

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 31 (3-4)
(393-704) (1985)

1985

tom 31 nr 3-4

PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwóch lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minireviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 5 stron maszynopisu, informujące o nowych interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych, oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innych czasopismach, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając prace po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

Forma maszynopisu: maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakład(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły informować rzeczowo winny o przedstawionych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór 1 itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku, np. kwas glutaminowy (1).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postepy Biochemii

KWARTALNIK

1985 TOM 31 ZESZYT 3-4

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 31 (3-4)
(393-704) (1985)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

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

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

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

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

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

SEKRETARZ REDAKCJI

J. Tepińska

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

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1985

Nakład 1740 (1645+95)

Oddano do składania 1985.09.13

Ark. wyd. 22,5; ark. druk. 19,5+wkł.

Podpisano do druku w sierpniu 1986 r.

Pap. offset kl. III 80 g, 70×100

Druk ukończono we wrześniu 1986 r.

Zam. 1059/12/85

Cena zł 240,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



PROFESOR WŁODZIMIERZ NIEMIERKO
1897—1985

Profesor WŁODZIMIERZ NIEMIERKO **1897—1985**

Trzeciego stycznia zmarł w osiemdziesiątym ósmym roku życia profesor Włodzimierz Niemierko, członek założyciel i członek honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Włodzimierz Niemierko urodził się 27 lipca 1897 r. w Petersburgu jako syn praktykującego tam prawnika, Stanisława Niemierki. Studia przyrodnicze Włodzimierz Niemierko rozpoczął w 1917 r. na Uniwersytecie Moskiewskim, a od 1923 kontynuował je na Wydziale Filozoficznym Uniwersytetu Warszawskiego. W tymże roku podjął pracę badawczą w Zakładzie Fizjologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego pod kierunkiem założyciela Instytutu i profesora Uniwersytetu Warszawskiego, Kazimierza Białaszewicza. Z Instytutem Nenckiego Włodzimierz Niemierko pozostał związany przez dalsze swe życie.

Prace doświadczalne Włodzimierza Niemierki dotyczyły początkowo metabolizmu lipidów u kręgowców zmiennocieplnych w różnych ich stanach fizjologicznych. Praca na temat udziału tłuszczów w przemianach pracującego mięśnia, nagrodzona przez Zarząd Instytutu, została przyjęta jako rozprawa doktorska. Stopień doktora filozofii Uniwersytetu Warszawskiego uzyskał Włodzimierz Niemierko w 1932 r. Późniejsze Jego badania objęły metabolizm lipidów u owadów. Wielka różnorodność form, różnorodność środowiska i żywienia owadów warunkujące duże zróżnicowanie ich przemian metabolicznych skierowały na nie zainteresowania badawcze doktora Niemierki. Wyniki tych badań, opublikowane już po wojnie, postawiły Go w rzędzie pionierów biochemii owadów nie tylko w kraju lecz i w świecie.

W latach 1933—1939 oprócz badań prowadzonych w Instytucie Nenckiego, doktor Niemierko pracował na stanowisku starszego asystenta, a potem adiunkta Zakładu Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warszawskiego.

Podczas okupacji pracował w laboratorium Szpitala Wolskiego, gdzie prowadził także wykłady i seminaria z chemii fizjologicznej dla studentów medycyny i biologii Uniwersytetu Warszawskiego odbywające się w grupach tajnego nauczania. Ciężka choroba ocaliła Go w pamiętnych dniach Powstania Warszawskiego, kiedy to hitlerowcy wymordowali lekarzy i pracowników laboratoriów Szpitala Wolskiego.

Wkrótce po zakończeniu wojny doktor Niemierko habilitował się na Uniwersytecie Warszawskim; wykładał też w tym czasie na Wydziale Lekarskim chemię fizjologiczną. Jesienią 1945 r. został powołany na stanowisko profesora i kierownika Katedry Fizjologii Zwierząt na Uniwersytecie Łódzkim, gdzie pracował do 1956 r. W latach 1956—1963 był kierownikiem analogicznej Katedry na Uniwersytecie Warszawskim.

Inicjatywa reaktywowania Instytutu Nenckiego powstała bardzo wcześnie. Już w 1946 r. Włodzimierz Niemierko wspólnie ze Stellą Niemierko, Lilianą Lubińską oraz Jerzym Konorskim tworzy pierwsze zręby powojennego Instytutu w Łodzi i pełni w nim obowiązki dyrektora do powrotu do kraju w 1948 r. profesora Jana Dembowskiego. Równocześnie profesor Niemierko tworzy Zakład Biochemii Instytutu, stara się o aparaturę, sprzęt laboratoryjny, czasopisma i książki, gromadzi współpracowników. Dla Instytutu zdobywa lokal, później gmach położony w niewielkim ogrodzie, gdzie instaluje się zwierzętarnię i warsztaty. Kierowany przez profesora Niemierkę Zakład Biochemii staje się w krótkim czasie znanym ośrodkiem badań nad biochemią owadów.

W połowie lat pięćdziesiątych Instytut przenosi się do nowego gmachu w Warszawie. W 1956 r. powraca też do Warszawy profesor Niemierko i znów organizuje swój Zakład, będąc równocześnie wicedyrektorem Instytutu. Od 1961 roku jest dyrektorem, a po swym przejściu na emeryturę w 1968 r. przewodniczy przez kilka kadencji Radzie Naukowej Instytutu. Był gorącym patriotą Instytutu Nenckiego.

Zajęcia dydaktyczne, organizacyjne i administracyjne, podejmowane z poczucia obowiązku społecznego, nie przytłumiły pasji badawczej Włodzimierza Niemierki. Czytał wiele i eksperymentował; najchętniej sam wykonywał nawet najprostsze czynności laboratoryjne. Ulepszał stosowane w analityce biochemicznej metody, niektóre z nich ogłosił drukiem. Badania w zakresie biochemii owadów prowadzone przez kierowany przez Niego zespół objęły wiele zagadnień: metabolizm węglowodanowy i lipidowy, przemiany związków fosforowych i azotowych, przemiany oddechowe i energetyczne. Chętnie ujmował opisywane zjawiska porównawczo, zwłaszcza dyskutując zmiany towarzyszące rozwojowi i metamorfozie owadów.

Wraz z rozbudową Instytutu i przygotowaniem kadr biochemicznych, w Zakładzie kierowanym przez Profesora Niemierkę zostały podjęte, przeważnie z Jego inicjatywy, nowe kierunki badawcze jak: biochemia mięśni, bioenergetyka, regulacja przemian katabolicznych i anabolicznych; utwo-

rzono nowe pracownie. Jako kierownik Zakładu Profesor interesował się badaniami i wynikami swoich współpracowników, cieszył się ich sukcesami i inicjatywami badawczymi, nigdy nie narzucał swej tematyki. Nie był dla nich zwierzchnikiem, lecz starszym, doświadczonym kolegą i przyjacielem. Sam pozostał przy rozwijanych przez lata badaniach biochemii owadów. Nie przerwał badań po przejściu na emeryturę, zajmując się metabolizmem puryn u mola woskowego. Ostatnia Jego praca doświadczalna ukazała się w *Insect Biochemistry* w 1983 r.; Autor miał wówczas 86 lat. Ogółem ogłosił około 100 publikacji naukowych.

Profesor Niemierko bardzo wysoko cenił kontakty naukowe z badaczami z innych placówek i ośrodków. Brał przez lata czynny udział w zjazdach i konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych. Uznawał niezbędność towarzystw naukowych dla rozwoju nauk eksperymentalnych. Był członkiem Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego w latach przedwojennych i brał udział w jego reaktywowaniu po wojnie. Był jednym z inicjatorów i członków założycieli Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i przewodniczącym Tymczasowego Zarządu, który wytyczył do dziś aktualne kierunki działania Towarzystwa, opracował statut i doprowadził do zorganizowania Towarzystwa w 1958 r. Za zasługi dla rozwoju biochemii i fizjologii w naszym kraju Polskie Towarzystwo Biochemiczne i Polskie Towarzystwo Fizjologiczne nadały Profesorowi Włodzimierzowi Niemierce godność członka honorowego. Ponadto Profesor należał do innych krajowych towarzystw naukowych oraz do brytyjskiego Biochemical Society.

Już w 1952 r. profesor Niemierko otrzymał nagrodę naukową Ministerstwa Szkolnictwa Wyższego, a w 1955 r. nagrodę państwową. Był odznaczony krzyżem oficerskim i komandorskim orderu Odrodzenia Polski. W roku 1964 został powołany na członka korespondenta, a w 1971 na członka rzeczywistego Polskiej Akademii Nauk.

Profesor Niemierko uczestniczył z oddaniem w pracach Akademii w trosce o rozwój nauki polskiej. Interesowały Go żywo wydarzenia w kraju i na świecie. Pracę badawczą kochał, sprawiała Mu radość. Był przyrodnikiem o wysokiej kulturze humanistycznej. Był purystą językowym, znał kilka języków, ale często sięgał do specjalistycznych dzieł lingwistycznych. Kochał muzykę, był jej znawcą, studiował muzyczne dzieła, których wiele miał w swej bibliotece. Gra na fortepianie dawała Mu spokój i sprzyjała skupieniu, była intymnym osobistym przeżyciem. Był życzliwy ludziom, okazywał szacunek każdemu. Odszedł prawy i szlachetny Człowiek, wybitny uczony, wielce zasłużony organizator nauki polskiej w jej trudnym powojennym okresie.

Uczniowie

W zeszycie 2, tomu 31 (1985) przez niedopatrzenie Redakcji zostało zniekształcone nazwisko profesora Jana Zurzyckiego we wspomnieniu o profesor Marii Sarneckiej-Keller.

Materiały Szkoły Zimowej n.t. Neuropeptydów

Coraz ściślejszy mariaż farmakologii z biochemią spowodował lawinowy postęp w naszej wiedzy o mechanizmach odpowiedzi żywego ustroju na obce związki chemiczne i doprowadził do odkrycia wielu zjawisk, dotychczas nie dostrzeżonych w klasycznych badaniach fizjologicznych i biochemicznych. Szybkość nagromadzania się nowych danych jest tak wielka, że nawet przy nieograniczonym dostępie do światowego piśmiennictwa trudno je przyswoić. W naszych warunkach, w których przepływ informacji jest powolny, a ich przyswajanie w wielu wypadkach utrudnione przez barierę językową, pojawić się może niebezpieczna szczelina między tym, co wiemy, a tym, co powinniśmy wiedzieć.

Sytuacja ta w farmakologii jest szczególnie wyraźna a próbą jej opanowania jest organizacja przez Instytut Farmakologii PAN w Krakowie zimowej szkoły farmakologicznej. Pierwsza taka szkoła, poświęcona neuropeptydom, została zorganizowana w Mogilanach w lutym 1984 r. Niezbyt liczne grono uczestników (ograniczenia lokalowe) zapoznało się z referatami wygłoszonymi przez najlepszych specjalistów w tej dziedzinie, pracujących w Polsce.

Wykłady i dyskusje, niejednokrotnie bardzo żywe, są jednak sprawą ulotną, a korzystało z nich niewiele osób. Dzięki współpracy z „Postępami Biochemii” mogą one być teraz przedstawione szerszemu gronu zainteresowanych. Mamy nadzieję, że inicjatywa publikacji materiałów szkoły zimowej Instytutu Farmakologii PAN spotka się z uznaniem Czytelników, i że materiały z następnych szkół zimowych będą mogły w tej samej formie być udostępniane polskim biochemikom i farmakologom.

Jerzy Vetulani i Barbara Przewłocka
Organizatorzy Szkoły Zimowej
Instytutu Farmakologii PAN
Mogilany — 1984

11 C

ARTYKUŁY

JERZY VETULANI *)

Neuropeptydy a neurotransmisja

Neuropeptides and neurotransmission

Spis treści

- I. Rozwój koncepcji neurotransmisji chemicznej
- II. Peptydy jako neuromediatory
- III. Budowa i występowanie neuropeptydów
- IV. Różnice między neuromediatorami klasycznymi a neuropeptydami
 - IV-1. Synteza
 - IV-2. Działanie receptorowe
 - IV-3. Unieczynnianie
- V. Neuromediatory a neuromodulatory
- VI. Współdziałanie między neuromediatorami klasycznymi i neuropeptydami i ich współistnienie
- VII. Ewolucja poglądów na mechanizmy porozumiewania się neuronów

Contents

- I. Development of the concept of chemical neurotransmission
- II. Peptides as neuromediators
- III. Structure and occurrence of neuropeptides
- IV. Differences between classical neurotransmitters and neuropeptides
 - IV-1. Synthesis
 - IV-2. Receptor action
 - IV-3. Inactivation
- V. Neuromediators versus neuromodulators
- VI. Cooperation of classical neurotransmitters and neuropeptides and their co-existence
- VII. Evolution of our knowledge of mechanisms of interneuronal communication.

Wykaz stosowanych skrótów: AMP — adenozymonofosforan; APP — ptasi peptyd trzustkowy (*avian pancreatic peptide*); BPP — bydlęcy polipeptyd trzustkowy (*bovine pancreatic peptide*); CCK — cholecystokinina, CCK-8 — ośmioaminokwasowy fragment CCK; GABA — kwas γ -aminomasłowy (*gamma-aminobutyric acid*); LH-RH — luliberyna (*luteinizing hormone releasing hormone*); NPY — neuropeptyd Y; TRH — tyreoliberyna (*thyrotropin releasing hormone*); VIP — naczynioaktywny peptyd jelitowy (*vasoactive intestinal peptide*).

*) Prof. dr, Zakład Biochemii Instytutu Farmakologii PAN, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków.

