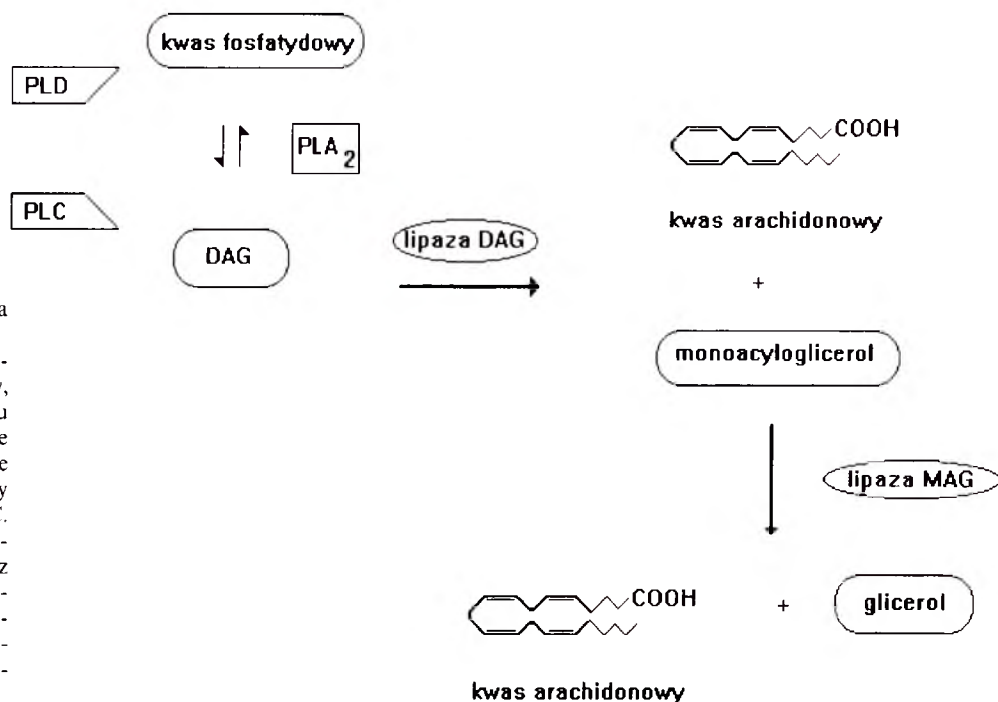
zymu z cytosolu do błon [21]. Modulacja aktywności fosfolipazy C w korze mózgowej przez stabilne analogi GTP sugeruje funkcjonalne powiązanie białek G i PLC [21].

Ważną rolę DAG w komórce jest jego bezpośredni, aktywujący wpływ na kinazę białkową C. Jednym z substratów PKC jest fosfolipaza D, hydrolizująca fosfatydylocholinę [32]. Na skutek dodatniego sprzężenia zwrotnego (DAG → aktywacja PKC → aktywacja PLD → hydroliza PC → wzrost stężenia DAG) uzyskiwany jest w komórce długotrwały fizjologiczny efekt, związany zarówno z obecnością DAG, jak i jego metabolitów. Kolejne przemiany DAG następują przy udziale lipaz: diacyloglicerolowej (E.C. 3.1.1.23) i monoacyloglicerolowej (E.C. 3.1.1.34), powodując wzrost stężenia wolnego kwasu arachidonowego w komórce. Ponieważ DAG może być także fosforylowany do kwasu fosfatydowego przez kinazę diacyloglicerolową, poziom AA w komórce zależy od wypadkowej aktywności kinazy i lipazy DAG.

#### IV-2. Udział fosfolipazy D (PLD)

Druga pośrednia droga uwalniania kwasu arachidonowego związana jest z aktywnością fosfolipazy D (E.C. 3.1.4.4). W procesie katalizowanym przez PLD z fosfatydylocholiny powstaje kwas fosfatydowy i cholina. Kwas fosfatydowy może być z kolei hydrolizowany przez specyficzną kwasną PLA<sub>2</sub>, generując DAG (Ryc. 2).

Aktywność PLD regulowana jest głównie na drodze dwóch różnych mechanizmów. Jeden z nich polega na aktywacji agonistów białka G. W homogenatach kory mózgowej stabilny analog GTP — guanozyno 5'(γ-tio) trifosforan, wywołał zależną od dawki stymulację aktywności PLD [21]. Drugi mechanizm związany jest z procesem fosforylacji fosfolipazy D przez kinazę



Ryc. 2 Pośrednie drogi uwalniania kwasu arachidonowego.

Bezpośredni produkt działania PLD, kwas fosfatydowy, może ulec przekształceniu w diacyloglicerol przy udziale kwasnej PLA<sub>2</sub>. DAG powstaje także w procesie hydrolizy przeprowadzanej przez PLC. Dalsze przemiany DAG, następujące przy udziale lipaz diacyloglicerolowej oraz monoacyloglicerolowej, prowadzą do uwolnienia kwasu arachidonowego. (Zmodyfikowane wg [7])

białkową C. W homogenatach z mózgowia, a także w kilku rodzajach hodowli komórek neuronalnych i glejowych, estry forbolu (związki zastępujące naturalny aktywator PKC — DAG), wpływały na aktywność PLD. Obydwa przedstawione mechanizmy mogą koegzystować w komórkach neuronalnych.

Ostatnie prace Liscovitcha i wsp. [34] wykazały, że w błonach mózgowia PIP<sub>2</sub> 10-krotnie zwiększał *in vitro* maksymalną aktywność PLD. Ta nowa funkcja PIP<sub>2</sub> wskazuje zatem na możliwość bardziej kompleksowego sposobu regulacji aktywności PLD.

Wzrost stężenia kwasu arachidonowego zachodzący przy udziale PLC i PLD, wymaga jednocześnie współdziałania szeregu enzymów. Wielotorowość i wieloetapowość procesu uwalniania AA może stanowić częściowe wyjaśnienie wczesnych oraz późnych efektów, wywoływanych przez ten związek w tkance nerwowej.

## V. Kwas arachidonowy w modulacji procesów neuronalnych

W ostatnich latach kwas arachidonowy zaliczony został do grupy tzw. lipidowych wtórnych przekazników (ang. *Lipid Second Messengers*). Zaobserwowano bowiem, że dwa enzymy, fosfolipaza C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) i sfingomielinaza (SM) (E.C. 3.1.4.12), generujące inne lipidowe przekazniki II rzędu, aktywowane są przez wolne kwasy tłuszczowe, z których najskuteczniejszym jest kwas arachidonowy [35]. AA oraz farmakologiczny aktywator PLA<sub>2</sub>-mellityna, stymuluje hydrolizę sfingomieliny w komórkach HL-60 i wywołuje taki sam biologiczny efekt, jak TNF $\alpha$  i ceramid, powodując wzmoczoną proliferację komórek. Ponadto AA stymuluje aktywność neutralnej SMazy *in vitro* [36]. Ostatnie badania wskazują, że kwas arachidonowy, lizofosfatydylocholina, kwas fosfatydowy oraz inne wolne kwasy tłuszczowe, w obecności submikromolarnego stężenia Ca<sup>2+</sup> mogą aktywować izoenzymy PKC [14, 37, 38]. W kilku laboratoriach wykazano, że w obecności AA i DAG następuje wbudowanie w błony kinazy białkowej C, tworząc jej „konstytutywną”, aktywną formę [39]. PKC, jeden z bardziej znaczących efektatorów kwasu arachidonowego, odgrywa centralną rolę w neurotransmisji i przede wszystkim w procesie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP).

Zjawisko LTP (*long term potentiation*) łączone z procesami uczenia i pamięci, jest przedmiotem intensywnych badań zwłaszcza, że istnieją wyraźne przesłanki dotyczące pre- i postsynaptycznych wydarzeń warunkujących jego wystąpienie [39]. W procesie indukcji LTP następuje aktywacja receptorów glutaminianowych, zaś glutaminian powoduje depolaryzację błon postsynaptycznych. Wapń wnika do komórek kanałami jonowymi zależnymi od NMDA i rozpoczyna kaskadę wydarzeń wywołujących wyraźny wzrost transmisji synaptycznej. Bieżące hipotezy zakładają, że w czasie indukcji LTP kwas arachidonowy uwolniony

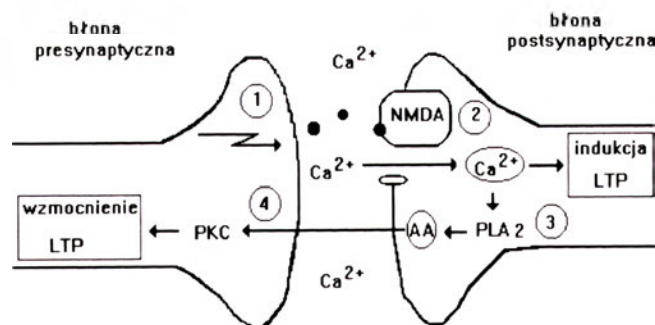
z błon postsynaptycznych przez zależną od jonów Ca<sup>2+</sup> PLA<sub>2</sub> dostaje się na drodze dyfuzji do zakończeń presynaptycznych i działając jako „wsteczny” przekaznik ułatwia uwolnienie glutaminianu [40, 41]. Za tą koncepcją przemawiają następujące obserwacje:

- inhibitory PLA<sub>2</sub> blokują indukcję długotrwałego wzmocnienia synaptycznego,
- AA gromadzi się w błonach postsynaptycznych w następstwie indukcji LTP,
- egzogenne dodany AA ułatwia indukcję LTP i wzmacnia uwalnianie glutaminianu.