I. Rozwój koncepcji neurotransmisji chemicznej

Poglądy na mechanizmy, za pomocą których komórki nerwowe przekazują sobie informacje ulegały i stale ulegają przeobrażeniom. Na ich stan dzisiejszy w sposób zasadniczy wpłynęło odkrycie, że w procesie neurotransmisji uczestniczą również produkowane w komórkach nerwowych substancje peptydowe — neuropeptydy.

Koncepcja neurotransmisji chemicznej, aktualna po dziś dzień, zakłada, że źródłem informacji dla neuronu są substancje chemiczne, uwalniane pod wpływem bodźców elektrycznych z zakończeń innych neuronów. Koncepcja ta zaczęła się przyjmować w początkach XX w.; przedtem przypuszczano, że komórki porozumiewają się między sobą wyłącznie poprzez sygnały elektryczne.

Już w 1898 r. *Lewandowsky* [1] zauważył podobieństwo między działaniem adrenaliny a efektem drażnienia nerwów sympatycznych. Niezależnie od niego trzy lata później analogicznych spostrzeżeń dokonał *Langley* [2]. Za datę powstania koncepcji neurotransmisji chemicznej uważa się jednak rok 1904, kiedy to na zjeździe fizjologów brytyjskich *Elliot* nie tylko doniósł o podobieństwie efektów wywołanych podaniem adrenaliny i drażnieniem nerwów sympatycznych, ale wysunął przypuszczenie, że sygnały elektryczne mogą powodować uwalnianie z zakończeń nerwowych drobniutkich kropelek adrenaliny [3]. Wbrew radom kolegów *Elliot* zdecydował się w rok później opublikować szczegółowe wyniki [4]. Ostateczne, rozstrzygające dowody istnienia neurotransmisji chemicznej przyniosły doświadczenia *Loewi'ego* [5] oraz *Cannona* i *Uridila* [6] w 1921 r.

Postęp w poglądach na neurotransmisję polegał w dużej mierze na poznawaniu nowych substancji mogących pełnić rolę neuromediatorów. Początkowo zidentyfikowano substancje o niewielkich cząsteczkach: acetylocholinę [7, 8] oraz aminy katecholowe, adrenalinę [9] (występującą jako neuromediator w większych ilościach tylko u płazów) i noradrenalinę [10, 11]. W latach pięćdziesiątych jako potencjalne neuromediatory zaczęto uważać również serotoninę [12, 13] i dopaminę [14, 15]. Nową grupę związków neuromediatorowych, którą opisano pod koniec lat sześćdziesiątych, stanowiły aminokwasy: kwas glutaminowy, GABA, glicyna oraz β -alanina [16].

Substancje te określamy dzisiaj chętnie mianem neuromediatorów klasycznych. Warto dodać, że ich status był jednak przez dłuższy czas kwestionowany. Aby uznać jakąś substancję za neuromediator należy sprawdzić, czy spełnia ona określone kryteria (patrz np. [17]), co bardzo trudno doświadczalnie wykazać. Wobec tego, stojąc na gruncie ściśle formalnym można uważać, że dotychczas żadna substancja nie może być z pewnością uznana za neuromediator [17]. Mimo tego, że puryści wciąż mówią jedynie o „przypuszczalnych neuromediatorach”, w praktyce nikt z obec-

nego pokolenia farmakologów nie waha się przyjąć, że wymienione wyżej związki w istocie pełnią funkcję środka komunikacji między neuronami.

II. Peptydy jako neuromediatory

W ostatnich 15 latach zaczęły, początkowo nieśmiało, pojawiać się przypuszczenia, że funkcje nośników informacji międzyneuronalnej mogą pełnić również neuropeptydy, o dużej niekiedy bardzo dużej cząsteczce. Na możliwość tę wskazywały wyniki doświadczeń, w których wykazano wpływ domózgowo podawanych peptydów na zachowanie, np. wzmożone picie wywołane podaniem angiotensyny [18]. Od początku lat siedemdziesiątych zaczęto postulować, że substancje peptydowe mogą pełnić bądź funkcje analogiczne do funkcji klasycznych neuromediatorów [19—21], bądź modulować powoli ale długotrwanie aktywność neuronalną [21—23].

Początkowo koncepcja neuroprzekazników peptydowych spotkała się z niedowierzaniem, chociaż istniały dość wczesne odkrycia sugerujące, że neurony mogą wytwarzać substancje peptydowe, służące do przenoszenia informacji. Już w 1919 r. odkryto neurony produkujące peptydy w rdzeniu kręgowym płaszczki [24], a w 1928 r. Scharrer opisał w podwzgórzu strzebli potokowej (*Phoxinus laevis*) grupę neuronów peptydoergicznych, którym — na podstawie badań cytologicznych — przypisał funkcje endokrynne związane z przysadką [25].

Systematyczne badania Scharrerów, [26] prowadzone od lat trzydziestych, wykazały czynność wydzielniczą wielu neuronów zarówno u kręgowców jak i wśród innych typów zwierząt. Komórki sekrecyjne produkujące neuropeptydy wykryto nawet u jamochłonów [27]. Może najbardziej zaskakującym było odkrycie peptydów pokrewnych insulinie w ciele jednokomórkowych eukariontów [28]. Koncepcję sekrecji peptydów przez neurony lansowali Scharrerowie od ponad 40 lat [26] i w końcu została ona powszechnie przyjęta. Obecnie sądzimy, że komórka nerwowa jest najstarszym filogenetycznie typem komórki wydzielniczej.

Ostatnie dziesięciolecie stało się w neurochemii dekadą peptydów. Kolejno pojawiające się artykuły pogładowe poświęcone temu zagadnieniu przynoszą coraz to dłuższe listy wykrytych neuropeptydów [29—32] i nie wskazuje na to, aby proces ten miał się wkrótce zakończyć. W artykule niniejszym omawiane będą te neuropeptydy, o których sądzi się, że biorą udział w przenoszeniu informacji między neuronami, a więc z pominięciem takich, które działają wyłącznie jako libereliny. Należy jednak dodać, iż — jak się wydaje — wszystkie lub prawie wszystkie peptydy obecne w mózgu mogą spełniać funkcje związane z neurotransmisją, bowiem pod-

wzgórzowe libereliny znaleziono również w zakończeniach nerwowych nie związanych z funkcjami endokrynnymi lub neuroendokrynnymi [32].

W odróżnieniu od surowych kryteriów obowiązujących przy kwalifikowaniu związków chemicznych jako klasycznych neuromediatorów [17], daje się zauważyć znaczne złagodzenie zasad przy uznawaniu peptydów mózgowych za neuromediatory lub neuromodulatory. Wystarczy, aby peptyd znajdował się w neuronach (nie związanych z funkcjami neuroendokrynnymi), wpływał na czynność innych komórek lub na ich odpowiedź na działanie klasycznych neuromediatorów, oraz uwalniał się z zakończeń nerwowych po bodźcach depolaryzujących przy udziale mechanizmu zależnego od jonów wapnia. Konieczność udziału wapnia w procesie uwalniania neuropeptydu wskazuje na to, że podobnie jak klasyczne neuromediatory i hormony neuropeptyd jest uwalniany z pęcherzyków synaptycznych [33].

III. Budowa i występowanie neuropeptydów

Neuropeptydy są grupą zawierającą bardzo różne związki: od dwupeptydów takich jak karnozyna (β -alanylohistydyna, występująca wyłącznie w strukturach związanych ze zmysłem węchu [34]) i kiotorfina (tyrozyloalanina), o silnych własnościach przeciwbólowych [35]), lub trójpeptydów takich jak TRH, poprzez liczące kilka i kilkanaście aminokwasów peptydy takie jak enkefaliny, substancja P, neurotensyna i bombesyna, do związków o bardzo dużej cząsteczce. Po kilkadziesiąt aminokwasów zawierają, przykładowo: VIP, glukagon, CCK i insulina. Olbrzymy, złożony z prawie 200 aminokwasów, to np. hormon wzrostu i prolaktyna.

Charakterystyczną cechą neuropeptydów jest to, że występują one w tkance nerwowej w bardzo niskich stężeniach, a cechuje je wysoka aktywność biologiczna. W innych tkankach, w których działanie ich jest odmienne, mogą występować w wysokich stężeniach. O ile stężenia klasycznych neuromediatorów w mózgu są rzędu 10^{-9} — 10^{-10} mola/mg białka, a stężenia neuromediatorów aminokwasowych wynoszą 10^{-6} — 10^{-8} mola/mg białka, to stężenia neuropeptydów są rzędu 10^{-12} — 10^{-15} mola/mg białka, a więc w skrajnych przypadkach — miliard razy niższe [30]. Trzeba jednak pamiętać, że stężenia substancji w homogenatach nie muszą odzwierciedlać ich aktywności w warunkach fizjologicznych.

Inną cechą neuropeptydów jest ich wielofunkcyjność. Często występują one w tkankach nienerwowych, pełniąc tam rolę hormonów (np. insulina) lub hormonów tropowych (hormony przysadkowe). Wiele neuropeptydów występuje w obrębie przewodu pokarmowego (żeby wymienić choćby CCK, gastrynę, motylinę, polipeptydy trzustkowe takie jak APP, BPP, sekretynę, substancję P, VIP i peptydy opioidowe), inne pełnią, niezależnie od udziału w neurotransmisji, rolę liberelin podwzgórzowych.

Neuropeptydy regulują zachowanie wielu zwierząt bezkręgowych, np. stereotypowe zachowanie przy składaniu jaj u ślimaka morskiego *Aplysia* [36] i przyjmowanie charakterystycznych pozycji ciała u homarów [37]. Jak wspomniano, neuropeptydy występują nawet u zwierząt nie posiadających wyodrębnionych tkanek endokrynych, jak pierścienice i jamochłony [38], a nawet u jednokomórkowców [27].

Interesującą cechą neuropeptydów jest to, że w swej strukturze mogą zawierać molekuly substancji pełniących rolę klasycznych neuromediatorów: kwas glutaminowy, GABA i β -alaninę.

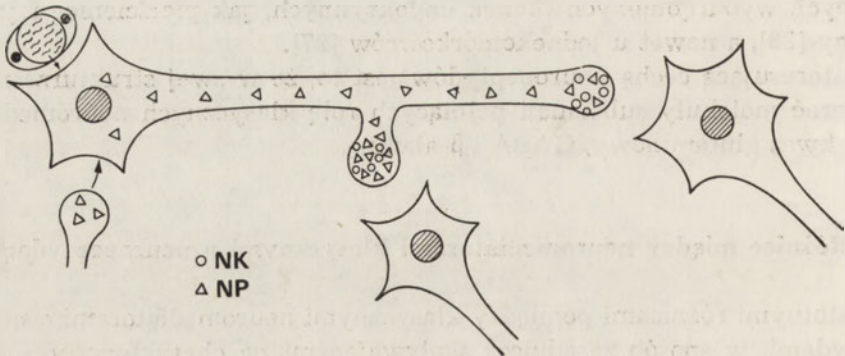
IV. Różnice między neuromediatorami klasycznymi a neuropeptydami

Istotnymi różnicami pomiędzy klasycznymi neuromediatorami a neuropeptydami, w sposób zasadniczy wpływającymi na charakterystykę działania tych dwóch klas przekaźników informacji w systemie nerwowym, są różnice w mechanizmach syntezy oraz unieczynniania po uwolnieniu z neuronu.

IV-1. Synteza

O ile u protokariontów synteza polipeptydów może odbywać się w cytoplazmie (synteza matrycowa) [40], to u eukariontów białka i polipeptydy są syntetyzowane zasadniczo na rybosomach. Jedynie niewielkie neuropeptydy, jak karnozyna i peptydy γ -glutamylowe są syntetyzowane enzymatycznie w zakończeniach nerwowych [41], ale już w przypadku trójaminokwasowego TRH wydaje się, że przeważa mechanizm syntezy rybosomalnej [42]. Duże peptydy syntetyzują się w postaci białek prekursorowych w rybosomach znajdujących się w ciele komórki. W tej formie zostają one otoczone błoną jeszcze w obrębie perikarionu i zamknięte w pęcherzykach wędrują do zakończeń nerwowych, ulegając w czasie transportu rozszczepieniu, przy udziale odpowiednich enzymów, na aktywne fragmenty [43]. Ten mechanizm syntezy jest zasadniczo różny od mechanizmu syntezy klasycznych neuromediatorów, które tworzone są w cytoplazmie, również w zakończeniach nerwowych. Jego konsekwencją jest to, że szybkość nagromadzania się neuropeptydów w zakończeniu nerwowym zależy jedynie od transportu aksonalnego. Ponieważ neurony nie mają innej drogi uzupełnienia zapasu neuropeptydów jak tylko w drodze syntezy, przy dużej aktywności neuronu stężenie neuropeptydu może spaść, gdy transport nie nadąży za szybkością uwalniania. Warto zauważyć, że w związku z tym szybkość uzupełniania zapasu neuropeptydu zależy od odległości zakończenia nerwowego od perikarionu: zjawisko wyczerpywania się zapasów i spadku poziomu neuropeptydów najsilniej zaznacza się w zakończeniach nerwowych, a słabiej w odgałęzieniach aksonu [44].

Oznacza to, że w miarę trwania pobudzenia pewnych typów neuronów może dojść do wybiórczych zmian neurotransmisji o charakterystycznej geometrii, co może informować układ o czasie trwania pobudzenia (Ryc. 1).



Ryc. 1. Klasyczne neuromediatory i neuromediatory peptydowe w neuronie. Neuro-mediatory klasyczne (NK) są syntetyzowane głównie w zakończeniach aksonów i kolateralach (choć ich synteza zachodzi również w perikarionie) i stężenie ich nie zależy od odległości od perikarionu. Neuropeptydy (NP) są syntetyzowane wyłącznie w perikarionie i transportowane do zakończeń. Ich zawartość może być wyższa w zakończeniach kolateral, bliżej miejsca powstawania, niż w zakończeniach aksonu, zwłaszcza jeżeli w wyniku drażnienia są szybko uwalniane, i transport nie może zrównoważyć tego procesu.