Ostatnio wykazano, że również metabolity AA — głównie 12-HETE i 12-HPETE, są zaangażowane w indukcji i ekspresji LTP [42]. Zaobserwowano bowiem, że MK-801, inhibitor receptorów NMDA oraz inhibitory lipoksygenazy blokowały indukcję LTP. Tak więc, oprócz ewidentnej roli AA w aktywacji PKC, dochodzi jego funkcja jako wstecznego sygnału. Uproszczony schemat podwójnej roli KA przedstawia rycina 3.

Mimo wielu przesłanek do tej interpretacji należy jednak podchodzić ze specjalną ostrożnością. Innym potencjalnym, choć kontrowersyjnym, kandydatem biorącym udział w LTP jest cząsteczka tlenu azotu, powstająca z L-argininy przy udziale zależnej od kalmoduliny syntazy tlenu azotu [43]. Zaobserwowano, że analogi nitrowe argininy w warunkach inkubacji skrawków hipokampa z hemoglobina (która wiąże tlenek azotu, ale nie przechodzi do komórek) blokują indukcję LTP. Nie można także wykluczyć, że kwas arachidonowy i tlenek azotu mogą działać synergistycznie jako „wsteczne” przekazniki informacji w procesie LTP.

W ostatnim czasie pojawił się nowy aspekt dotyczący udziału AA w indukcji długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD). Stwierdzono bowiem, że w hi-



Ryc. 3 Kwas arachidonowy jako wsteczny przekaznik w procesie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP).

W wyniku depolaryzacji błony presynaptycznej (1) następuje uwolnienie neurotransmitterów (głównie glutaminianu) działających na postsynaptyczne receptory NMDA (2). Wzrost stężenia jonów Ca<sup>2+</sup>, wchodzących poprzez kanały wapniowe zależne od NMDA, indukuje długotrwałe wzmocnienie synaptyczne. Jony wapniowe aktywują także PLA<sub>2</sub>, która uwalnia kwas arachidonowy z błonowych fosfolipidów (3). AA dyfunduje jako „wsteczny” przekaznik do zakończeń presynaptycznych i stymuluje kinazę białkową C (4). Fosforylacja przez PKC specyficznych białek powoduje m.in. dalsze uwalnianie glutaminianu i wzmocnienie LTP. (Zmodyfikowane wg [40, 41])

pokampie nowo narodzonych szczurów kwas arachidonowy stymulował wystąpienie LTD [44]. Bezpośredni udział AA w tym procesie potwierdza fakt, że długotrwałe osłabienie synaptyczne występowało w obecności inhibitorów cyklooksygenazy i lipoksygenazy, natomiast blokowane było przez inhibitor fosfolipazy A<sub>2</sub>.

W świetle przedstawionych danych kwas arachidonowy spełnia zasadnicze kryterium kwalifikujące ten związek do grupy wtórnych przekaźników, a mianowicie jego uwalnianie następuje w odpowiedzi na stymulację receptorów błonowych, efekторы AA często znajdują się w bezpośrednim otoczeniu, zaś stężenie kwasu arachidonowego wewnątrz komórki podlega ścisłej regulacji przez kilka niezależnych szlaków metabolicznych. Co więcej, liczne metabolity AA zwane eikozanoidami, biorą udział w modulacji szeregu procesów w tkance nerwowej. Omówieniu tej grupy związków poświęcono następny artykuł.

## VI. Znaczenie kwasu arachidonowego w patologii tkanki nerwowej

Wysokie stężenie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, kwas arachidonowy i NO są potencjalnymi mediatorami uszkodzenia komórki nerwowej. W stanie spoczynkowym w komórce są obecne tylko śladowe ilości wolnego kwasu arachidonowego. Nawet przy wzroście stężenia AA bezpośredni udział w wywoływaniu stanów patologicznych wydaje się być mniejszy, niż produktów jego metabolizmu. Zaobserwowano natomiast pośredni wpływ AA na stymulację uwalniania glutaminianu, którego toksyczne działanie w niektórych patologicznych stanach takich, jak udar, padaczka, choroba Alzheimera czy hipoglikemia, zostało udokumentowane [45, 46]. Zwiększony poziom AA powoduje wytwarzanie wolnych rodników tlenowych (ang. *reactive oxygen species*, ROS), uszkadzających komórki neuronalne [47, 48]. Nadmierne uwalnianie kwasu arachidonowego oraz kaskada dalszych przemian AA zachodząca podczas patologicznych stanów komórki nerwowej takich, jak niedokrwienie mózgu (ischemia), napady padaczkowe czy udar mózgu, zwiększa ilość ROS w komórce [48]. Estryfikacja AA także znacznie wzmacnia produkcję ROS [46]. Wiadomo, że etanol powoduje estryfikację błonowych lipidów, dlatego jeden z mechanizmów neurotoksycznego działania etanolu na komórki nerwowe związany jest ze wzmoczoną produkcją wolnych rodników tlenowych.

Dane literaturowe sugerują, że AA uczestniczy także, choć nie bezpośrednio, w procesie kancerogenezy [49]. Wykazano bowiem, że metabolity AA m.in. prostaglandyny i leukotrieny, biorą udział w procesach wzrostu nowotworów. Zwiększone stężenie AA w komórce związane jest — jak już wspomniano — z aktywacją PLA<sub>2</sub>. Zmniejszenie uwalniania AA, a tym samym jego potencjalnych metabolitów poprzez stosowanie specyficznych inhibitorów PLA<sub>2</sub>, wydaje się

dość obiecującym krokiem w terapii nowotworów.

Artykuł otrzymano 16 lipca 1996 r.  
Zaakceptowano do druku 18 września 1996 r.

## Piśmiennictwo

1. Innis SM (1991) *Prog Lipid Res* **30**: 30-39
2. Washizaki K, Smith QR, Rapoport SI, Purdon AD (1994) *J Neurochem Res* **63**: 727-736
3. Salem N Jr, Wegher B, Mena P, Uauy R (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 49-54
4. Moore SA, Yoder E, Spector AA (1990) *J Neurochem* **55**: 391-402
5. Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA (1991) *J Neurochem* **56**: 518-524
6. Ackermann EJ, Dennis EA (1995) *Biochem Biophys Acta* **1259**: 125-136
7. Piomelli D (1995) *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* W: Floyd E. Bloom and David J Kupfer (red.) Raven Press, Ltd., New York, s. 595-607
8. Snyder F, Lee TC, Blank MK (1991) *Prog Lipid Res* **31**: 65-86
9. Clark MA, Ozgur LE, Conway TM, Dispoto J, Crooke ST, Bomalaski JS (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5418-5422
10. Dennis EA (1994) *J Biol Chem* **269**: 13057-13060
11. Burdge GC, Creaney A, Postle AD, Wilton DC (1995) *Int J Biochem Cell Biol* **27**: 1027-32
12. Clark JD, Schivella AR, Nalefski EA, Lin LL (1995) *J Lipid Med Cell Sign* **12**: 83-117
13. Schivella AR, Regier MK, Smith WL, Lin LL (1995) *J Biol Chem* **270**: 30749-30754
14. Liscovitch M, Cantley LC (1994) *Cell* **77**: 329-334
15. Mukherjee AB, Miele L, Pattabiraman N (1994) *Biochem Pharmacol* **48**: 1-10
16. Clark JD, Lin LL, Kriz RW (1991) *Cell* **65**: 1043-1051
17. Hirashima Y, Farooqui A, Mills JS, Horrocks LA (1992) *J Neurochem* **59**: 708-714
18. Filipek A (1993) *Post Biochem* **39**: 126-133
19. Flower RJ (1988) *Br J Pharmacol* **94**: 987-1015
20. van Kuijk FJGM, Sevastian A, Handelman GJ, Dratz EA (1987) *Trends Biochem Sci* **12**: 31-34
21. Farooqui AA, Hirashima Y, Horrocks LA (1992) W: NG Bazan, G Toffano and M Murphy (red) *Neurobiology of Essential Fatty Acids*, New York, Plenum Press, str 297-325
22. Yang HC, Farooqui AA, Horrocks LA (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1158-1166
23. Yang HC, Farooqui AA, Harrocks LA (1994) *Biochem J* **299**: 91-95
24. Wolf MJ, Izumi Y, Zorumski CF, Gross RW (1995) *FEBS Lett* **377**: 358-362
25. Fisher SK (1995) W: Cuelio A C and Collier B (red) *Pharmacological Science: Perspectives for Research and Therapy in the Late 1990s*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, str. 73-79
26. Barańska J (1992) *Rozpad Fosfolipidów a Przekazywanie Informacji w Komórce*, PTBioch. Warszawa
27. Fisher SK (1995) *Eur J Pharmacol* **288**: 231-250
28. Tsutsumi T, Kobayashi T, Ueda H, Yamauchi E, Watanabe S, Okuyama H (1994) *Neurochem Res* **19**: 399-406
29. Exton JH (1990) *J Biol Chem* **265**: 1-4
30. Momchilova-Pankova AB, Markovska TT, Yanev EI, Koumanov KS (1994) *J Lipid Med Cell Sign* **9**: 235-246
31. Rhee SG, Choi KD (1992) *J Biol Chem* **267**: 12393-12396
32. Lee SB, Rhee SG (1995) *Curr Op Cell Biol* **7**: 183-189
33. Takenawa T, Homma Y, Emori Y (1991) *Methods Enzymol* **197**: 511-518
34. Liscovitch M, Chalifa V, Pertile P, Chen CS, Cantley LC (1994) *J Biol Chem* **269**: 21403-21406
35. Mukherjee AB, Miele L, Pattabiraman N (1994) *Biochem Pharmacol* **48**: 1-10



36. Jayadev S, Linardic CM, Hannun YA (1994) *J Biol Chem* **269**: 5757-5763
37. Sasaki Y, Asaoka Y, Nishizuka Y (1993) *FEBS Lett* **320**: 47-51
38. Shinomura T, Asaoka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5149-5153
39. Bramham CR, Alkon DL, Lester DS (1994) *Neurosci* **60**: 737-743
40. Bliss TVP, Berrington ML, Lynch MA, Williams JH (1990) *Synapsia on Quantitative Biology, The Brain*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, LV, str 119-129
41. Pelerin L, Wolfe LS (1991) *Neurochem Res* **16**: 983-989
42. Williams JH, Errington ML, Lynch MA, Bliss TVP (1989) *Nature (Lond)* **341**: 739-742
43. Cummings JA, Nicola SM, Malenka RC (1994) *Neurosci Lett* **176**: 110-114
44. Bolshakov VY, Siegelbaum SA (1995) *Neuropharmacol* **34**: 1581-1587
45. Zhang L, Ruehr ML, Dorman RV (1996) *J Neurochem* **66**: 177-185
46. Thomas RJ (1995) *J Am Geriatr Soc* **43**: 1279-1289
47. Bondy SC, Marwah S (1995) *FEBS Lett* **375**: 53-55
48. Katsuki H, Okuda S (1995) *Prog Neurobiol* **46**: 607-636
49. Ara G, Teicher BA (1996) *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **54**: 3-16

## Eikozanoidy — mózgowe przekaźniki sygnałów

## Eicosanoides — Brain's signal transducers

LILLA LACHOWICZ<sup>1</sup>,  
LUDMIŁA ŻYLIŃSKA<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Drogi powstawania eikozanoidów w tkance nerwowej
  - II-1. Działanie cyklooksygenazy
  - II-2. Działanie lipoksygenazy
  - II-2. Działanie epoksygenazy
- III. Eikozanoidy w zaburzeniach funkcji ośrodkowego układu nerwowego

### Contents:

- I. Introduction
- II. Pathways of eicosanoides generation in brain tissue
  - II-1. Action of cyclooxygenase
  - II-2. Action of lipoxigenase
  - II-3. Action of epoxygenase
- III. Eicosanoides in the central nervous system functional disorders

**Wykaz stosowanych skrótów:** CaM — kalmodulina; CaM-kinaza II — wielofunkcyjna kinaza białkowa zależna od Ca<sup>2+</sup> i CaM; cAMP — cykliczny adenylozomonofosforan; COX — cyklooksygenaza, także określana jako syntaza prostaglandyny G/H lub PGHS; DAG — diacylglicerol; DHA — kwas dekozaheksaenowy; EEP — kwas epoksyeikozatetraenowy; GTP — guanozotrifosforan; EPA — kwas eikozapentaenowy; hepoksylina B<sub>3</sub> — kwas 10-hydroksy- 11, 12 epoksyeikozatrienowy; hepoksylina A<sub>3</sub> — kwas 8-hydroksy- 11, 12-epoksyeikozatrienowy; HETE — kwas 10-hydroksy- 11,12 epoksyeikozatrienowy; HPETE — kwas hydroperoksy- 5, 8, 14-cis-10-trans-eikozatetraenowy; IP<sub>3</sub> — inozytolotrifosforan; IP<sub>4</sub> — inozytolotetrafosforan; AA — kwas arachidonowy; LHRH — hormon uwalniający lutotropinę; LT — leukotrieny: LTB, LTC, LTD wraz indeksami oznaczają poszczególne typy leukotrienów; PG — prostaglandyny: PGG, PGH, PGI, PGE, PGF i PGD wraz z indeksami oznaczają poszczególne typy prostaglandyn; PKC — kinaza białkowa zależna od Ca<sup>2+</sup> i fosfolipidów; PLA<sub>2</sub> — fosfolipaza A<sub>2</sub>; TX — tromboksany: TXA<sub>2</sub> — tromboksan A<sub>2</sub>; TXB<sub>2</sub> — tromboksan B<sub>2</sub>.

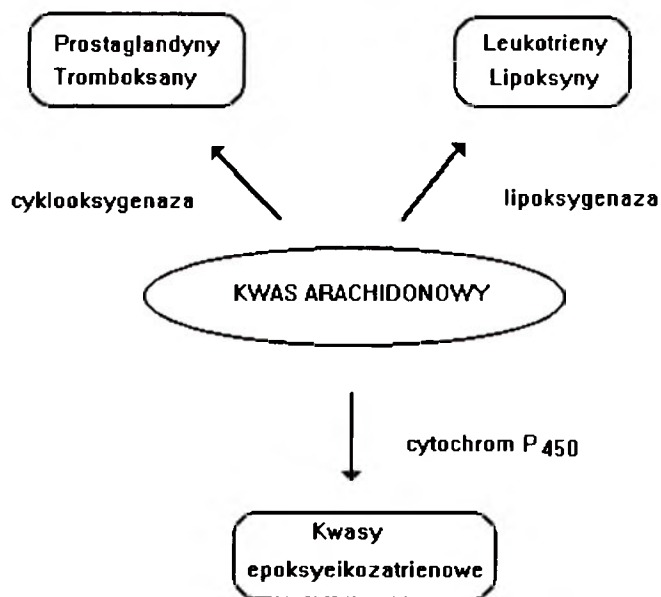
### I. Wstęp

Nazwa eikozanoidy została wprowadzona w 1980 r. przez Corey a [1], dla określenia grupy utlenionych enzymatycznie produktów 20-węglowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Głównym prekursorem tych związków jest kwas arachidonowy, a drogi prowadzące do wytwarzania eikozanoidów znane są jako kaskada arachidonianu.

U ssaków występują trzy główne drogi kaskady arachidonianu, inicjujące stereospecyficzne utlenianie arachidonianu uwalnianego z fosfolipidów błon (Ryc. 1):

1. szlak *cyklooksygenazy* lub syntazy prostaglandyny (G/H) (E.C. 1.14.99.1), w efekcie działania którego powstają prostaglandyny (PG) i tromboksany (TX),
2. szlak *lipoksygenazy* (E.C. 1.13.11.12), który prowadzi do powstania leukotrienów (LT), lipoksyn (LX) oraz innych specyficznych hydroperoksy- i hydroksyeikozanowych kwasów (HPETE, HETE),
3. szlak *epoksygenazy*, która przy udziale monooksygenazy cytochromu P<sub>450</sub> przekształca kwas arachidonowy w kwasy epoksyeikozatetraenowe (EEP).

<sup>1</sup> Prof. dr hab., <sup>2</sup> dr, II Zakład Biochemii, Instytutu Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź



**Ryc. 1** Drogi utleniania kwasu arachidonowego. Kwas arachidonowy jest enzymatycznie przekształcany z udziałem cyklooksygenazy w prostaglandyny i tromboksany. Działanie lipoksygenazy tworzy leukotrieny, lipoksyny i hydroperoksykwasy. Pochodne epoksy- powstają z udziałem cytochromu P<sub>450</sub>. (Zmodyfikowane wg [3, 5])

Kwasy tłuszczowe, występujące w oleju niektórych ryb, takie jak eikozapentaenowy (EPA) i dekozaheksaenowy (DHA), okazały się niezbędnymi składnikami pożywienia, ze względu na zdolność wytwarzania eikozanoidów w ludzkich tkankach. Substancje te mogą stymulować patofizjologiczne procesy m.in. w zawałe mięśnia sercowego i reumatologicznym zapaleniu stawów. Eikozanoidy są wytwarzane właściwie przez wszystkie tkanki organizmu. Występują zarówno w świecie zwierząt jak i u roślin. W ciągu ostatnich 10 lat wykazano wyraźny udział eikozanoidów w funkcjonowaniu tkanki nerwowej, m. in. w przekazie sygnałów synaptycznych, aktywności kanałów jonowych i pomp jonowych, oraz modulacji systemu odpowiedzialnego za uwalnianie neurotransmiterów [2].

Eikozanoidy tym różnią się od „klasycznych” wtórnych przekazywaczy, że mają zdolność przechodzenia przez błony komórkowe i dyfundując w przestrzeni pozakomórkowej wchodzi w interakcję z sąsiednimi neuronami. Uwalnianie i transformacja metaboliczna kwasu arachidonowego jest procesem lokalnym, a efekty działania eikozanoidów pojawiają się w bezpośrednim sąsiedztwie ich powstawania. W ten sposób mogą więc stanowić nie tylko sygnał transmembranowy, ale i transkomórkowy. Eikozanoidy nie są magazynowane w neuronie, a ich wytwarzanie zachodzi niejako „na życzenie”. Dodatkową cechą tych związków jest zdolność wiązania się z błonowymi układami receptor — białka G, obecnymi w sąsiednich neuronach i w komórkach gleju. Ta podwójna rola metabolitów arachidonianu może odgrywać istotną rolę w tworzeniu zintegrowanej odpowiedzi w tkance nerwowej. Aktywne składniki eikozanoidów nie występują w znamiennych stężeniach w układzie krążenia. Mimo to raz

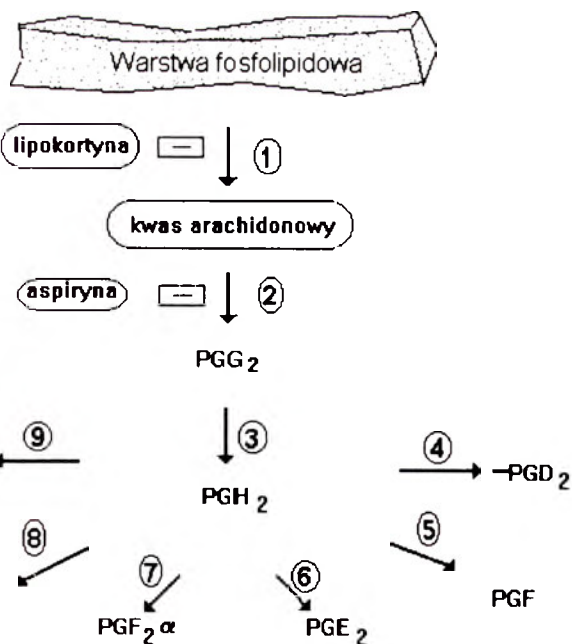
wytworzone, działają jako bioregulatory odpowiedzi na cAMP, IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub> oraz DAG. Zakończenie działania eikozanoidów w neuronie następuje poprzez ich dyfuzję poza komórkę, ponowne wbudowanie w fosfolipidy lub enzymatyczną degradację. Reakcje enzymatyczne przebiegające z udziałem dehydrogenaz, oksydaz, reduktaz i acetylaz w tkankach, takich jak wątroba, płuca czy nerki, przekształcają endogenne eikozanoidy na liczne, metabolicznie nieaktywne pośredniki, które następnie są usuwane z moczem. Wiele genów kodujących enzymy specyficzne dla eikozanoidów zostało już sklonowanych [2].