W odróżnieniu od elastycznej kontroli szybkości syntezy klasycznych neuromediatorów, regulowanej w dużej mierze stężeniem substratów i produktów syntezy w zakończeniu nerwowym [45—47], szybkość syntezy neuropeptydów najprawdopodobniej nie zależy od sytuacji panującej w zakończeniu nerwowym. Gdyby nawet z zakończenia mogły płynąć sygnały regulujące syntezę neuropeptydu w perikarionie, dochodziłyby one najprawdopodobniej drogą wstecznego transportu aksonalnego, a więc bardzo powoli. Szybkość syntezy regulują zapewne sygnały dochodzące z włókien aferentnych [44], ale i w tym wypadku mamy do czynienia z regulacją typu powolnego, gdyż maksymalna szybkość transportu aksonalnego jest rzędu milimetrów na godzinę [48].

IV-2. Działanie receptorowe

Różnice pomiędzy neuropeptydami przynoszącymi informacje przez synapsy a klasycznymi neuromediatorami nie są zasadnicze jeżeli chodzi o ich działanie receptorowe. Wprawdzie receptory neuropeptydów i klasycznych neuromediatorów są różne, i z reguły odpowiedzi przesyłane przez receptory peptydowe są znacznie wolniejsze, a za to długotrwałe, bardzo często współdziałające ze sobą neuromediatory klasyczne i neuropeptydy uruchamiają podobne mechanizmy [49]. Tak np. zarówno acety-

locholina jak luliberyna (LH-RH) hamują szczególnie rodzaj przewodnictwa K^+ zależnego od napięcia, zwanego przewodnictwem M, powodując powstawanie powolnych postsynaptycznych potencjałów pobudzających w zwojach sympatycznych żaby [50, 51]. Należy jednak zauważyć, że o ile powolne działanie acetylocholiny na receptory muskarynowe trwa 30 — 60 s, to późny powolny pobudzający potencjał postsynaptyczny wywołany przez neuropeptyd utrzymuje się przez kilka minut [51].

IV-3. Unieczynnianie

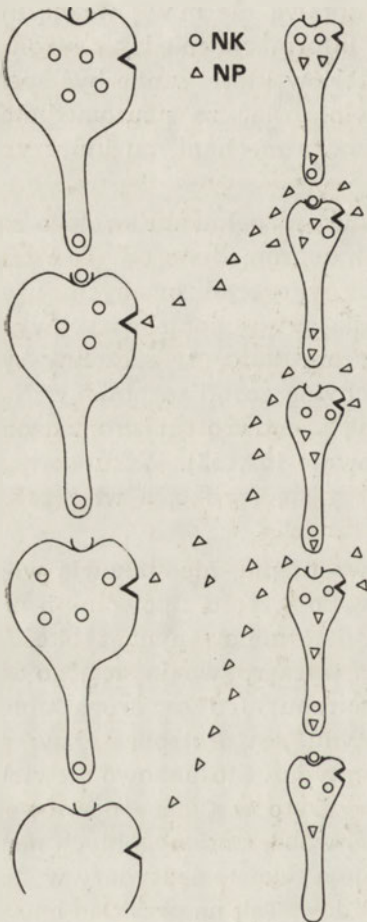
Zakończenie przekazywania sygnału jest sprawą nie mniej ważną niż jego wytworzenie i substancje przekazujące informacje między neuronami muszą ulegać unieczynnieniu. Wśród kryteriów które winne być spełnione, aby substancję chemiczną można było uznać za neuromediator wymienione jest wykazanie istnienia skutecznego mechanizmu unieczynniającego [17].

Losy neuropeptydu po opuszczeniu neuronu i wypełnieniu swojego zadania różnią się zasadniczo od losu klasycznych neuromediatorów. Te ostatnie są szybko unieczynniane poprzez działanie wyspecjalizowanych enzymów, ale przede wszystkim przez bardzo wydajny mechanizm wychwytu zwrotnego, który aktywnie transportuje neuromediator ze szczeliny synaptycznej do zakończenia, z którego przed chwilą został uwolniony. Następnie cząsteczki neuromediatora mogą być z powrotem gromadzone w pęcherzykach synaptycznych i użyte ponownie [52, 53]. Wskutek tego działanie klasycznych neuromediatorów kończy się szybko, a więc przenoszony przez nie bodziec jest krótkotrwały.

Neuropeptydy nie ulegają wychwytowi zwrotnemu, nie stanowią więc „zasobów odnawialnych” i ten właśnie fakt, w połączeniu z powolnym nagromadzaniem się w zakończeniu nerwowym, determinowanym szybkością transportu aksonalnego, może doprowadzić do wyczerpywania się jego zawartości przy długotrwałym pobudzeniu neuronu. Jediną drogą unieczynniania biologicznie aktywnego neuropeptydu jest proteoliza enzymatyczna [30], w wyniku działania endo- i egzopeptydaz. Stosunkowo niewiele z pomiędzy znanych egzo- i endopeptydaz wykryto w tkance nerwowej, i nie wykazano — jak narazie — ich swoistości wobec poszczególnych neuropeptydów [54]. Jednakże wydaje się, że istnieją swoiste peptydazy w stosunku do niektórych przynajmniej neuropeptydów. Tak na przykład opisano „enkefalinazę” — enzym swoiście inaktywujący enkefalinę, którego rozmieszczenie w mózgu pokrywa się z rozmieszczeniem receptorów opioidowych [55]. Jest on związany z frakcją błon synaptosomalnych [56].

Unieczynnianie neuropeptydów przez klasyczne hydrolazy peptydowe nie jest procesem szybkim, zwłaszcza że większość neuropeptydów chroni się przed nimi przez zablokowanie końcowych aminokwasów specjalnymi

grupami, uniemożliwiającymi działanie tych enzymów (grupa acetylowa lub piroglutaminianowa przy końcu N, grupa amidowa przy końcu C) [54]. Ten powolny rozkład neuropeptydów ma dwie ważne konsekwencje: po pierwsze powoduje przedłużone działanie peptydów na receptor (z czym może się wiązać bardzo wysoka aktywność biologiczna peptydu), po drugie zaś, jak to wykazano ostatnio [51], umożliwia „działanie na odległość”: peptyd uwolniony z neuronu może działać nie tylko na neuron, z którym istnieje kontakt synaptyczny, ale i na inne neurony, nie tworzące synaps z neuronem, z którego peptyd jest uwalniany. Działanie tego typu można określić jako działanie parakryne (Ryc. 2).



Ryc. 2. Oddziaływanie między szlakami neuronalnymi poprzez neuropeptydy bez pośrednictwa synaps. Komórki większe syntetyzują tylko jeden typ neuromediatora (neuromediator klasyczny, —NK, (kółka), lecz posiadają dwa typy receptorów: wiążące neuromediator klasyczny oraz neuropeptyd. Receptory neuropeptydowe umieszczone są poza obrębem synapsy. Komórki mniejsze produkują dwa typy nośników informacji: neuromediator klasyczny (kółka) i peptydowy —NP (trójkąty), a na ich błonie znajdują się odpowiednie dwa typy receptorów. Neuromediator peptydowy wyzwolony z zakończeń mniejszych neuronów nie ulega szybko inaktywacji i może na drodze dyfuzji docierać do receptorów umieszczonych na komórkach większych, odległych o parę dziesiątków mikrometrów.

Działanie peptydów w taki właśnie sposób wykazały doświadczenia, które przeprowadzili Jan i Jan [51] badając neurotransmisję w zwojach współczulnych żaby. Neurony sympatyczne i ich włókna przedzwojowe należą u żab do dwóch różnych typów. W IX i X zwoju lędźwiowym żaby większe komórki B wchodzą w kontakt synaptyczny z przedzwojowymi

włóknami B, pochodzącymi z nerwów grzbietowych III, IV i V, podczas gdy mniejsze komórki C tworzą połączenia synaptyczne z włóknami C, pochodzącymi z nerwów VII i VIII. Włókna B zawierają acetylocholinę i po ich pobudzeniu komórki B odpowiadają typową dla nich reakcją cholinergiczną: powolnym pobudzającym potencjałem postsynaptycznym wynikającym z pobudzenia receptora muskarynowego. Drażnienie włókien B nie powoduje żadnych odpowiedzi komórek C, które nie mają z włóknami B kontaktu synaptycznego.

Włókna C zawierają, oprócz acetylocholinę, peptyd bardzo zbliżony budową i działaniem do LH-RH. Pobudzenie tych włókien powoduje w komórkach C odpowiedź o składowej cholinergicznnej oraz o składowej peptydowej: bardzo powolny potencjał pobudzający. Jan i Jan [51] wykryli, że odpowiedź na drażnienie włókien C nie ogranicza się jedynie do komórek C, ale bardzo powolne pobudzenie postsynaptyczne — czystą odpowiedź peptydoergiczną — obserwuje się również w komórkach B. Zjawisko to wyjaśnili oni zakładając, że neuropeptyd uwolniony z zakończeń nerwów C nie ulega szybko degradacji i pozostaje aktywny przez co najmniej 30 s. W tym czasie może on rozprzestrzeniać się na drodze dyfuzji w okolicach miejsca uwolnienia i natrafiwszy na leżące w sąsiedztwie komórek C komórki B powodować ich pobudzenie. Jak się ocenia, peptyd przypominający LH-RH może w zwojach współczulnych żaby pobudzać komórki odległe o kilkadziesiąt mikrometrów od zakończenia, z którego jest uwalniany.

Nie wiadomo jeszcze, czy tego rodzaju sposób przekazywania informacji pomiędzy neuronami jest szerzej rozpowszechniony w układzie nerwowym, ale możliwość taka wydaje się bardzo interesująca. W ten sposób dwa równoległe ale niezależne szlaki nerwowe mogłyby informować się wzajemnie o swojej aktywności, bez konieczności wchodzenia w kontakty synaptyczne.

V. Neuromediatory a neuromodulatory

Ze względu na duże różnice mechanizmów działania klasycznych niskocząsteczkowych neuromediatorów i dużych neuropeptydów, te ostatnie próbowano klasyfikować jako neuromodulatory. Pojęcie neuromodulatora jako substancji pełniącej funkcje informacyjne i wpływającej na neurotransmisję w sposób nieco odmienny od klasycznego neuromediatora było od początku niezbyt dobrze określone, a często wyliczanie warunków, które musi spełniać dana substancja, aby uznać ją za neuromediator lub neuromodulator przynosi więcej zamieszania niż pożytku [57]. W przypadku neuropeptydów usiłuje się mimo tego wciąż rozgraniczyć funkcje neuromodulatora od funkcji neuromediatora, chociaż kryteria wciąż są niejasne [58].

Zdaniem autora tego przeglądu rozróżnianie tego typu jest względne i zależy od tego, któremu rodzajowi przekazu informacji w danym kontekście przypisujemy najważniejszą rolę. Jeżeli ta najważniejsza (dla obserwatora) informacja jest przenoszona poprzez synapsę, nośnik informacji w tej synapsie będzie dla nas neuromediatozem, a zaburzenia informacji przez inne oddziaływania chemiczne nazwiemy neuromodulacją. Tak np. jeżeli przyjmiemy, że w procesach uczenia istotną rolę odgrywa neurotransmisja adrenergiczna, to noradrenalinę będziemy uważać za neuromediator zaangażowany w procesach uczenia się, natomiast wpływ wazopresyny będzie przypisany neuromodulującemu działaniu tego peptydu na neurony noradrenalinowe w obrębie grzbietowego szlaku noradrenergicznego, na który wazopresyna działa presynaptycznie [59]. Można jednak uważać, że to właśnie wazopresyna jest neuromediatozem zaangażowanym w procesach uczenia się i pamięci. W wielu przypadkach neuromodulacja polega na oddziaływaniu presynaptycznym i zmniejszaniu lub zwiększaniu w ten sposób ilości uwalnianego neuromediatora, ale może też polegać na działaniu na błonę postsynaptyczną i zmianie jej wrażliwości na neuromediator, np. poprzez zmiany stopnia jej fosforylacji [60].

VI. Współdziałanie między neuromediatorami klasycznymi i neuropeptydami i ich współistnienie

Współdziałanie pomiędzy różnymi klasami neuromediatorów i neuromodulatorów może polegać bądź na ich zsynchronizowanym działaniu na różne struktury, bądź na równoczesnym działaniu na te same neurony. W tym artykule zajmiemy się przede wszystkim współdziałaniem między neuromediatorami klasycznymi i neuropeptydami uwalnianymi równocześnie i działającymi na ten sam neuron postsynaptyczny.

Wśród licznych poglądów, które musiano zrewidować w wyniku badań nad peptydami, jednym z najważniejszych jest tzw. zasada Dale'a, sformułowana w latach trzydziestych, a dająca się ująć w hasło „jeden neuron — jeden neuromediator” [61]. Zasadę tę próbowali w połowie lat sześćdziesiątych kwestionować *Burn i Rand* [62], wysuwając hipotezę, że noradrenalina i acetylocholina może występować w tych samych neuronach współczulnych, ale wykazanie niesłuszności tej hipotezy [63] umocniło zasadę Dale'a. Wobec tego z dużą ostrożnością i nieufnością przyjęto dane uzyskane przez *Hökfelta* i jego grupę o współistnieniu w pojedynczych neuronach dwóch substancji przekąźnikowych jednocześnie: neuromediatora klasycznego i neuropeptydu [64, 65].

Jeszcze w 1979 r. *Osborne* [66] sugerował, że zasada Dale'a w sformułowaniu *Ecclesa* [61] wydaje się słuszna, wykazując, że wiele danych, dotyczących współistnienia w jednym neuronie dwóch klasycznych neuromediatorów może być, i prawdopodobnie jest, wynikiem niedoskonałości metodycznych. Sugerował też, że wykazanie po raz pierwszy współ-

istnienia neuromediatora klasycznego i neuropeptydu: serotoniny i substancji P przez Chan-Palay i jej współpracowników w 1978 r. [67] może być skutkiem nieswoistego wychwytu serotoniny przez neurony zawierające substancję P. Dyskutując jeszcze w 1976 r. problem współistnienia różnych neuromediatorów w jednym neuronie Burnstock [68] trafnie zauważył, że utrzymujące się przez długi czas „zasady” i modne koncepcje mają olbrzymi hamujący wpływ na postęp naukowy: utalentowani badacze starają się za wszelką cenę, aby ich wyniki zgadzały się z ustalonymi teoriami, naginając ich interpretację a nawet odrzucając dane nie pasujące do modelu jako obarczone błędem technicznym. Dopiero kiedy nowa teoria czy model zostają akceptowane, stare dane nagle w cudowny sposób zaczynają je popierać.

W wyniku prac grupy Lundberga i Hökfelta wiemy obecnie, że współistnienie w jednym neuronie klasycznym neuromediatorów i neuropeptydów jest zjawiskiem częstym, i pary neuromediator — neuropeptyd mogą występować w najróżnorodniejszych neuronach [65]. Tak np. dopamina może występować razem z cholecystokininą (CCK) w komórkach brzusznego obszaru pokrywki (*ventral tegmental area*), a w kłębku szyjnym kota występuje wraz z enkefaliną. Noradrenalina i adrenalina występują w rdzeniu przedłużonym w neuronach zawierających tzw. polipeptydy trzustkowe (APP, BPP oraz NPY), a wspólnie z enkefalinami w rdzeniu nadnerczy. W rdzeniu przedłużonym u szczura serotonina może występować łącznie z substancją P, tyreoliberyną (TRH) lub obydwoema tymi peptydami łącznie, a także z enkefaliną. Acetylocholina w zwojach autonomicznych kota występuje łącznie z naczynioaktywnym peptydem jelitowym (VIP), a we włóknach przedzwojowych z enkefaliną lub neurotensyną. Jak wspomniano uprzednio, w zwojach sympatycznych żaby acetylocholina występuje razem z luliberyną (LHRH), w sercu ropuchy z somatostatyną, zaś w zwoju rzęskowym u ptaków równocześnie z substancją P i enkefaliną. Kwas γ -aminomasłowy (GABA) we wzgórzu u kota występuje wspólnie z somatostatyną, a w mózdzku kota — z motyliną.

Niekiedy współistnienie w jednym neuronie może być jeszcze ściślej: tak np. wykazano, że serotonina i substancja P znajdują się w tych samych pęcherzykach synaptycznych w zakończeniach nerwowych w rogach brzusznych rdzenia [69]. Nie wiadomo jednak jeszcze, czy zjawisko współistnienia neuromediatorów w pęcherzykach synaptycznych jest wyjątkiem, czy raczej regułą. W każdym razie w przypadku takiego współistnienia każdy potencjał czynnościowy wyzwala równocześnie neuromediator i peptyd, który pełni wówczas rolę współmediatora (*contransmitter*).

Współistnienie dwóch neuromediatorów w neuronie i łącznie ich uwalnianie może mieć znaczenie dla funkcji. Tak np. w przypadku substancji P i TRH wykazano, że mogą one potęgować działanie serotoniny, której są współmediatorami. Jest rzeczą interesującą, że synergizm neuropeptydu z serotoniną opiera się w tych dwóch przypadkach na odmiennym mecha-

nizmie: TRH wydaje się działać na postsynaptyczny receptor serotoninowy [70], podczas gdy substancja P blokuje autoreceptor serotoninowy, znośząc w ten sposób hamowanie uwalniania serotoniny [71]. Wydaje się, że w tych neuronach, które zawierają łącznie serotoninę, TRH i substancję P działanie tej pierwszej może być szczególnie silnie potęgowane. Warto przy tym zauważyć, że zarówno substancji P jak i serotoninie przypisywano istotne znaczenie przy przewodzeniu bodźców bólowych. Jak widać, spór o to, która z tych substancji jest ważniejsza w tym aspekcie może być bezpodstawny, jeżeli obie są wydzielane jednocześnie. Należy przy tym dodać, że substancja P wydaje się wykazywać cechy typowego neuromediatora, analogiczne do właściwości neuromediatorów klasycznych [72].

Innym interesującym przykładem współdziałania i współlistnienia neuromediatorów może być dopamina i CCK, których łączną obecność wykazano w niektórych neuronach w układzie mezolimbicznym [73]. Badania elektrofizjologiczne wykazały, że CCK zwiększa aktywność neuronów dopaminergicznych [74], ale również wydaje się zmniejszać gęstość receptorów dopaminowych [75] i obniżyć obrót dopaminy w niektórych neuronach dopaminergicznych w jądrze półleżącym przegrody oraz w prążkowie [76]. Badania behawioralne wykazały, że działanie fragmentu cholecystokininy CCK-8 (wykazującego działanie podobne do macierzystej CCK) i pokrewnych jej peptydów przypomina działanie neuroleptyków [77]. Wykazano też, że chroniczne podawanie neuroleptyków powoduje zmiany zawartości CCK-8 w mózgu: spadki w korze mózgowej a wzrosty w prążkowie i układzie mezolimbicznym [78]. Te wszystkie obserwacje sugerują, że CCK może regulować funkcje niektórych neuronów dopaminowych, a zaburzenia tej regulacji mogą leżeć u podstaw schizofrenii [64, 77].

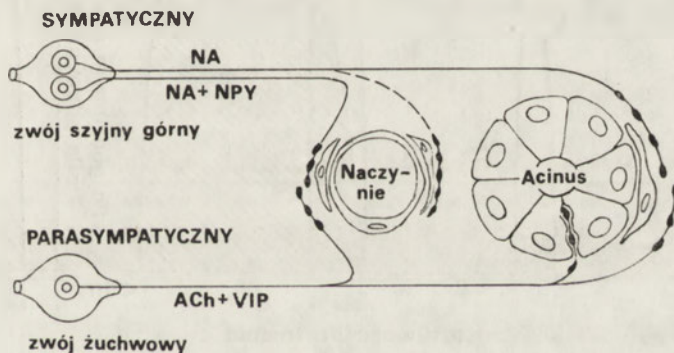
Jedną z ciekawszych, zdaniem autora, obserwacji jest wpływ neuropeptydów na gęstość receptorów klasycznego neuromediatora. W przypadku CCK i dopaminy sugerowano, że wytworzenie kompleksu CCK z własnym swoistym receptorem zmienia płynność błony komórkowej i utrudnia przechodzenie na powierzchnię błony receptorów dopaminowych uwięzionych we wnętrzu komórki [75]. We własnych doświadczeniach wykazaliśmy, że agonista receptora opiatowego, morfina, również obniża gęstość receptorów dopaminowych w prążkowie [79]. Innym przykładem zmian receptorowych wywołanych przez neuropeptydy jest zwiększenie gęstości receptora α_2 -adrenergicznego przez NPY, peptyd związany z neuronami noradrenergicznymi i adrenergicznymi [80].

Bardzo instruktynym przykładem współdziałania klasycznych neuromediatorów i neuropeptydów jest regulacja czynności ślinianki kota, omówiona szczegółowo przez Lundberga i Hökfelta [65]. Zarówno naczynia, jak i komórki gruczołowe (acinarne) unerwiane są przez nerwy przywspółczulne, których aktywacja powoduje równoczesny wzrost wydzielania śliny i przepływu krwi przez śliniankę, oraz przez nerwy

współczulne, z górnego zwoju szyjnego, które powodują równoczesny wzrost wydzielania śliny i zwężenie naczyń w gruczole. Wykazano, że w nerwach przywspółczulnych współlistnieją acetylocholina i VIP, zaś w nerwach współczulnych poza noradrenaliną, występującą we wszystkich zakończeniach, w niektórych obecny jest jeszcze neuropeptyd Y (NPY).

Acetylocholina powoduje pobudzenie funkcji wydzielniczych ślinianki, VIP natomiast bardzo silnie rozszerza naczynia krwionośne. Już to samo działanie VIP nasila wybitnie ogólny efekt acetylocholiny, ale ponadto okazało się, że VIP zwiększa też powinowactwo acetylocholiny do receptora muskarynowego [81]. Co więcej, wykazano, że postsynaptyczne działanie VIP (zwiększenie zawartości drugiego mediatora, cyklicznego AMP) jest silniejsze wówczas, gdy receptor muskarynowy jest pobudzony [82]. Jak widać, komplementarne działanie VIP i acetylocholiny można zauważyć zarówno na poziomie systemowym (zwiększenie ukrwienia narządu — zwiększenie wydzielania śliny), jak i receptorowym.

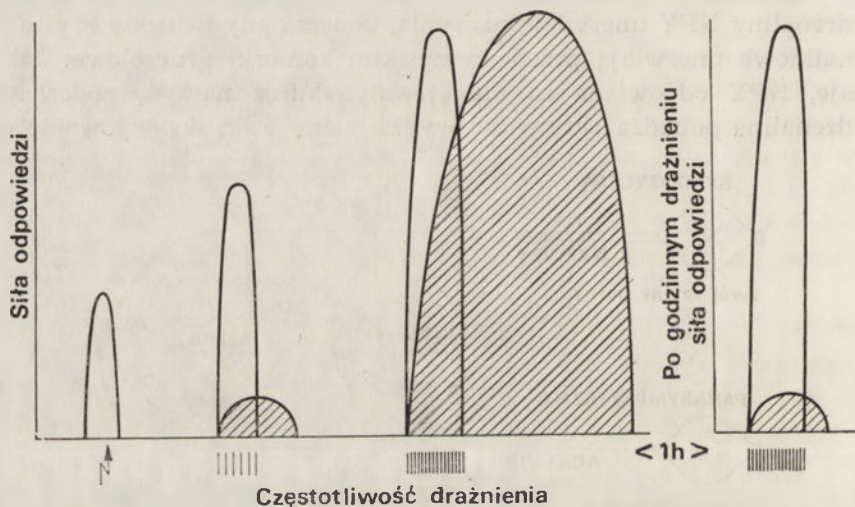
Nieco mniej wiemy o współdziałaniu noradrenaliny i NPY w nerwach współczulnych dochodzących do ślinianki. Neurony zawierają oprócz noradrenaliny NPY unerwiają naczynia, podczas gdy neurony czysto noradrenalinowe unerwiają przede wszystkim komórki gruczolowe. Jak się wydaje, NPY odpowiada za długotrwały skurcz naczyń, podczas gdy noradrenalina pobudza aktywność wydzielniczą. Fakt występowania obok



Ryc. 3. Regulacja aktywności ślinianki kota przez układ autonomiczny. Neurony wychodzące z sympatycznego zwoju szyjnego górnego zawierają noradrenalinę (NA), a część z nich zawiera ponadto NPY. Neurony zawierające wyłącznie NA unerwiają komórki gruczolowe (acinarne), neurony zawierające NA+NPY unerwiają naczynia, powodując ich skurcz. Neurony wychodzące z parasympatycznego zwoju żuchwowego zawierają acetylocholinę (ACh) i VIP: ACh działa przede wszystkim wzmagając czynność komórek wydzielniczych, VIP — rozszerzając naczynia krwionośne. Niezależnie od tego, że będzie to powodować efekt synergistyczny, zwiększając produkcję śliny, na poziomie współdziałania między narządami (naczynie — gruczoł), ACh i VIP potęgują wzajemnie swoje działania również na poziomie receptorowym: w obecności jednego związku, drugi działa silniej na własny receptor. Wg. Lundberga i Hökfelta [65].

siebie neuronów noradrenalinowych zawierających i nie zawierających NPY może tłumaczyć, dlaczego w pewnych przypadkach uzyskuje się wzmożone wydzielanie śliny przez podrażnienie nerwów współczulnych bez równoczesnego zwężenia naczyń krwionośnych (Ryc. 3).

Znaczenie współistnienia neuromediatorów nie jest jeszcze w pełni zrozumiałe, a jak wykazują nasze rozważania efekty współdziałania neuromediatorów klasycznych i neuropeptydów są złożone. Warto zwrócić tutaj uwagę na jeszcze jeden aspekt tego zagadnienia: neuropeptydy są najskuteczniej uwalniane dopiero przez bodźce działające seriami o dużej częstotliwości, podczas gdy neuromediatorzy klasyczne uwalnia już pojedynczy potencjał czynnościowy [65]. To, oraz fakt, że bardzo często klasyczny neuromediator i współistniejący z nim neuropeptyd powodują efekt o tym samym kierunku, z tym, że efekt neuropeptydu jest bardziej długotrwały, powoduje, że charakter odpowiedzi narządu efektorowego znacznie się zmienia w zależności od częstotliwości drażnienia: im częstość ta jest wyższa, tym większa w odpowiedzi jest składowa peptydowa, a zatem efekt — bardziej przedłużony. Dotyczy to oczywiście tylko tych sy-



Ryc. 4. Składowa „neuromediatorowa” i „neuropeptydowa” w odpowiedzi na drażnienie w zależności od częstotliwości i czasu drażnienia. Drażnienie impulsem pojedynczym wyzwała prawie wyłącznie neuromediator klasyczny, powodujący odpowiedź krótkotrwałą. Drażnienie bodźcami o niskiej częstotliwości powoduje zarówno wyzwalanie neuromediatora klasycznego (w ilościach większych niż po bodźcu pojedynczym), jak i uwalnianie pewnych ilości neuropeptydu, powodującego odpowiedź przedłużoną (pole zakreskowane). Przy wysokich częstotliwościach drażnienia wyzwała się zarówno dużo neuromediatora, jak i neuropeptydu i w odpowiedzi przeważa długotrwała składowa „neuropeptydowa”. Gdy drażnienie wysokimi częstotliwościami trwa bardzo długo, zapasy neuropeptydu wyczerpują się, podczas gdy zapasy neuromediatora klasycznego, uzupełniane w wyniku wychwyty zwrotnego, nie zmieniają się. W odpowiedzi przeważa składowa „neuromediatorowa”. Zmodyfikowane wg Lundberga i Hökfelta [65].

tuacji, w których neuromediator klasyczny jest, choćby częściowo, uwalniany niezależnie od neuropeptydu. Gdy stymulacja przedłuża się następują dalsze zmiany, wynikające ze spadku zawartości neuropeptydu. Obserwowano np., że po godzinnym drażnieniu nerwu przywspółczulnego ślinianki zawartość VIP w nerwie spadała poniżej połowy poziomu kontrolnego [65]. Dalsze badania powinny wykazać, jakie to ma znaczenie dla prawidłowej funkcji neuronu (Ryc. 4).