## II. Drogi powstawania eikozanoidów w tkance nerwowej

### II-1. Działanie cyklooksygenazy

Produkty pośrednie oraz końcowe powstające w wyniku działania cyklooksygenazy określane są także terminem prostanoidy. Dotychczas wykazano istnienie dwóch izoform cyklooksygenazy, określanych jako COX-1 (lub PGHS-1) oraz COX-2 (lub PGHS-2) [3, 4]. Obie izoformy cyklooksygenazy wykazują duży stopień homologii aminokwasowej (około 60%) i kodowane są przez geny znajdujące się na różnych chromosomach. W warunkach fizjologicznych największą aktywność wykazuje COX-1 i uważa się, że jest to tzw. konstytutywna forma enzymu. W stanach zapalnych następuje natomiast wzrost aktywności izoformy COX-2, nazywanej także formą indukowalną (ang. *inducible*). U szczura i człowieka obie izoformy występują w warunkach fizjologicznych. Stany zapalne zwiększają aktywność COX-1 dwa, trzy razy, a aktywność COX-2 wzrasta nawet 20-krotnie. Uważa się, że COX-2 odpowiedzialna jest za wytwarzanie tzw. „zapalnych” prostaglandyn, podczas gdy COX-1 produkuje fizjologicznie ważne prostanoidy.

Cyklooksygenazy katalizują przekształcenie kwasu arachidonowego do dwóch, szybko metabolizowanych prostaglandyn — PGG i PGH. Schemat dalszych przekształceń PGH obrazuje rycina 2. Biologiczna aktywność prostaglandyn zmienia się zależnie od organu i gatunku. Różnice występują także w poszczególnych etapach rozwoju oraz fazach funkcji organizmu. W tkance nerwowej najbardziej znaczące produkty cyklooksygenaz — PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> i PGD<sub>2</sub>, a także enzymy niezbędne do ich syntezy zostały oczyszczone i scharakteryzowane [5]. Ich obecność wykazano zarówno w neuronach, jak i w komórkach gleju [6]. Fundamentalne znaczenie miała obserwacja, że neurony i komórki gleju hodowane *in vitro*, zdolne były do syntezy prostaglandyn [7]. Z prac H a y a i s h i wynika, że PGD<sub>2</sub> w mózgowiu funkcjonuje jako czynnik indukujący sen [8]. Podany szczurom zależnie od dawki wywołuje sen, uspokojenie, katalepsję i hipotermię. Związki selenu (SeCl<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) inhibują



Ryc. 2 Rozkład arachidonianu przy udziale cyklooksigenazy. Pod wpływem  $PLA_2$  (1) uwalniany jest kwas arachidonowy, który przekształca się w  $PGG_2$  przy udziale cyklooksigenazy (2). Lipokortyna i aspiryna są inhibitorami odpowiednio  $PLA_2$  i cyklooksigenazy.  $PGH_2$ , powstały wskutek działania hydroperoksydazy (3) tworzy szereg pochodnych, w których powstawaniu biorą udział syntazy:  $PGH$ -D izomeraza (4),  $PGD_2$ -11-ketoreduktaza (5),  $PGH$ -E izomeraza (6),  $PGH$ -F izomeraza (7), syntaza  $PGI$  (8) oraz syntaza tromboksanu (9). (Zmodyfikowane wg [3, 5])

aktywność syntazy  $PGD_2$  a wprowadzone do 3-ciej komory mózgu szczura hamują sen i wyraźnie zwiększają aktywność zwierzęcia, przebiegającą z umiarkowanym wzrostem temperatury ciała oraz ze wzmożonym pobieraniem wody i pokarmu [8].

Duże znaczenie przywiązuje się współdziałaniu PG z autonomicznym układem nerwowym. Stymulacja nerwów współczulnych czy przywspółczulnych powoduje uwalnianie PG, zwłaszcza  $PGE_2$  i  $PGF_{2\alpha}$ . Różne neurotransmitery także stymulują ten proces [2]. Natomiast atropina, fenoksybenzamina czy dibenzylina wywierają efekt hamujący. Przyjmuje się obecnie, że endogenna  $PGE_2$  w OUN może regulować uwalnianie neurotransmiterów. I tak, ilość noradrenanliny i dopaminy w korze mózgowej szczura w warunkach *in vitro* wyraźnie zmniejsza się pod wpływem  $PGE_2$ . Prostaglandyna ta może także redukować przepływ jonów wapnia, co w efekcie wpływa hamująco na uwalnianie neurotransmiterów [2, 9].  $PGE_2$  uznawany jest za endogenny związek powodujący bezsenność i hipertermię, zwłaszcza po systematycznym stosowaniu interleukiny-1 [9]. Funkcje  $PGF_{2\alpha}$  w mózgowiu — w przeciwieństwie do innych tkanek — są nadal niezbyt pewnie określone. Ostatnio wykazano, że astrocyty zawierają receptory  $PGF_{2\alpha}$ , które sprzężone są z fosfolipazą C i z białkiem wiążącym GTP [1, 2, 9, 10]. W nienaruszonych tkankach mózgowia stwierdzono synergizm działania cyklazy adenylanowej (E.C. 4.6.1.1) z PG. Przykładem interakcji cAMP z PG jest obserwacja, że morfina i leki podobnie działające

hamują tworzenie cAMP, stymulowane przez PGE. Zakłada się, że niektóre farmakologiczne efekty opiatów, jak wpływ na poziom cAMP w mózgowiu, polegają na hamowaniu tworzenia endogennych prostaglandyn [9].

Interpretacja znaczenia podstawowych poziomów prostaglandyn jest dość kontrowersyjna. Podstawowe stężenie PG w preparatach kory mózgowej szczura i człowieka mierzone radioimmunologicznie jest na granicy wykrywalności [2]. Endogenna synteza PG może pojawiać się nawet w niskich temperaturach. Regiony mózgowia trudniejsze do wypreparowania takie, jak opuszka węchowa czy gruczoł szyszynki wykazują najwyższe zawartości tych związków, ale nasuwają się wątpliwości, czy stężenia te można uznać za wyraz aktualnych wartości podstawowych, czy raczej są wynikiem dodatkowej syntezy z endogennie uwolnionego *post mortem* kwasu arachidonowego [2]. Obecnie powszechnie akceptuje się pogląd, że po krótkiej nawet inkubacji skrawków tkanki mózgowej można wykazać syntezę niektórych prostaglandyn ( $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ), prostacykliny ( $PGI_2$ ), jak i tromboksanu ( $TXB_2$ ). W mózgu gryzoni  $PGD_2$  jest ilościowo najważniejszym produktem działania cyklooksigenaz. Mózgowie kota różni się pod tym względem;  $PGF_{2\alpha}$  i  $TXB_2$  są głównymi produktami przemiany AA, natomiast  $PGD_2$  tworzy się i bardzo gwałtownie metabolizuje. Co więcej, w mózgowiu ludzkim  $PGD_2$  może gwałtownie ulegać enzymatycznej przemianie do postaci 11-epi- $PGF_{2\alpha}$  (9- $\alpha$ , 11- $PGF_{2\alpha}$ ). Reakcja ta zachodzi w ludzkiej korze mózgowej i może być, przynajmniej w części, przyczyną niskich wartości  $PGD_2$  znalezionych w mózgowiu. Inne tkanki ludzkie mogą tworzyć  $PGD_2$  w bardzo znaczących ilościach [9]. W mózgowiu zatem obserwuje się regionalne różnice stężeń  $PGD_2$ ,  $PGE_2$  i  $PGF_{2\alpha}$ . U szczura indukcja elektroszokiem lub środkami wywołującymi drgawki np. bikukulina czy metrazolem, znamienne podnosi uwalnianie kwasu arachidonowego oraz syntezę  $PGE_2$  i  $PGF_{2\alpha}$ . Najwyższe stężenie obserwuje się w korze i hipokampie, a mniejsze w podwzgórze [9].

W ostatnich latach wykazano, że aktywność cyklooksigenaz w nienaruszonych komórkach modulowana była obecnością tlenu azotu [11]. Cyklooksigenaza jest enzymem zawierającym hem, który może bezpośrednio wiązać NO. I tak, obserwowany wzrost uwalniania prostaglandyn czy wzmożony efekt  $PGE_2$  na uwalnianie LHRH w obecności NO, sugerowałby jego stymulujący wpływ na cyklooksigenazę. Nie wyklucza się jednak innej hipotezy, a mianowicie ochronnej roli NO w procesie autoinaktywacji cyklooksigenazy. Obie hipotezy czekają jeszcze na potwierdzenie.