VII. Ewolucja poglądów na mechanizmy porozumiewania się neuronów

Odkrycie neuropeptydów i ich roli w neurotransmisji w zasadniczy sposób zmieniło, wzbogaciło ale i skomplikowało nasze poglądy na mechanizmy przepływu informacji między neuronami. Widać to zwłaszcza na przykładzie ewolucji naszego pojmowania neurotransmisji chemicznej. Jej początkowy obraz był prosty. Zgodnie z tym, co postulował Dale [83], a Eccles i wsp. [61] sformułowali następnie jako „zasadę Dale’a”, aferentny neuron wytwarza i uwalnia ze wszystkich swoich zakończeń tylko jeden neuromediator, który działa na swoiste receptory, ułatwiając lub utrudniając wytworzenie potencjału czynnościowego w następnym neuronie. Sądzono początkowo, że każdy neuromediator działa tylko na jeden typ receptora; wyjątkiem była acetylocholina, której różnorodne efekty wyjaśnił Dale [84] przyjmując, że pobudza ona dwa typy receptorów: receptory muskarynowe i nikotynowe.

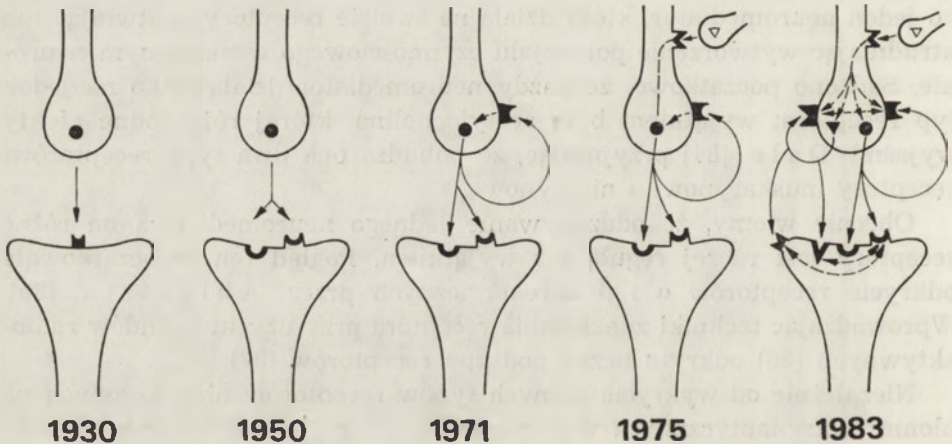
Obecnie wiemy, że oddziaływanie jednego neuromediatora na różne receptory jest raczej regułą niż wyjątkiem. Pogląd ten zapoczątkowało odkrycie receptorów α i β adrenergicznych przez Ahlquist [85]. Wprowadzając techniki znakowania receptora przy użyciu ligandów radioaktywnych [86] odkryto liczne podtypy receptorów [87].

Niezależnie od wykrycia różnych typów receptorów umieszczonych na błonie postsynaptycznej, a więc regulujących czynność neuronu eferentnego, wykazano receptory umieszczone na tym neuronie, z którego neuromediator jest uwalniany. W 1971 r., badając regulację uwalniania noradrenaliny z zakończeń nerwowych, cztery niezależne od siebie zespoły doszły do wniosku, że mechanizmy regulacyjne można zadawałajaco wytłumaczyć zakładając istnienie receptorowych struktur presynaptycznych pobudzanych przez własny neuromediator i hamujących jego uwalnianie [88—91]. Nazwano je autoreceptorami [92].

Odkrycie neuropeptydów zwraca uwagę na inny jeszcze typ regulacji presynaptycznej uwalniania neuromediatora: neuromodulację poprzez działanie na receptory presynaptyczne wrażliwe na substancje czynne uwalniane przez inne neurony a nie na uwalniany neuromediator. W odróżnieniu od regulacji przez autoreceptor, tego rodzaju regulacja nie opiera się na bezpośrednim sprzężeniu zwrotnym. Tak działającymi neuromo-

dulatorami są przeważnie neuropeptydy. Pierwszym opisanym przypadkiem presynaptycznej regulacji uwalniania neuromediatora klasycznego przez neuropeptyd było nasilenie uwalniania noradrenaliny przez angiotensynę [93]. Szczegółowy przegląd stanu wiedzy na temat regulacji presynaptycznej uwalniania noradrenaliny w połowie lat siedemdziesiątych daje jeden z twórców koncepcji autoreceptora, Starke [94]. Należy podkreślić, że modulacja presynaptyczna jest nowym typem przekazywania informacji: zamiast modulacji działania neuronów przez regulację częstotliwości występowania potencjału czynnościowego moduluje się efekt tego potencjału bezpośrednio przed położeniem go na język informacji chemicznej.

Wreszcie obecnie okazało się, że jeden neuron może zawierać różne nośniki informacji chemicznej, mogące działać na różne receptory i autoreceptory, oddziaływać ze sobą, prowadzić do skoordynowanych efektów w neuronach postsynaptycznych i całych unerwianych systemach [65]. Historię ewolucji naszych wyobrażeń o neurotransmisji chemicznej podaje schematycznie rycina 5.



Ryc. 5. Ewolucja poglądów na przekazywanie informacji w synapsie chemicznej. W r. 1930 sądzono, że klasyczny neuromediator (czarne kółko) łączy się z receptorem określonego typu (półkoliste zagłębienie). Później (1950 r.) sądzono, że neuromediator może łączyć się z kilku różnymi receptorami, postsynaptycznymi, a jeszcze później wykazano, że może się on też łączyć z receptorem umieszczonym na neuronie, z którego neuromediator jest uwalniany z autoreceptorem (1971 r.). W r. 1975 stwierdzono, że działanie neuronu może być kontrolowane przez synapsy akso-aksonalne, w których uwalniany jest neuromediator peptydowy (pusty trójkąt), działający na odpowiedni receptor presynaptyczny, nie będący autoreceptorem (trójkątne zagłębienie). Stan na rok 1983: dodatkowo do neuromediatora i regulacji presynaptycznej poznano współistniejące z neuromediatoem klasycznym neuropeptydy (czarny trójkąt), które mogą działać na odpowiednie receptory postsynaptyczne i presynaptyczne (autoreceptor peptydowy). Ponadto poszczególne typy receptorów presynaptycznych i postsynaptycznych mogą na siebie oddziaływać wzajemnie, modyfikując swoją gęstość lub reaktywność.

Jeżeli dodamy do tego, że — jak wspomniano — pewne populacje receptorowe mogą prawdopodobnie działać bezpośrednio na inne populacje, że wyzwalanie neuropeptydu może zależeć zarówno od geometrii neuronu jak i intensywności jego stymulacji nawet przy zachowaniu bez zmian elektrycznej aktywności neuronu, musimy stwierdzić, że złożoność informacji, jaka może być przekazywana między neuronami jest tak olbrzymia, że można się zastanawiać, czy jej pełny opis będzie możliwy, a zwłaszcza zrozumiały.

Poznanie roli i pewnych mechanizmów działania neuropeptydów wzbogaciło nasz obraz neurotransmisji chemicznej, pokazując, jak subtelnie może ona być modulowana. Zdaniem autora pozwala ona również zaproponować ogólne spojrzenie na cały system przekazu informacji w ustroju zwierzęcym (Tabela 1).

Tabela 1

Systemy przenoszenia informacji w ustroju zwierzęcym

Typ przenoszenia	Rząd czasu	Nośnik informacji	System nadawczo-odbiorczy	Odbiorca informacji
Błyskawiczny	0.1 ms	Bodziec elektryczny	Synapsa elektryczna	Neuron eferentny lub aferentny*
Szybki	ms	Klasyczny neuromediator	Synapsa chemiczna	Neuron eferentny
Średnio szybki	s.	Neuropeptyd	Synapsa chemiczna	Neuron eferentny
Powolny	min.	Neuropeptyd	Neuron — receptor: dyfuzja w tkance	Sąsiadujące, nie połączone neurony
Bardzo powolny	h**	Neurohormon lub hormon	Neuron/Gruczoł — receptor: dyfuzja z krwią	Odległe narządy

* Synapsa nie spolaryzowana. Możliwość przekazywania w obie strony

** W niektórych przypadkach odpowiedzi mogą pojawić się już po upływie ułamka minuty, w innych niekiedy dopiero po dniach i tygodniach

Jak przedstawiono w tabeli, typy informacji przekazywanych pomiędzy poszczególnymi częściami organizmu można podzielić w zależności od szybkości przekazu, przy czym im informacja przekazywana jest szybciej, tym jest ona uboższa i zarazem trudniejsza do modulacji. W schemacie tym neuropeptydy zajmują bardzo istotne miejsce, wypełniając lukę pomiędzy klasycznymi neuromediatorami i hormonami, jako nośniki złożonych informacji, przenoszonych z pośrednimi szybkościami.

Zaakceptowano do druku 20 lutego 1985 r.

PIŚMIENICTWO

1. Lewandowsky M., (1898), *Zentbl. Physiol.*, **12**, 599—600.
2. Langley J. N., (1901), *J. Physiol.* (London), **27**, 237—256.
3. Elliot T. R., (1904), *J. Physiol.* (London), **31**, XX—XXI.
4. Elliot T. R., (1905), *J. Physiol.* (London), **32**, 401—467.
5. Loewi O., (1921), *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **189**, 239—242.
6. Cannon W. B., Uridil J. E., (1921), *Am. J. Physiol.*, **58**, 353—364.
7. Loewi O., Navratil E., (1926), *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **214**, 678—688.
8. Feldberg W., Krayner O., (1933), *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, **172**, 170—193.
9. Loewi O., (1936), *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **237**, 504—514.
10. von Euler U. S., (1946), *Acta Physiol. Scand.*, **12**, 73—97.
11. von Euler U. S., (1948), *Acta Physiol. Scand.*, **16**, 63—74.
12. Twarog B. M., Page I. H., (1953), *Am. J. Physiol.*, **175**, 157—161.
13. Amin A. H., Crawford T. B. B., Gaddum J. H., (1954), *J. Physiol.* (London), **126**, 596—618.
14. Montagu K. R., (1957), *Nature*, **150**, 244—245.
15. Weil-Malherbe H., Bone A. D., (1957), *Nature*, **180**, 1050—1051.
16. Curtis D. R., Watkins J. C., (1960), *J. Neurochem.*, **6**, 117—141.
17. Abel E. L. (1974), *Drugs and Behavior: A Primer in Neuropsychopharmacology*, str. 25—27, Wiley Interscience, New York.
18. Epstein A. N., Fitzsimons J. T., Rolls B. J., (1970), *J. Physiol.* (London), **210**, 457—474.
19. Nicoll R. A., Barker J. L., (1971), *Brain Res.*, **35**, 501—511.
20. Konishi S., Otsuka M., (1974), *Brain Res.*, **65**, 397—410.
21. Renaud L. P., Martin J. B., Brazeau P., (1975), *Nature*, **255**, 233—235.
22. Nicoll R. A., Barker J. L., (1971), *Nature New Biol.*, **233**, 172—174.
23. Barker J. L., Gainer H., (1974), *Science*, **184**, 1371—1373.
24. Speidel C. C., (1919), *Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 13*, 1—31.
25. Scharer E., (1928), *Z. Vgl. Physiol.*, **7**, 1—38.
26. Scharer E., Scharer B., (1940), *Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, **20**, 170—194.
27. Acher R., (1981), *Trends Neurosci.*, **4**, 225—229.
28. Le Roith D., Shiloah J., Roth J., Lesniak M. A., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 6184—6188.
29. Snyder S. H., (1980), *Science*, **209**, 976—983.
30. Krieger D. T., Martin J. B., (1981), *N. Engl. J. Med.*, **304**, 876—885.
31. Krieger D. T., Martin J. B., (1981), *N. Engl. J. Med.*, **304**, 944—951.
32. Iversen L. L., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 293—294.
33. Douglas W. W., (1968), *Brit. J. Pharmacol.*, **34**, 451—474.
34. Margolis F. L., (1974), *Science*, **184**, 909—911.
35. Takagi H., Shiomi H., Ueda H., Amano H., (1979), *Eur. J. Pharmacol.*, **55**, 109—111.
36. Scheller R. H., Rothman B. S., Mayeri E., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 340—345.
37. Kravitz E. A., Belz B. S., Glusman S., Goy M. F., Harris-Warwick R. M., Johnston M. F., Livingstone M. S., Schwarz T. L., Siwicki K. K., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 345—349.
38. Dockray G. J., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 2295—2301.