W oparciu o wrażliwość na pięć naturalnie występujących prostanoidów, a mianowicie  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2$  i  $TXA_2$  zaproponowano ostatnio nową klasyfikację receptorów prostanoidowych [12]. Poszczególne typy receptorów oraz mechanizm działania zostały przedstawione w tabeli 1.

**Tabela 1.**

Receptory prostanoidowe oraz mechanizm działania.

Typ receptora	Mechanizm działania	Efekt działania
DP	stymulacja cykazy adenylanowej poprzez Gs	wzrost cAMP
EP		
EP1	stymulacja przemiany fosfatydyloinozytoli poprzez Gq	wzrost Ca <sup>2+</sup>
EP2	stymulacja cykazy adenylanowej poprzez Gs	wzrost cAMP
EP3	hamowanie cykazy adenylanowej poprzez Gi/o	spadek cAMP
EP4	stymulacja cykazy adenylanowej poprzez Gs	wzrost cAMP
FP	stymulacja przemiany fosfatydyloinozytoli poprzez Gq	wzrost Ca <sup>2+</sup>
IP	stymulacja cykazy adenylanowej poprzez Gs	wzrost cAMP
TP	stymulacja przemiany fosfatydyloinozytoli poprzez Gq	wzrost Ca <sup>2+</sup>

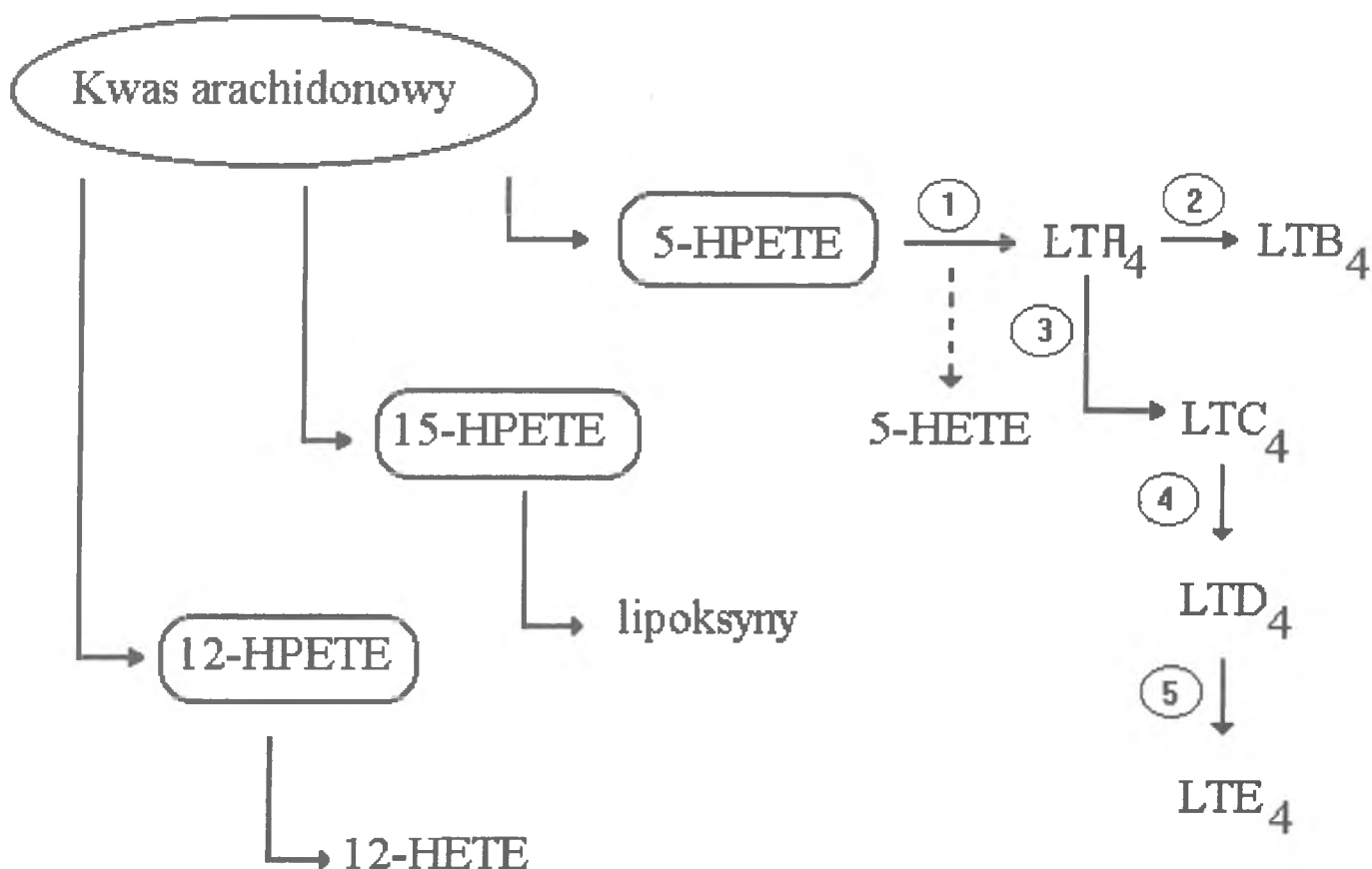
Litera P pochodzi od nazwy prostanoidy, natomiast pierwsza litera określa prostanoid wykazujący największe powinowactwo do receptora. Receptory EP zostały podzielone na 4 podtypy, w zależności od wrażliwości w stosunku do różnych agonistów i antagonistów. Mechanizm działania związany jest z modulacją aktywności cykazy adenylanowej lub stymulacją przemian fosfatydyloinozytoli, jednak zawsze zachodzi poprzez odpowiednie białka G. (Zmodyfikowane wg [12]).

## II-2. Działanie lipoksygenazy

Lipoksygenazy katalizują utlenianie kwasu arachidonowego tworząc kwasy hydroperoksyekoizatetraenowe (HPETE) (Ryc. 3). Dwa enzymy, 12- i 5- lipoksygenazy zostały najlepiej, jak dotąd, scharakteryzowane w OUN. Mózgowa 12-lipoksygenaza została

oczyszczona oraz sklonowano cDNA. Dzięki temu możliwe było wykazanie obecności tego enzymu w neuronach, głównie w hipokampie, prążkowie i jądrze oliwkowym, a także w komórkach gleju i śródbłonku (*endothelium*) [13].

W układzie nerwowym ssaków i bezkręgowców wykryto aktywną 12-(S)-lipoksygenazę, która katali-



Ryc. 3 Rozkład arachidonianu przy udziale lipoksygenazy.

Pierwszym produktem przemiany kwasu arachidonowego powstającym na skutek działania 5-, 15-, i 12-lipoksygenaz są odpowiednio kwasy 5-, 15-, 12-hydroperoksyekoizatetraenowe (HPETE). Szereg leukotrienu powstaje z 5-HPETE przy udziale enzymów: syntazy leukotrienu LTA<sub>4</sub> (1), hydrolazy LTA<sub>4</sub> (2), syntazy LTC<sub>4</sub> (3),  $\gamma$ -glutamyllopeptydazy (4) i dipeptydazy (5). Formy 5-HETE i 12-HETE są to odpowiednie produkty redukcji kwasów hydroperoksyekoizatetraenowych. 15-HETE jest prekursorem lipoksyn. (Zmodyfikowane wg [5])

zuje konwersję kwasu arachidonowego do 12-HPETE. Ten pośrednik może być metabolizowany do 12-HETE, hepoksyliny B<sub>3</sub> i hepoksyliny A<sub>3</sub>, lub poprzez tlenowe cięcie przy C<sub>12</sub> przekształcać się do postaci kwasu 12-ketododekatrienowego [14].

Przemiany te byłyby mało interesujące dla neurobadaczy, gdyby nie odkryto obecności tych związków w neuronach ruchowo-czuciowych u *Aplysia Californica*. Metabolity działania 12-lipoksygenazy na kwas arachidonowy w neuronach, funkcjonują jako wtórne przekaźniki i uczestniczą w komunikowaniu lokalnych grup komórek. W neuronach czuciowych *Aplysia* serotonina i tetrapeptyd molluskan zamykają i otwierają kanały potasowe należące do specyficznej subclassy, określanej jako kanały K<sup>+</sup>S. Nazwa pochodzi stąd, że serotonina inaktywuje ten kanał. Równocześnie wykazano techniką *patch-clamp*, że otwarcie kanału K<sup>+</sup>S może być wywołane obecnością 12-HPETE. Co więcej, ten metabolit wykazuje dwa rodzaje działań: najpierw szybką depolaryzację, a następnie wolną hiperpolaryzację. W szybkiej depolaryzacji wydaje się pośredniczyć 12-keto-metabolit 12-HPETE, podczas gdy za wolną hiperpolaryzację odpowiedzialna jest monoooksygenaza cytochromu P<sub>450</sub>, która tworzy hepoksylinę A<sub>3</sub> [2]. Wszystkie te metabolity są aktywnie wytwarzane przez tkankę nerwową *Aplysia*. Dalszą interesującą kwestią jest wykrycie, że 12-HPETE jest potężnym inhibitorem kinazy białkowej zależnej od Ca<sup>2+</sup>/CaM, która m.in. katalizuje fosforylację synapsyny I w zakończeniach komórek nerwowych ssaków [15]. Poza tym metabolity działania 12-lipoksygenazy mogą także regulować uwalnianie neurotransmiterów i modulować aktywność synaptyczną.

W mózgowiu działaniem 5-lipoksygenazy syntetyzowane są leukotrieny (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>). Stężenia LTC<sub>4</sub> w mózgu są rzędu pikomolarnego. Metodami immunocytochemicznymi stwierdzono, że grupa neuronów wrażliwych na LTC<sub>4</sub> występuje w wyniosłości środkowej. Najwyższe stężenia występują w podwzgórze, jądrze połączeniowym i opuszcze nerwu węchowego [9]. LTC<sub>4</sub> w stężeniu 10<sup>-14</sup> do 10<sup>-11</sup> M pośredniczy w uwalnianiu hormonu luteinizującego (LHRH), zwłaszcza z komórek przedniego płata przysadki szczura. Nie wykazuje natomiast wpływu na uwalnianie hormonu wzrostu. Wpływ LTC<sub>4</sub> wydaje się różnić od działania przysadkowego hormonu uwalniającego hormon luteinizujący. LTC<sub>4</sub> działa bardzo szybko, podczas gdy działania LHRH jest znacznie wolniejsze. Skuteczność LTC<sub>4</sub> można wiązać z bezpośrednim uwalnianiem wytwarzanych hormonów steroidowych, natomiast działanie peptydu LHRH jest bezpośrednio skierowane na syntezę nowego hormonu na poziomie jądra komórkowego. Nie ulega wątpliwości, że te badania wykazują nową rolę leukotrienów w modulacji działania neurohormonów w mózgowiu i możliwe, że w uwalnianiu neurotransmiterów [16]. Leukotrieny powodują obkurczanie żylnie i tętnicze, co jest oczywiście z uwagi na obecność aktywnej 5-lipoksygenazy,

odpowiedzialnej za syntezę 5-HPETE i 5-HETE, oraz innych biologicznie aktywnych leukotrienów. Jak wykazano na skrawkach kory mózgowej szczura i myszy, po dodaniu arachidonianu i jonoforu wapniowego A23187 w znacznie większym stopniu niż PG czy TX, wytwarzany był 12-HETE. Szczególnie duże ilości 12-HETE powstają w siatkówce wołu i ludzkiej skórze. Wzrost stężenia tego związku towarzyszy też procesom hiperprolifracji komórek [16].

### II-3. Działanie epoksygenazy

Cytochrom P<sub>450</sub> jest istotnym kofaktorem epoksygenazy odpowiedzialnej za syntezę i degradację aktywnych metabolitów kwasu arachidonowego. Tworzone w wyniku działania enzymu epoksydy biorą udział w przekazywaniu wewnątrzkomórkowego sygnału podczas uwalniania somatostatyny w podwzgórze [17,18]. Synteza aktywnego biologicznie metabolitu AA — kwasu 5,6-epoksyeikozatrienowego blokowana była skutecznie w obecności inhibitorów cytochromu P<sub>450</sub>. Substratami dla cytochromu P<sub>450</sub> mogą być nie tylko AA, ale także inne nienasycone kwasy tłuszczowe oraz prostaglandyny [19]. Hydroksylacje przeprowadzane z udziałem cytochromu P<sub>450</sub> uważane są za główny mechanizm eliminacji prostaglandyn, choć niewykluczone jest, że ten enzym bierze udział w inaktywacji również innych metabolitów kwasu arachidonowego [20].

W świetle dotychczas zgromadzonych danych cytochrom P<sub>450</sub> jest ważnym elementem kaskady przemian kwasu arachidonowego z punktu widzenia endokrynologii, farmakologii oraz toksykologii. Wstępne badania wykazały wysoki poziom cytochromu P<sub>450</sub> w mózgowiu, przede wszystkim we frakcji mikrosomalnej. Zawartość cytochromu P<sub>450</sub> w mózgowiu, w zależności od metody oznaczania jest dość różna i waha się między 5-20 pmoli/mg do 88-100 pmoli/mg frakcji mikrosomalnej [20].

### III. Eikozanoidy w zaburzeniach funkcji ośrodkowego układu nerwowego

Jedną z zaobserwowanych prawidłowości przy rozpoczynającym się napadzie padaczkowym jest znamienny wzrost poziomu eikozanoidów, głównie PGD<sub>2</sub> oraz produktów jego dalszych przemian, jak PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> i 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Poziomy ich po 30 min. trwania ataku na ogół powracają do wartości podstawowych. Inhibitory cyklooksygenazy takie, jak indometacyna i diklofenak blokują syntezę eikozanoidów wywołujących drgawki, nie wpływają jednak na utajenie objawów, ani na pojawienie się napadu drgawek. Wskazuje to wyraźnie, że wzrost stężenia mózgowych eikozanoidów jest efektem wtórnym tego stanu chorobowego [21]. Molekularny mechanizm uwalniania eikozanoidów krótko po pojawieniu się drgawek nie jest na razie w pełni jasny. Chociaż mając

za podstawę uwalnianie kwasu arachidonowego można spekulować, że stymulacja fosfolipaz i lipaz może odgrywać tu znaczącą rolę. Hipotezę tę potwierdza fakt, że uprzednie podawanie zwierzętom deksometazonu, specyficznego inhibitora PLA<sub>2</sub>, obniża uwalnianie AA indukującego napady padaczkowe. Należy jednak podkreślić, że indukcja ataku padaczkowego pociąga za sobą wzrost poziomu 1-stearo-2-arachidono-*sn*- glicerolu i IP<sub>3</sub>, co przemawia również za udziałem PLC. U zwierząt traktowanych bikukuliną indukującą drgawki, obserwowano wzrost aktywności enzymów tworzących eikozanoidy [22].

W procesach zapalnych występujących w różnych rodzajach komórek mózgowia potwierdzony jest udział mediatorów i modulatorów takich, jak histamina, kininy, interferony, prostaglandyny, tromboksany i leukotrieny. Związki te działają zgodnie przy rozpoczynającej się odpowiedzi zapalnej charakterystycznej dla obrzęku, hipertemii i utraty normalnej funkcji neuronalnej [2, 16]. Nie budzi wątpliwości stwierdzenie, że produkty działania cyklooksigenazy są ważnymi mediatorami stanów zapalnych; i tak prostaglandyny znajdowane są w wysiękach zapalnych w stężeniach biologicznie aktywnych, a warto podkreślić, że cyklooksigenaza jest wybiórczo hamowana przez niesteroidowe leki przeciwzapalne, jak aspiryna czy indometacyna. Również LTB<sub>4</sub> wywiera *in vivo* potężne działanie w tkankach mózgowia.

Produkty działania lipooksygenazy — HPETE i HETE — są farmakologicznie mniej aktywne niż LTB<sub>4</sub>. Tym niemniej przypisuje się im indukcję napływu komórek do wnętrza obszarów zapalnych. Cysteinylleukotrieny takie, jak LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub> uczestniczą we wzroście przepuszczalności błony plazmatycznej komórki, stanowiąc m.in. podstawę tworzenia obrzęków. Są one syntetyzowane w komórkach w trakcie stanu zapalnego, a tworzenie ich narasta wraz ze wzrostem procesu zapalnego i niedokrwienia. Jako, że LTC<sub>4</sub> znamienne podnosi przepuszczalność naczyniową (zwłaszcza w płucach) uważa się, że stanowić on może ważny inicjator mózgowego obrzęku niedokrwienego i powodować skurcz małych naczyń krwionośnych w mózgowiu. Leukotrieny obniżają aktywność Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, -ATPazy, co podczas niedokrwienego uszkodzenia przyczynia się także do obrzęku mózgu [23].

Reasumując należy podkreślić, że kwas arachidonowy oraz eikozanoidy wywierają w ośrodkowym układzie nerwowym zarówno działanie wewnętrzne, jak i zewnętrzne. Znaczenie ich jako wtórnych przekaźników czy lipidowych mediatorów w przewodzeniu sygnałów neurotransmiterowych, ich oddziaływań parakrynych na sąsiednie neurony oraz komórki gleju nie budzi wątpliwości, choć do wyjaśnienia wielu różnych niejasności związanych z tymi procesami niewątpliwie konieczna jest kontynuacja badań.

Artykuł otrzymano 16 lipa 1996 r.

Zaakceptowano do druku 18 września 1996 r.