39. Reichelt K. L., Edminson P. D., (1977), w: Peptides in Neurobiology, red. Gainer H., str. 171—219; Plenum Press, New York—London.
40. Kurahashi K., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 445—459.
41. Sano I., (1970), *Int. Rev. Biol.*, **12**, 253—263.
42. Reichlin S., Saperstein R., Jackson I. M. D., Boyd A. E., Patel Y., (1976), *Ann. Rev. Physiol.*, **38**, 389—424.
43. Gainer H., Loh Y. P., Sarne Y., (1977), w: Peptides in Neurobiology, red. Gainer H., str. 183—219; Plenum Press, New York—London.
44. Swanson L. W., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 294—295.
45. Neff N. H., Costa E., (1966), *Life Sci.*, **5**, 951—959.
46. Spector S., Gordon R., Sjoerdsma A., Udenfriend S., (1967), *Molec. Pharmacol.*, **3**, 549—555.
47. Glowinski J., Hamon M., Héry F., (1973), w: New Concepts in Neurotransmitter Regulation, red. Mandell A. J., str. 239—257; Plenum Press, New York—London.
48. Livett B. G., Geffen L. B., Austin L., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 931—939.
49. Siegelbaum S. A., Tsien R. W., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 307—313.
50. Brown D. A., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 302—307.
51. Jan Y. N., Jan L. Y., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 320—325.
52. Iversen L. L., (1967), *The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves*, Cambridge University Press, London.
53. Iversen L. L., (1972), w: Perspectives in Neuropharmacology, red. Snyder S. H., str. 75—111; Oxford University Press, New York.
54. Marks N., (1977), w: Peptides in Neurobiology, red. Gainer H., str. 221—258, Plenum Press, New York—London.
55. Schwartz J. C., De la Baume S., Malfroy B., Patey G., Perdri-sot R., Swerts J. P., Fournié-Zaluski M. C., Gacel G., Roques B. P., (1980), *Adv. Biochem. Pharmacol.*, **22** (Neural Peptides and Neuronal Communication), 219—235.
56. De la Baume S., Patey G., Schwartz J. C., (1981), *Neuroscience*, **6**, 315—321.
57. Butcher L. L., Woolf N. J., (1982), *Progr. Brain Res.*, **55**, 3—40.
58. Reanud L. P., (1978), w: Psychopharmacology; A Generation of Progress, red. Lipton M. A., DiMascio A., Killam K. F., str. 423—430; Raven Press, New York.
59. Bohus B., Conti L., Kovács G. L., Versteeg D. H. G., (1982), w: Neuronal Plasticity and Memory Formation, red. Ajmone Marsan C., Matthies H., str. 75—87; Raven Press, New York.
60. Bär P. R., Jolles J., Oestreicher A. B., Zwiers H., Van Someren H., Schotman P., Gispen W. H., (1982), w: Neuronal Plasticity and Memory Formation, red. Ajmone Marsan C., Matthies H., str. 123—136; Raven Press, New York.
61. Eccles J. C., Fatt P., Koketsu K., (1954), *J. Physiol. (London)*, **216**, 524—562.
62. Burn J. H., Rand M. J., (1965), *Ann. Rev. Pharmacol.*, **5**, 163—182.
63. Kosterlitz H. W., Lees G. M., (1972), *Handb. Exp. Pharmacol.*, **33**, (Catecholamines), 762—812.
64. Hökfelt T., Johansson O., Ljungdahl A., Lundberg J. M., Schultzberg M., (1980), *Nature*, **284**, 515—521.
65. Lundberg J. M., Hökfelt T., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 325—333.

66. Osborne N. N., (1979), *Trends Neurosci.*, 2, 73—75.
67. Chan-Palay V., Jonsson G., Palay S. L., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 1582—1586.
68. Burnstock G., (1976), *Neuroscience*, 1, 239—248.
69. Pelletier G., Steinbusch H. W., Verhofstad A., (1981), *Nature*, 293, 71—72.
70. Barbeau H., Bedard P., (1981), *Neuropharmacology*, 20, 477—481.
71. Mitchell R., Fleetwood-Walker S., (1981), *Eur. J. Pharmacol.*, 76, 119—120.
72. Otsuka M., Konishi S., (1983), *Trends Neurosci.*, 6, 317—320.
73. Hökfelt T., Rehfeld J. F., Skirboll L., Ivemark B., Goldstein M., Markey K., (1980), *Nature*, 285, 476—478.
74. Skirboll L. R., Grace A. A., Hommer D. W., Rehfeld J., Goldstein M., Hökfelt T., Bunney B. S., (1981), *Neuroscience*, 6, 2111—2124.
75. Fuxe K., Agnati L. F., Köhler C., Kuonen D., Ögren S. O., Andersson K., Hökfelt T., (1981), *J. Neural. Transm.*, 51, 3—37.
76. Fuxe K., Andersson K., Locatelli V., Agnati L. F., Hökfelt T., Skirboll L., Mutt V., (1980), *Eur. J. Pharmacol.*, 67, 329—331.
77. Van Ree J. M., Gaffori O., De Wied D., (1983), *Eur. J. Pharmacol.*, 93, 63—78.
78. Frey P., (1983), *Eur. J. Pharmacol.*, 95, 87—92.
79. Golembiowska-Nikitin K., Pilc A., Vetulani J., (1982), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 319, 140—141.
80. Emson P. C., De Quidt M. E., (1984), *Trends Neurosci.*, 7, 31—35.
81. Lundberg J. M., Hedlund B., Bartfai T., (1982), *Nature*, 295, 147—149.
82. Fredholm B., Lundberg J. M., (1982), *Acta Physiol. Scand.*, 114, 157—159.
83. Dale H. H., (1935), *Proc. Roy. Soc. Med.*, 28, 319—332.
84. Dale H. H., (1914), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6, 147—190.
85. Ahlquist R. P., (1948), *Am. J. Physiol.*, 153, 586—600.
86. Vetulani J., (1983), w: *Nowe Metody w Badaniach Mózgu*, red. Żernicki B., str. 81—105; Ossolineum, Warszawa.
87. Snyder S. H., (1980), *J. Neurochem.*, 35, 5—15.
88. Farnebo L. O., Hamberger B., (1971), *Br. J. Pharmacol.*, 43, 97—106.
89. Kirkepar S. M., Puig M., (1971), *Br. J. Pharmacol.*, 43, 359—369.
90. Langer S. Z., Adler E., Enero M. A., Stefano F. J. E., (1971), *Proc. XXV Int. Congr. Physiol. Sci.*, Munich, str. 335.
91. Starke K., (1971), *Naturwissenschaften*, 58, 420.
92. Langer S. Z., (1974), *Biochem. Pharmacol.*, 23, 1793—1800.
93. Zimmerman B. G., Whitmore L., (1967), *Int. J. Neuropharmacol.*, 6, 27—33.
94. Starke K., (1977), *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 77, 1—124.

GOTFRYD KUPRYSZEWSKI *)

Chemiczna struktura neuropeptydów

Chemical structure of neuropeptides

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Oksytocyna i wazopresyna
- III. Proopiomelanokortyna i peptydy pokrewne
- IV. Peptydy opioidowe
 - IV-1. Proenkefaliny i peptydy pokrewne
 - IV-2. Prekursor β -neoendorfiny/dynorfiny i peptydy pokrewne
 - IV-3. Pozostałe peptydy opioidowe
- V. Peptydy przewodu pokarmowego
 - V-1. Glukagon i peptydy pokrewne
 - V-2. Peptyd działający na unerwienie jelit i peptydy pokrewne
 - V-3. Pozostałe peptydy przewodu pokarmowego
- VI. Kininy i peptydy pokrewne
 - VI-1. Kininy plazmy
 - VI-2. Bombesyna i peptydy pokrewne
 - VI-3. Tachykininy
 - VI-4. Angiotensyna
- VII. Peptydy regulujące metabolizm wapnia
- VIII. Czynniki uwalniające i hamujące
- IX. Pozostałe neuropeptydy
- X. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Oxytocin and vasopressin
- III. Proopiomelanocortin and related peptides
- IV. Opioid peptides
 - IV-1. Proenkephalins and related peptides
 - IV-2. β -Neo-endorphin/dynorphin precursor and related peptides
 - IV-3. Miscellaneous opioid peptides
- V. Intestinal peptides

*) Prof. dr hab., Instytut Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk.

Skróty stosowane w tekście są zgodne z postanowieniami Komisji Nomenklatury IUPAC-IUB: IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, (1984) Eur. J. Biochem., 138, 9—37.

- V-1. Glucagon and related peptides
- V-2. Vasoactive intestinal peptide and related peptides
- V-3. Miscellaneous intestinal peptides
- VI. Kinin-like peptides
 - VI-1. Plasma kinin peptides
 - VI-2. Bombesin and related peptides
 - VI-3. Tachykinin-like peptides
 - VI-4. Angiotensin
- VII. Calcium metabolism regulatory peptides
- VIII. Releasing and inhibiting factors
- IX. Miscellaneous neuropeptides
- X. Concluding remarks

I. Wstęp

W ostatnich latach utrwalił się pogląd, iż peptydy odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. Poznane już od dawna neurotransmitery o niskiej masie cząsteczkowej takie jak acetylocholina, kwas γ -aminomasłowy, glicyna a także serotonina oraz noradrenalina, wywierają w neuronach określone oddziaływania za pośrednictwem receptorów znajdujących się w błonach postsynaptycznych lub presynaptycznych. Większość z tych oddziaływań pociąga za sobą zmiany w kanałach jonowych, które wpływają z kolei na potencjały błon komórkowych oraz na komórkową pobudliwość elektryczną. Niektóre z neurotransmiterów jak na przykład dopamina, wywierają oddziaływania poprzez aktywację cykazy adenyłowej związanej z błoną komórkową. Mechanizmy działania peptydów w neuronach są znacznie słabiej poznane. Uważa się, iż szereg peptydów spełnia funkcję neurotransmiterów oraz neuromodulatorów. Peptydy wywierają oddziaływania, w których najprawdopodobniej pośredniczą specyficzne receptory (na przykład receptory endogennych peptydów opioidowych) oraz cykaza adenyłowa. Należy także spodziewać się innych efektów na poziomie komórkowym. Wydaje się, że niektóre z tych efektów odgrywają ważną rolę w regeneracji systemu nerwowego. Szereg danych wskazuje na wpływ niektórych peptydów na procesy motywacyjne i skupiania uwagi oraz na proces zapamiętywania [1].

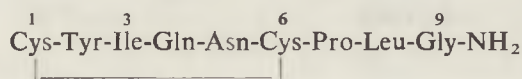
Wprowadzenie metod radioimmunologicznych i pokrewnych pozwoliło na wykrycie obecności a także określenie zawartości szeregu peptydów w poszczególnych częściach ośrodkowego układu nerwowego. Okazało się, że poza peptydami, których występowanie i biosynteza w ośrodkowym układzie nerwowym znane były już od lat, wykryto tam szereg peptydów znanych dotychczas z występowania w innych częściach organizmu (na przykład hormony przewodu pokarmowego). Dotychczas w ośrodkowym układzie nerwowym stwierdzono obecność kilkudziesięciu peptydów, które zaliczone zostały do grupy neuropeptydów.

W niniejszym artykule omówione zostały pierwszorzędowe struktury większości z poznanych dotychczas neuropeptydów. Poszczególne neuropeptydy zostały zgrupowane bądź na zasadzie pokrewieństwa strukturalnego, bądź też na zasadzie pochodzenia od wspólnego prekursora. W artykule nie zostały natomiast omówione biologicznie czynne analogi neuropeptydów uzyskane na drodze chemicznej syntezy.

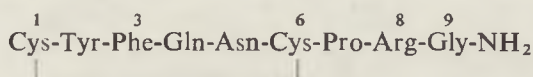
II. Oksytocyna i wazopresyna

Oksytocyna i wazopresyna [2,3] są neuropeptydami, których chemiczna struktura została najwcześniej poznana. W latach 1953—1955 nie tylko ustalono strukturę tych hormonów lecz także przeprowadzono ich chemiczną syntezę. Wbrew powszechnie przyjętej nazwie „hormony tylnego płata przysadki” biosynteza prekursorów zarówno oksytocyny jak i wazopresyny zachodzi w podwzgórzu ssaków, skąd przemieszczają się do tylnego płata przysadki. Sekwencję reszt aminokwasowych prekursora wazopresyny opublikowano w 1982 roku [4] zaś rok później podano sekwencję prekursora oksytocyny [5]. Cząsteczki obydwu białek zawierają po około 160 reszt aminokwasowych. Zarówno oksytocyna jak i wazopresyna są amidami 9-peptydów^{*)}, w cząsteczkach których występuje jeden mostek disiarczkowy utworzony przez reszty L-cysteiny w pozycjach 1 i 6.

Oksytocyna:



Wazopresyna argininowa:



Oksytocyna wywołuje skurcze mięśni gładkich macicy podczas porodu oraz laktację w okresie karmienia. Oksytocyna wykazuje również w niewielkim stopniu właściwości wazopresyny: 0,5% jej aktywności antydiuretycznej oraz 1% aktywności presyjnej.

Cząsteczka arginylo-wazopresyny różni się od oksytocyny tym, że w pozycji 3 zamiast reszty L-izoleucyny występuje reszta L-feniloalaniny zaś w pozycji 8 zamiast L-leucyny reszta L-argininy. Wazopresyna wykazuje działanie antydiuretyczne, które polega na resorpcji wody, w związku z czym wzrasta stężenie soli w moczu. Działa ona także presyjnie powodując zwężenie tętniczek i naczyń włoskowatych oraz pobudza układ

^{*)}Wprowadzony przez M. Bodanszky'ego skrócony sposób zapisu liczby reszt aminokwasowych w cząsteczce peptydu.

mięśni gładkich jelita cienkiego. Wazopresyna ma także działanie oksytyczne: 3⁰/o powodowanego przez oksytocynę skurczu mięśni gładkich macicy oraz 15⁰/o laktacji. W ostatnich latach pojawiło się szereg doniesień wskazujących na wpływ wazopresyny na proces uczenia się i zapamiętywania [1].