## Piśmiennictwo

- Smith WL, Borgeat P, Fitzpatrick FA (1991) W: DE Vance and J Vance (red) *Biochemistry, Lipoproteins and membranes*, Elsevier Science Publishers BV, New York, str 297-325
- Shimizu T, Wolfe LS (1990) *J Neurochem* **55**: 1-15
- Pairet M, Engelhardt G (1996) *Fundam Clin Pharmacol* **10**: 1-15
- Peri KG, Hardy P, Li DY, Varma DR, Chemtob S (1995) *J Biol Chem* **270**: 24615-24620
- Piomelli D (1995) *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* W: Floyd E. Bloom and David J Kupfer (red.) Raven Press, Ltd., New York, str 595-607
- Urade Y, Fujimoto N, Kaneko T, Konishi A, Mizuno N, Hayaishi O (1987) *J Biol Chem* **262**: 15132-15136
- Seregi A, Keller M, Hertting G (1987) *Brain Res* **404**: 113-120
- Hayaishi O (1991) *FASEB J* **5**: 2575-2581
- Galli C, Petroni A (1990) *Ups J Med Sci Suppl* **48**: 133-144
- Sigal E (1991) *Am J Physiol* **260**: L13-L28
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) *Annu Rev Physiol* **57**: 683-706
- Robertson RP (1995) *Trends in Endocrin Metab* **6**: 293-297
- Nishiyama M, Okamoto H, Watanabe T, Hori T, Hada T, Ueda N, Yamamoto S, Tsukamoto H, Watanabe K, Kirino T (1992) *J Neurochem* **58**: 1395-1400
- Piomelli D, Greengard P (1990) *Trends Pharmacol Sci* **11**: 367-373
- Piomelli D, Greengard P (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6770-6774
- Samuelsson B, Dalhen SE, Lindren JA, Rouzer CA, Serhan CN (1987) *Science* **237**: 1171-1176
- Snyder GD, Capdevila J, Chacos N, Manna S, Flack JR (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3504-3507
- Junier M-P, Dray F, Blair I, Capdevila J, Dishman E, Flack JR, Ojeda SR (1990) *Endocrinology* **126**: 1534-1540
- Capdevila JH, Flack JR, Estabrook RW (1992) *FASEB J* **6**: 731-736
- Warner M, Wyss A, Yoshida S, Gustafsson J-A (1994) *Methods in Neuroscience t. 22: Neurobiology of Steroids*, W: E. Ronald de Kloet and Win Sutano (red.) Academic Press, Inc, str 51-66
- Hertting G, Seregi A (1990) *Lipid Mediators in Ischemic Brain Damage and Experimental Epilepsy* W: N.G. Bazan (red) Basel, Karger **4**: 162-189
- Majerus PW (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 225-250
- Unterberg A, Schmidt W, Wahl M, Ellis EF, Marmaron A, Baethumann A (1991) *J Neurosurg* **74**: 773-778



Wydawca prosi o kontakt tych, którzy chcieliby wykorzystać łamy „Postępów Biochemii” do reklamowania swych produktów i usług związanych z biochemią, biologią molekularną i biologią komórki.

# KOMUNIKAT

## Komisji Słownictwa Biochemicznego

### 1. Antagoniści czy antagonisty?

Stosowanie liczby mnogiej wyrazów „agonista, antagonista” na określenie substancji chemicznych budzi wiele kontrowersji. Po konsultacji z językoznawcą prof. dr Janem Miodkiem Komisja ustaliła co następuje:

Formy „agoniści, antagoniści” są niewłaściwe, gdyż można je stosować jedynie w odniesieniu do rzeczowników osobowych (np.: antagoniści działali...) Rzeczowniki nieosobowe przybierają formy „agonisty, antagonisty” (np. agonisty działały...).

Za godne zalecenia Komisja uważa nazwy wprowadzone przez prof. dr Ryszarda Piękosia: **agon** i **antagon**. Określają one bardzo dobrze właściwe im działanie i nie budzą zastrzeżeń w liczbie mnogiej: agony i antagony.

### 2. Cytozol czy cytosol?

Używając spolszczonych nazw należy się kierować ich oryginalnym źródłosłowem łacińskim lub greckim, a nie formą przetworzoną w innych językach, np. w niemieckim. Poprawną formą jest:

cytosol a nie cytozol

lizosom a nie lizozom

ekson (od: ekspresja) a nie egzon, itp.

Przewodnicząca Komisji Słownictwa Biochemicznego  
*Prof. dr hab. Janina Kwiatkowska-Korczak*

Przypominamy o zmianie numeru konta prenumeraty **POSTĘPÓW BIOCHEMII**

Nowy numer: PBK XIII O/Warszawa, 370044-1225-2720-3-69

Z przyjemnością informujemy, że od stycznia 1997 Redakcja Postępów Biochemii dysponować będzie własnym numerem poczty komputerowej, e-mail: Postępy @ nencki.gov.pl

Adres Redakcji: Polskie Towarzystwo Biochemiczne, „Redakcja Kwartalnika „Postępy Biochemii”, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

# Roczny spis treści tom 42, nr 1, 2, 3, 4, 1996

## ARTYKUŁY

- Andrzej Kaczanowski, Janina Kaczanowska** — Nagroda Nobla 1995 r. w dziedzinie medycyny i fizjologii:  
Embriogeneza i geny homeotyczne . . . . . 2
- Marek Jurgowiak, Karol Białkowski, Ryszard Oliński** — Reaktywne formy tlenu a regulacja ekspresji genów . . . . . 6
- Łukasz Huminiecki** — Somatyczna terapia genowa — czy jest bezpieczna? . . . . . 14
- Ewa Śledziwska-Gójska** — Naprawa O<sup>6</sup>-metyloguaniny w DNA . . . . . 21
- Tomasz H. Zastawny** — Naprawa oksydacyjnych uszkodzeń DNA u *prokariota* . . . . . 31
- Bogdan Falkiewicz, Bogdan Liberek** — Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy I . . . . . 41
- Tadeusz Lietz** — Zmiany objętości komórek a modulacja ich metabolizmu . . . . . 49
- Andrzej Tretyn, Justyna Wiśniewska** — Fitochrom — struktura i właściwości . . . . . 57
- Małgorzata Jakubowicz** — Etylen — jego udział w regulacji dojrzewania owoców i starzenia się kwiatów. Aspekty biotechnologiczne . . . . . 65
- Maciej Dróżdź** — biochemia w sieci . . . . . 72
- Barbara Grzelakowska-Sztabert** — Cykliny fazy G1 cyklu komórkowego, ich funkcje i udział w nowotworzeniu . . . . . 99
- Ewa Sikora** — Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki . . . . . 108
- Małgorzata Manteuffel-Cymborowska** — Dekarboksylaza ornitynowa jedynym nieubikwitynowym białkiem degradowanym przez 26S proteasomy? . . . . . 113
- Bożena Kamińska, Grażyna Mosieniak, Marta Wiśniewska** — Współdziałanie czynników transkrypcyjnych AP-1 i NFAT w procesie regulacji ekspresji genów . . . . . 120
- Andrzej Paszewski, Małgorzata Balińska** — Regulacja metabolizmu folianowego u grzybów: *Aspergillus nidulans* jako model badawczy . . . . . 129
- Wojciech Rode** — Inhibicja syntazy tymidylanowej w chemioterapii . . . . . 133
- Jolanta Barańska, Rafał Czajkowski, Małgorzata Czarny, Paweł Sabała, Magdalena Wiktorek** — Przekazywanie informacji w komórce. Fosfolipidy jako cząsteczki sygnałowe . . . . . 140
- Agnieszka Makowska, Jerzy Duszyński** — Oscylacje i fale wapniowe w komórce . . . . . 146
- Ewa Lenartowicz, Jolanta Wudarczyk, Grażyna Dębska** — Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych . . . . . 154
- Katarzyna A. Nałęcz** — Transport wody przez błony biologiczne . . . . . 161
- Mariusz R. Więckowski, Krzysztof Zabłocki** — Osmolity i osmoregulacja w komórkach nerek . . . . . 167
- Krystyna Bogucka** — Homeostaza jonów magnezu w komórkach zwierzęcych . . . . . 178
- Hanna Strzelecka-Gołaszewska** — Molekularny mechanizm generacji siły (ruchu) przez aktomiozynę . . . . . 185
- Renata Dąbrowska** — Molekularne mechanizmy zależnej od Ca<sup>2+</sup> regulacji skurczu różnych typów mięśni . . . . . 195
- Anna Jakubiec-Puka, Urszula Wieczorek** — Kompleks dystrofiny z glikoproteinami błony komórkowej w mięśni szkieletowym . . . . . 204
- Anna Filipek, Urszula Wojda, Wiesława Leśniak, Jacek Kuźnicki** — Kalcyklina — białko wiążące wapń z rodziny S-100 . . . . . 213



**Janina Kaczanowska, Dorota Włoga, Andrzej Kaczanowski** — Polaryzacja komórki, białka polarne i cytokineza . . . . . 227

**Tomasz T. Calikowski** — Rola kompleksów chromatynowych w regulacji ekspresji genów . . . . . 238

**Ireneusz W. Biedermann** — Kinazy MAP i ich rola w regulacji poziomu, składu podjednostkowego oraz stopnia fosforylacji czynnika transkrypcyjnego AP-1 . . . . . 244

**Hanna Jańska, Magdalena Wołoszyńska** — Molekularne podstawy cytoplazmatycznej męskosterylności u roślin wyższych . . . . . 253

**Magdalena Boguta** — Rola genomu jądrowego w regulacji funkcjonowania mitochondriów *Saccharomyces cerevisiae* . . . . . 259

**Anna M. Rychter** — Roślinny łańcuch oddechowy . . . . . 268

**Katarzyna Kuczek, Magdalena Kotowska, Marian Mordarski** — Sterowana biosynteza antybiotyków poliketydowych . . . . . 276

**Agnieszka Ługowska, Anna Tylicka-Szymańska** — Niedobór aktywności arylosulfatazy A jako podłoże leukodystrofii meta-chromatycznej . . . . . 284

**Tadeusz Pawełczyk** — Izoenzymy fosfolipazy C specyficznie hydrolizującej fosfatydyloinozytyle i regulacja ich aktywności . . . . . 290

**Jolanta M. Dzik, Elżbieta Wałajtys-Rode** — Sfingomielina i jej metabolity jako pośredniki w przenoszeniu sygnału w komórce . . . . . 299

**Paweł P. Liberski, Jolanta Bratosiewicz** — Pasażowalne amyloidozy mózgowie czyli choroby wywołane przez priony: czy struktura czynnika *scrapie* jest już rzeczywiście znana? . . . . . 320

**Sabina Kędzierska, Alina Taylor** — Rola białek kodowanych przez faga  $\lambda$  w destrukcji ściany komórkowej i kontroli czasu lizy . . . . . 331

**Bogdan Falkiewicz, Bogdan Liberek** — Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy II . . . . . 340

**Barbara Czartoryska** — Wewnątrzkomórkowy transport enzymów lizosomalnych — Rola receptorów mannozo-6 fosforanu . . . . . 350

**Ludmiła Żylińska, Lilla Lachowicz** — Kwas arachidonowy w fizjologii i patologii tkanki nerwowej . . . . . 357

**Lilla Lachowicz, Ludmiła Żylińska** — Eiozanoidy — mózgowy przekaźnik sygnałów . . . . . 363

## WSPOMNIENIA

**Tadeusz Reichstein** — Noblista z Włocławka — Wspomnienie . . . . . 318

## SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

Symposium "On Structure and Biological Functions of Nucleic Acid Components and their Analogues, and Related Topics" . . . . . 75

XXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . . 76

Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, XIV kadencja . . . . . 78

Protokół z XV Zwyczajnego Walnego Zebrania członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . . 86

Nowe Władze Towarzystwa . . . . . 88

Konferencja pt. "New frontiers in Cell and Molecular Biology" . . . . . 88

Konferencja pt. "Progress in Tumour Biology" . . . . . 89

Ogłoszenia Zarządu Głównego . . . . . 89

Komunikat Komisji Słownictwa . . . . .