U świni i hipopotama zamiast argininowej wazopresyny występuje wazapresyna lizynowa, której cząsteczka w pozycji 8 zamiast L-argininy zawiera resztę L₂-lizyny:

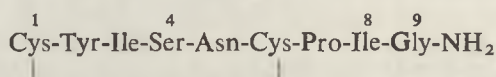


Z obu omawianymi neuropeptydami ewolucyjnie spokrewniona jest wazotocyna:

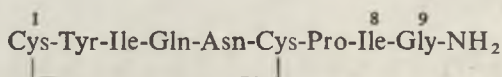


Cząsteczka wazotocyny zawiera w pozycji 3 resztę L-izoleucyny (jak oksytocyna) zaś w pozycji 8 resztę L-argininy (jak arginowa wazopresyna). Wazotocyna reguluje metabolizm wody i soli mineralnych u niższych kręgowców.

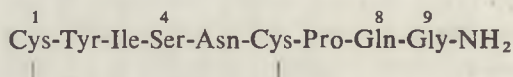
Znanych jest jeszcze szereg innych związków ewolucyjnie spokrewnionych z oksytocyną i wazopresyną. Należy do nich: izotocyna



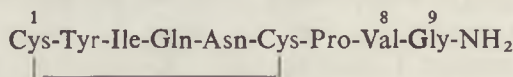
mezotocyna



glumitocyna



walitocyna



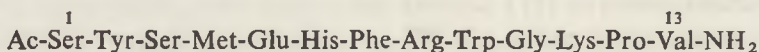
aspartocyna



W ciągu ewolucji struktura przedstawionych hormonów uległa stosunkowo niewielkim zmianom.

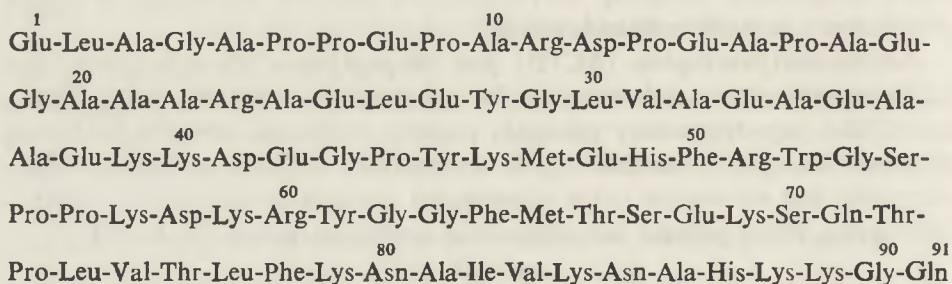
jak ACTH α -melanotropina potęguje procesy motywacyjne i ułatwia skupienie uwagi [1].

Cząsteczka α -MSH jest amidem N-acetylowanego fragmentu 1—13 cząsteczki ACTH.



Cząsteczki podobnego do kortykotropiny peptydu środkowego płata (CLIP) zbudowane są z 22 reszt aminokwasowych i mają sekwencję 18—39 cząsteczki ACTH.

β -Lipotropina (β -LPH) uwalniana z proopiomelanokortyny jest polipeptydem, którego cząsteczka zawiera 91 reszt aminokwasowych. Sekwencja aminokwasowa cząsteczki β -lipotropiny świni przedstawia się następująco:



β -LPH wykazuje działanie lipolityczne. N-Terminalna sekwencja 1—58 β -lipotropiny odpowiada strukturze cząsteczki γ -lipotropiny (γ -LPH). Cząsteczka β -LPH zawiera także sekwencje: β -melanotropiny (β -MSH), α , β , γ i δ -endorfin a także metionyno-enkefalinę.

Ilustruje to następujące zestawienie:

Sekwencja β -lipotropiny	Neuropeptyd
1—58	γ -lipotropina
41—58	β -melanotropina
61—91	β -endorfina
61—76	α -endorfina
61—77	γ -endorfina
61—79	δ -endorfina
61—65	Met-enkefalina

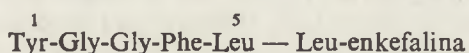
Endorfiny są dobrymi ligandami receptorów opioidowych i wykazują silne działanie przeciwbólne. W związku z tym endorfiny zaliczane są do endogennych peptydów opioidowych.

γ -Melanotropina (γ -MSH) stanowi także fragment proopiomelanokortyny. Cząsteczka γ -MSH zbudowana jest z 12 reszt aminokwasowych.



IV. Peptydy opioidowe

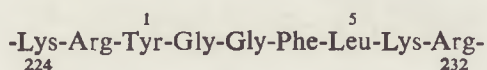
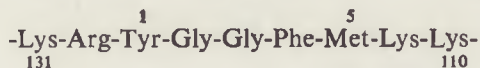
Do grupy peptydów opioidowych zaliczane są neuropeptydy stanowiące ligandy receptorów opioidowych. Najwcześniej poznanymi peptydami opioidowymi są enkefaliny (*enkephalos* — mózg) i omówione już w poprzednim rozdziale endorfiny. Nazwa tych ostatnich pochodzi z połączenia fragmentów dwóch słów: endogenne morfiny. Enkefaliny są szerzej niż endorfiny rozpowszechnione w komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Znane są dwie enkefaliny: metioninowa enkefalina (Met-enkefalina) i leucynowa enkefalina (Leu-enkefalina). Są one pentapeptydami o następującej sekwencji:



Sekwencja Met-enkefaliny występuje w cząsteczce proopiomelanokortyny, stanowiąc także fragment β -LPH (61—65) oraz N-terminalny fragment wszystkich endorfin.

IV-1. Proenkefaliny i peptydy pokrewne

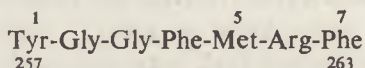
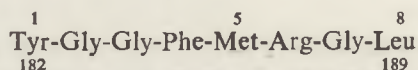
Sekwencje Met-enkefaliny oraz Leu-enkefaliny występują w cząsteczkach białka syntezowanego w nadnerczu. Białko to nazwane proenkefaliną A zawiera ponad 260 reszt aminokwasowych. Na przykład proenkefalina wołowa zawiera w cząsteczce 263 reszty aminokwasowe w tym sześć sekwencji Met-enkefaliny i jedną sekwencję Leu-enkefaliny [7, 8]. Proenkefalina ludzka zawiera natomiast 267 reszt aminokwasowych w cząsteczce i taką samą ilość sekwencji enkefalinowych [9]. W większości przypadków sekwencje enkefalinowe z obu stron sąsiadują w łańcuchu peptydowym prekursora z dwiema resztami zasadowych aminokwasów. Prawdopodobnie reszty te sygnalizują miejsca enzymatycznej hydrolizy, prowadzącej do uwolnienia cząsteczek enkefalin. Na przykład:



(Liczby nad wzorami oznaczają sekwencję enkefalin zaś liczby pod wzorami oznaczają położenie w łańcuchu peptydowym proenkefaliny wołowej).

W dwóch przypadkach zasadowe reszty aminokwasowe sygnalizują uwalnianie pochodnych enkefalin zawierających więcej niż pięć reszt ami-

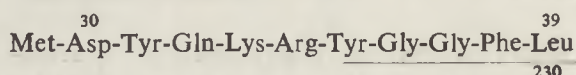
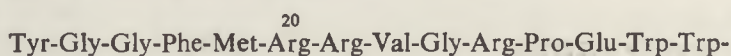
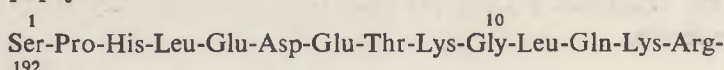
nokwasowych:



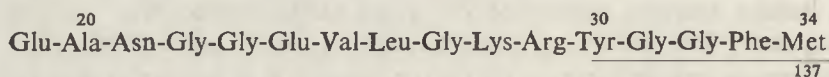
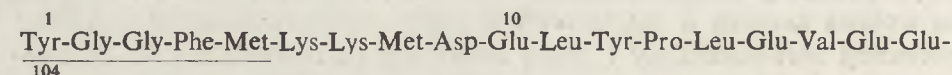
Obydwa peptydy [Arg⁶, Gly⁷, Leu⁸]-Met-enkefalina oraz [Arg⁶, Phe⁷]-Met-enkefalina są dobrymi ligandami receptorów opioidowych.

Jeszcze przed ustaleniem ostatecznej sekwencji pro-enkefaliny izolowano z nadnercza produkty jej degradacji zawierające w cząsteczkach sekwencje enkefalin. Związki te wykazywały wysoką aktywność opioidową [10]. W podanym niżej zestawieniu pokazane są sekwencje: peptydu I, peptydu F, peptydu B, peptydu E, BAM-22P (*bovine adrenal medulla 22-peptide*), BAM-2OP oraz BAM-12P. (Liczby pod wzorami oznaczają położenie w łańcuchu peptydowym proenkefaliny wołu).

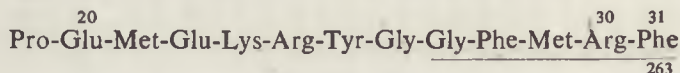
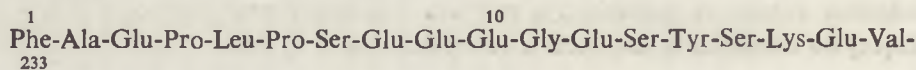
peptyd I



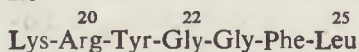
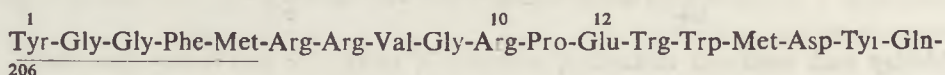
peptyd F



peptyd B

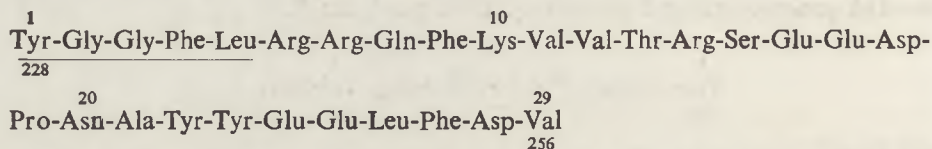


peptyd E (stanowi fragment 15—39 peptydu I)



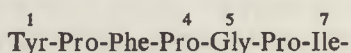
BAM-22P stanowi fragment 1—22 peptydu E, BAM-2OP fragment 1—20 zaś BAM-12P fragment 1—12 peptydu E.

zwaną dynorfina B-29. Jest ona 29-peptydem, którego cząsteczka stanowi fragment 228—256 łańcucha peptydowego prekursora.



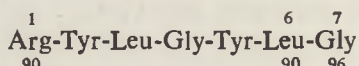
IV-3. Pozostałe peptydy opioidowe

Peptydy o działaniu opioidowym wyodrębniono z pepsynowych hydrolyzatów glutenu pszenicy i α -kazeiny. Do peptydów tych należy β -kazomorfin-7, 7-peptyd o następującej sekwencji:

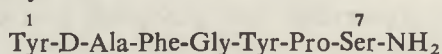


Działanie opioidowe wykazują także β -kazomorfin-5 i amid β -kazomorfin-4 nazwany morficeptyną. Cząsteczki tych peptydów zawierają sekwencję odpowiednio 1—5 i 1—4 β -kazomorfiny-7.

Z hydrolyzatu α -kazeiny wyodrębniono także 6-peptyd i 7-peptyd, których cząsteczki zawierają odpowiednio sekwencje 90—95 i 90—96 tego białka. Peptydy nazwane egzorfinami kazeinowymi wykazują czynność opioidową [19].



Innym peptydem wykazującym działanie opioidowe jest dermorfin, amid 7-peptydu wyizolowany ze skóry żaby południowoamerykańskiej (*Phyllomedusa sauvagi*). Peptyd ten stanowi wyjątek gdyż zawiera w cząsteczce resztę D-alaniny.



Należy jeszcze wspomnieć o kiotorfynie — dipeptydzie Tyr-Arg wyizolowanym z mózgu wołu. Kiotorfina, chociaż nie jest ligandem receptorów opioidowych, działa przeciwbólowo intensyfikując najprawdopodobniej działanie enkefalin. Wydaje się, iż podobnie działa tuftsyna, tetrapeptyd Thr-Lys-Pro-Arg znany ze swych zdolności do stymulacji fagocytozy. Okazało się, iż tuftsyna powoduje u szczurów zanik wrażliwości na bodźce bólowe [20].

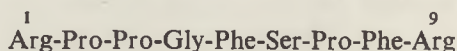
V. Peptydy przewodu pokarmowego

V-1. Glukagon i peptydy pokrewne

Glukagon jest hormonem peptydowym o cząsteczce zbudowanej z 29-reszt aminokwasowych, wydzielanym przez trzustkę. Wykryto także jego

VI-1. Kininy plazmy

Kininy plazmy reprezentowane są przez bradykininę. Jest ona 9-peptydem powstającym z białek plazmy w wyniku enzymatycznej hydrolizy. Poza działaniem na mięśnie gładkie bradykinina zwiększa przepuszczalność naczyń włosowatych a także powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych obniżając u ssaków tętnicze ciśnienie krwi. Wydaje się, iż bradykinina ma wpływ na proces uczenia się. Częsteczka bradykininy ma następującą sekwencję reszt aminokwasowych:



Poza bradykininą do kinin plazmy zaliczane są: 10-peptyd kallidyna (Lys-bradykinina) oraz 11-peptyd Met-Lys-bradykinina.

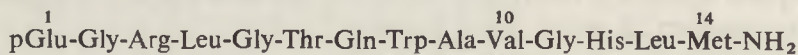
VI-2. Bombesyna i peptydy pokrewne

Bombesyna jest amidem 14-peptydu wydzielonym ze skóry żaby europejskiej (*Bombina bombina* i *Bombina variegata*), działającym na mięśnie gładkie i obniżającym ciśnienie krwi. Cechą charakterystyczną cząsteczki bombesyny jest N-terminalna reszta kwasu L-piroglutaminowego (pGlu).