## INNE

Nauczycielom pisania  
Jacek Kuźnicki . . . . . 217

Dla Czytelników  
Zofia Zielińska . . . . . 219

Listy gratulacyjne z okazji 90-lecia Członków

Honorowych Towarzystwa, Profesor Stelli  
Niemierko . . . . . 223  
Profesora Tadeusza Korzybskiego . . . . . 225

## Indeks autorów prac przeglądowych, tom 42, 1996

### B

**Balińska M** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Barańska J** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Białkowski K** — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, AM, im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

**Biedermann IW** — Pracownia Hodowli Komórek i Tkank, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Bogucka K** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Boguta M** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Bratosiewicz J** — Laboratorium Mikroskopii Elektronowej i Neuropatologii, Samodzielna Pracownia Biologii Nowotworów, Katedra Onkologii AM, ul. Paderewskiego 4, 93-509 Łódź

### C

**Calikowski TT** — Pracownia Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Czajkowski R** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Czarny M** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Czartoryska B** — Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa

### D

**Dąbrowska R** — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Dębska G** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Drózd M** — Kowanówkowo, ul. Poziomkowa 22, 64-600 Oborniki Wlkp.

**Duszyński J** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Dzik JM** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

### F

**Falkiewicz B** — Zespół Chemii Aminokwasów i Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk

**Filipek A** — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

### G

**Grzelakowska-Sztabert B** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

### H

**Huminiecki Ł** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

### J

**Jańska H** — Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

**Jakubiec-Puka A** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Jakubowicz M** — Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

**Jurgowiak M** — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, AM, im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

### K

**Kaczanowska J** — Zakład Cytofizjologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Krakowskie Przedmieście 26 28, 00-927 Warszawa

**Kaczanowski A** — Zakład Cytofizjologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Krakowskie Przedmieście 26 28, 00-927 Warszawa

**Kamińska B** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Kędziarska S** — Katedra Biochemii Bakteryjnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

**Kotowska M** — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław

**Kuczek K** — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław

**Kuźnicki J** — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## L

**Lachowicz L** — II Zakład Biochemii, Instytutu Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

**Leśniak W** — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Lenartowicz E** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Liberski PP** — Laboratorium Mikroskopii Elektronowej i Neuropatologii, Samodzielna Pracownia Biologii Nowotworów, Katedra Onkologii AM, ul. Paderewskiego 4, 93-509 Łódź

**Lietz T** — Instytut Biochemii UW, Zakład Regulacji Metabolizmu, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

**Liberek B** — Zespół Chemii Aminokwasów i Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk

## Ł

**Ługowska A** — Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa

## M

**Makowska A** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Manteuffel-Cymborowska M** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Marszałek J** — Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii AMG/UG, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

**Mordarski M** — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław

**Mosieniak G** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## N

**Nałęcz K A** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## O

**Oliński R** — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej AM im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

## P

**Paszewski A** — Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Pawelczyk T** — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, AM, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

## R

**Rode W** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Rychter AM** — Zakład Bioenergetyki Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, UW, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

## S

**Sabała P** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Sikora E** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Strzelecka-Gołaszewska H** — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Śledziwska-Gójska E** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

## T

**Taylor A** — Katedra Biochemii Bakteryjnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

**Tretyn A** — Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

**Tylki-Szymańska A** — Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, Zespół Chorób Metabolicznych, Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa

## W

**Wałajtys-Rode E** — Zakład Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa

**Wieczorek U** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Więckowski M** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Wiktorek M** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Wiśniewska J** — Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

**Wiśniewska M** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Włoga D** — Zakład Cytofizjologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

**Wołoszyńska M** — Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

**Wojda U** — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Wudarczyk J** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## Z

**Zabłocki K** — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Zastawny TH** — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, AM im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

**Zylińska L** — II Zakład Biochemii, Instytutu Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

## NOWE WYDAWNICTWA PTBIOCH.:

- 1) „HORMONY GLIKOPROTEINOWE — Struktura, biosynteza i funkcja ich oligosacharydów”  
Monografia biochemiczna nr 41 cena 5,- zł  
autor Iwona Żak i Marian Drózdź  
rok wydania 1996
- 2) „WŁODZIMIERZ MOZOŁOWSKI 1895—1975 w 100-lecie urodzin” cena 25,- zł  
Wydawca Oddział Gdański PTBioch. r. 1995  
pod red. Wiesława Makarewicza praca zbior.

NATO Advanced Study Institute Co-sponsored by FEBS

# Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants. Pathological and Physiological Significance

May 24-June 4, 1997  
Antalya, TURKEY  
(Kiris, World, Magic Hotel)

---

## APPLICATION / REGISTRATION FORM

NAME: FIRST NAME:  
NATIONALITY: DATE OF BIRTH:  
SEX: DEGREE / TITLE:  
AFFILIATION:  
MAILING ADDRESS:  
ZIP CODE: CITY / COUNTRY:  
TEL: FAX:  
E-MAIL:  
CURRENT RESEARCH INTEREST:  
POSTER TITLE:

ACCOMPANYING PERSON  
HOUSING: Please indicate your preference  
Hotel (single or double)

A limited number of FEBS and NATO grants will be available. Requests for a grant have to be submitted as soon as possible together with this application form, a letter of recommendation and a poster abstract to Tomris Özben.

---

### Information and applications to:

Prof. Tomris ÖZBEN  
Akdeniz University  
Faculty of Medicine  
Dept. of Biochemistry  
TR-07003 Antalya-TURKEY  
Tel: 90.242.2275996  
Fax: 90.242.2274958  
E-Mail: ozben@akdeniz.edu.tr  
<http://www.akdeniz.edu.tr/~ozben/>

### World-Wide-Web page:

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1997 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napi-

sanie imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu wraz z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszystkich trzech odcinkach przekazu.

**Prenumerata krajowa dla instytucji:  
60.000 zł**

**Prenumerata krajowa indywidualna:  
30.000 zł (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).**

**Prenumerując  
„Postępy”  
Biochemii”  
wspierasz  
swoje  
czasopismo!**



## Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd P.T.Bioch. uprzejmie prosi wszystkich członków o wpłatę zaległych i bieżących składek członkowskich. Zachęcamy także do zaprenumerowania „Postępów Biochemii”.



### Pokwitowanie dla wpłacającego

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

.....  
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimskie  
37 00 44-1225-2720-3-69

### Odcinek dla posiadacza rachunku

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

.....  
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimskie  
37 00 44-1225-2720-3-69

### Odcinek dla poczty lub banku

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

.....  
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimskie  
37 00 44-1225-2720-3-69

stempel

Pobrano opłatę

zł. ....

.....  
podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł. ....

.....  
podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł. ....

.....  
podpis przyjmującego

# Wskazówki dla autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające bieżące osiągnięcia, koncepcje i kierunki badawcze w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych; publikuje też noty z historii biochemii, zasady polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje nadesłanych książek oraz sprawozdania ze zjazdów, konferencji i szkół, w których biorą udział członkowie Towarzystwa.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postępkach Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowania piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienie zilustrowane za pomocą tabel, rycin, (wykresy, schematy, reakcje), wzorów i fotografii.

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie, podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeżeli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenie zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

## Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

**TEKST:** Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm.

W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

**Strona informacyjna** maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji, nr telefonu

i ewentualnie fax, adresy prywatne autorów, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrót tytułu pracy (do 25 znaków).

**Strona 1 (tytułowa)** zawiera imiona i nazwiska autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym oraz wykaz stosowanych skrótów.

**Kolejno numerowane dalsze strony** obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

**PIŚMIENICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9—26]. Odnosiniki bibliograficzne winny mieć nową uproszczoną formę. 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) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Hildenbrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* **631**: 499-502
2. Bostock CJ, Sumner AT (1978) *The Eukaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str. 1-77
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 243-272

**ILUSTRACJE:** Ryciny winny być gotowe do reprodukcji. Fotografie czarno-białe (kontrastowe), powinny być wykonane na papierze matowym. Po porozumieniu z Redakcją można proponować reprodukcję fotografii barwnych. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wskazane jest, aby ryciny były dwukrotnie większe od przyszłej reprodukcji, tj. w skali 2 : 1. 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 winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, ryciny czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Maszynopis i załączniki (w dwu egzemplarzach), właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, należy przesłać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”  
Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
ul. Pasteura 3,  
02-093 Warszawa