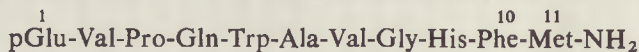


Peptydami wykazującymi strukturalne pokrewieństwo z bombesyną są: alitensyna wydzielona ze skóry ropuchy (*Alytes obstetricans*), ranatensyna wydzielona ze skóry żaby amerykańskiej (*Rana pipens*) oraz litoryna wyodrębniona ze skóry żaby australijskiej (*Litoria aurea*). W podanych niżej wzorach podkreślone są sekwencje wspólne z bombesyną.

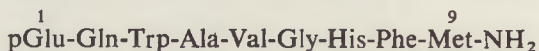
Alitensyna



Ranatensyna

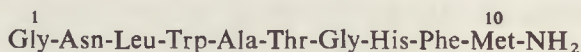


Litoryna

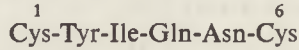


Pokrewieństwo strukturalne z bombesyną wykazują neuromedina B wydzielona ze świńskiego rdzenia kręgowego [25] oraz neuromedina C wyodrębniona z mózgu świnek morskich i szczurów [26].

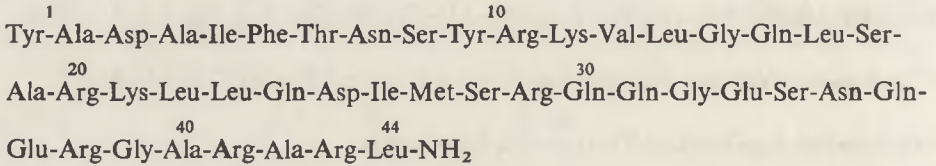
Neuromedina B



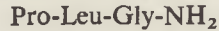
oksytocyny wykazuje własności MRH:



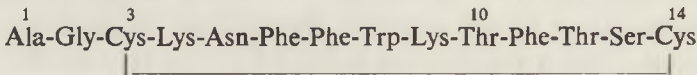
Somatoliberyna ludzka (GH-RH — *growth hormone releasing hormone* lub GH-RF — *growth hormone releasing factor*) jest amidem 44-peptydu [32]. GH-RF uwalnia hormon wzrostu somatotropinę.



Melanostatyna (MIH — *melanotropin release inhibiting hormone*) jest amidem tripeptydu stanowiącego fragment 7-9 oksytocyny. Rola tego czynnika nie jest w pełni wyjaśniona. Uważa się, iż MIH hamuje uwalnianie melanotropiny.

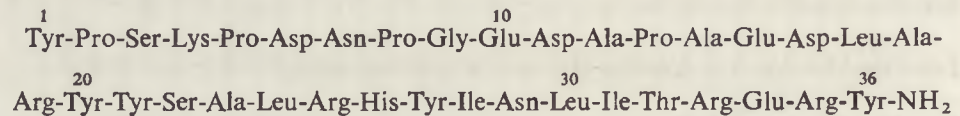


Somatostatyna (SIH — *somatotropin release inhibiting hormone*) hamuje uwalnianie somatotropiny. Częsteczka somatostatyny zbudowana jest z 14 reszt aminokwasowych i zawiera mostek disiarczkowy między resztami L-cysteiny w pozycjach 3 i 14.



IX. Pozostałe neuropeptydy

Ostatnio wyizolowano z mózgu świni nowy amid 36-peptydu o sekwenencji homologicznej do peptydu YY [33]. Związek ten nazwano neuropeptydem Y (NPY). NPY hamuje wydzielanie trzustki stymulowane przez sekretynę.

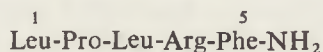


Pobudzający pracę serca peptyd wyodrębniono z mięczaka (*Macrocallista nimbosa*). Okazał się nim amid tetrapeptydu oznakowany jako amid FMRF (jednoliterowe symbole aminokwasów F = Phe, M = Met, R = Arg) [34].

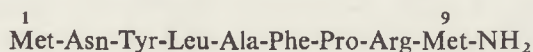


Kardioaktywny amid pentapeptydu wyizolowano z mózgu kurcząt. Zwią-

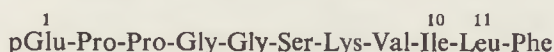
zek ten nazwano amidem LPLRF (L = Leu, P = Pro, R = Arg, F = Phe) [35].



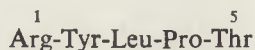
Dalszy kardioaktywny amid 9-peptydu wydzielono z innego mięczaka (*Aplysia*) [36].



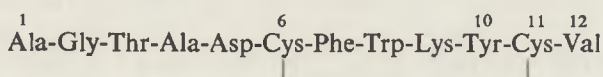
Z hydry (*Hydra attenuata*) oraz z podwzgórza ludzkiego wyodrębniono neuropeptyd zawierający w cząsteczce 11 reszt aminokwasowych. Peptyd ten nazwano „head activator neuropeptide” [37].



Neurotransmitterem okazał się pentapeptyd wydzielony z karalucha (*Periplaneta americana*). Związek ten nazwano proktoliną [38].



W ogonowym systemie neurowydzielniczym ryby kościstej (*Gillichthys mirabilis*) znaleziono neuropeptyd o sekwencji homologicznej do somatostatyny. Związek ten nazwany urotensyną II jest 12-peptydem [39]. Cząsteczka urotensyny II zawiera mostek disiarczkowy pomiędzy resztami L-cysteiny w pozycjach 6 i 11.



Z ekstraktu podwzgórza wołu wyodrębniono 13-peptyd powodujący nadciśnienie u szczurów. Związek ten nazwano neurotensyną.



Skóra żaby (*Xenopus laevis*) zawiera 8-peptyd obniżający ciśnienie krwi i pobudzający skurcze mięśni gładkich. Peptyd nazwano ksenopsyną [40].



Z mózgu szczurów wydzielono kwas N-acetylo-L-aspartylo-L-glutaminowy (Ac-Asp-Glu) wykazujący silne powinowactwo wobec mózgowego receptora kwasu glutaminowego. Przypuszcza się, iż związek ten może być neurotransmitterem [41].

X. Uwagi końcowe

Wydaje się, że w najbliższej przyszłości należy oczekiwać dalszych postępów w badaniach nad izolowaniem, ustalaniem struktury, mechanizmem działania i rolą neuropeptydów w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. Pozwoli to na poznanie zależności pomiędzy strukturą a czynnością biologiczną tej grupy związków oraz na zaplanowanie syntez analogów o zmodyfikowanych własnościach pożądaných w terapii i diagnostyce medycznej.

Zaakceptowano do druku dnia 19 marca 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. de Wied D., van Ree J. M., (1982), *Life Sciences*, **31**, 709—719.
2. Schröder E., Lübke K., (1966), *The Peptides*, 2 tom, str. 281—374, Academic Press, New York.
3. Jakubke H. D., Jeschkeit H., (1982), *Aminosäuren Peptide Proteine*, wyd. 3, str. 263—334, Akademie Verlag, Berlin.
4. Land H., Schütz G., Schmale H., Richter D., (1982), *Nature*, **295**, 299—303.
5. Land H., Grez E., Ruppert S., Schmale H., Rehbein M., Richter D., Schütz G., (1983), *Nature*, **302**, 342—344.
6. Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Numa S., (1979), *Nature*, **278**, 423—427.
7. Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S., Numa S., (1982), *Nature*, **295**, 202—206.
8. Gubler U., Seeburg P., Hoffman B. J., Gage L. P., Udenfriend S., (1982), *Nature*, **295**, 206—208.
9. Comb U., Seeburg P., Adelman J., Eiden L., Herbert E., (1982), *Nature* **295**, 663—666.
10. Kilpatrick D. L., Taniguchi T., Jones B. N., Stern A. S., Shively J. E., Hulihan J., Kimura S., Stein S., Udenfriend S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3265—3268.
11. Matsuo H., Miyata A., Mizuno K., (1983), *Nature*, **305**, 721—723.
12. Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda M., Morimoto Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Nakanishi S., Numa S., (1982), *Nature*, **298**, 245—249.
13. Kanagawa K., Minamino N., Chino N., Sakakibara S., Matsuo H., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 871—878.
14. Fischli W., Goldstein A., Hunkapiller M. W., Hood L. E., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5435—5437.
15. Tachibana S., Araki S., Ohya S., Yoshida S., (1982), *Nature*, **295**, 339—340.
16. Goldstein A., Fischli W., Lowney L. I., Hunkapiller M., Hood L. E., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7219—7223.
17. Kilpatrick D. I., Wahlström A., Lahm H. W., Blacher R., Ezra E., Fleminger G., Udenfriend S., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1849—1852.
18. Corbett A. D., Paterson S. J., McKnight A. T., Magnan J., Kosterlitz H. W., (1982), *Nature*, **299**, 79—81.

19. Loukas S., Varoucha D., Zioudrou C., Streaty R. A., Klee W. A., (1983), *Biochemistry*, **22**, 4567—4573.
20. Herman Z. S., Stachura Z., Siemion I. Z., Nawrocka E., (1980), *Naturwissenschaften*, **67**, 613—614.
21. Bell G. I., Santerre R. F., Mullenbach G. T., (1983), *Nature*, **302**, 716—718.
22. Bell G. I., Sanchez-Pescador R., Laybourn P. J., Najarian R. C., (1983), *Nature*, **304**, 368—371.
23. Itoh N., Obata K., Yanihara N., Okamoto H., (1983), *Nature*, **304**, 547—549.
24. Tatemoto K., Mutt V., (1980), *Nature*, **285**, 417—418.
25. Minamino N., Kanagawa K., Matsuo H., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 541—548.
26. Roth K. A., Evans Ch. J., Lorenz R. G., Weber E., Barchas J. D., Chang J. K., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 528—536.
27. Nawa H., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Nakanishi S., (1983), *Nature*, **306**, 32—36.
28. Kangawa K., Minamino N., N., Fukuda A., Matsuo H., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 533—540.
29. Keutman H. T., Sauer M. M., Hendy G. N., O'Riordan J. L. H., Potts J. T., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5723—5728.
30. Leroux P., Tonon M. C., Leboulenger F., Delarue C., Perroteau I., Netchitailo P., Kupryszewski G., Vaudry H., (1982), *Endocrinology*, **46**, 13—23.
31. Shibahara S., Morimoto Y., Furutani Y., Notake M., Takahashi H., Shimizu S., Horikawa S., Numa S., (1983), *EMBO J.*, **2**, 775—779.
32. Martin J. B., (1983), *Trends in Neurosciences*, **6**, 1—3.
33. Tatemoto K., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5485—5489.
34. Price D. A., Greenberg M. J., (1977), *Science*, **197**, 670—671.
35. Dockray G. J., Reeve J. R., Shively J., Gayton R. J., Barnard C. S., (1983), *Nature*, **305**, 328—330.
36. Morris H. R., Panico M., Karplus A., Lloyd P. E., Riniker B., (1982), *Nature*, **300**, 643—645.
37. Bodenmüller H., Schaller H. Ch., (1981), *Nature*, **293**, 579—580.
38. Starratt A. N., Brown B. E., (1976), *Life Sci.*, **17**, 1253—1256.
39. Pearson D., Shively J. E., Clark B. R., Geschwind I. I., Barkley M., Nishioka R. S., Bern H. A., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5021—5024.
40. Araki K., Tachibana S., Uchiyama M., Nakajima T., Yasuhara T., (1975), *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3132—3140.
41. Zaczek R., Koller K., Cotter R., Heller D., Coyle J. T., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1116—1119.

OLGIERD NARKIEWICZ ^{*)}, LILIANA NITECKA ^{**)}

Rozmieszczenie neuropeptydów w mózgowiu i rdzeniu kręgowym

The distribution of neuropeptides in the brain and spinal cord

Spis treści

- I. Ogólna charakterystyka rozmieszczenia neuropeptydów w ośrodkowym układzie nerwowym
- II. Kora mózgu
- III. Układ pozapiramidowy
- IV. Układ limbiczny
- V. Czuciowe układy neuronalne

Contents

- I. General characteristics of the neuropeptides distribution in the central nervous system
- II. Cerebral cortex
- III. Extrapiramidal system
- IV. Limbic system
- V. Sensory neuronal systems

Wykaz stosowanych skrótów: ACh — acetylocholina; AChE — esteraza acetylocholinowa; ACTH — hormon adrenokortykotropowy; CCK — cholecystokinina; CRF — czynnik uwalniający ACTH; DA — dopamina; ENK — enkefalina; GABA — kwas gamma-aminomasłowy; Glu — glutaminian; LH-RH — hormon uwalniający gonadotropiny; MSH — hormon melanotropowy; Met-ENK — metioninowa enkefalina; NT — neurotensyna; SP — substancja P; SIH — somatostatyna; TRH — hormon uwalniający tytropinę; VIP — naczynioaktywny peptyd jelitowy. Terminy: ENK-dodatni, NT-dodatni, SP-dodatni, SIH-dodatni, VIP-dodatni i im podobne oznaczają struktury komórkowe wykazujące dodatni odczyn immunologiczny w reakcji z odpowiednimi przeciwciałami.

Zastosowanie w neuroanatomii immunohistologicznych metod badawczych pozwoliło na bezpośrednie wykazanie obecności neuropeptydów w ośrodkach mózgu i rdzenia kręgowego oraz w drogach nerwowych. Wprowadzenie zaś metod histochemicznych do badań elektronowo-mikro-

^{*)} Prof. dr, ^{**)} Dr hab., Zakład Anatomii Akademii Medycznej w Gdańsku, 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1

skopowych umożliwiło lokalizację neuropeptydów w strukturach subkomórkowych tkanki nerwowej [1, 16]. Charakterystyczne rozmieszczenie neuropeptydów wskazuje na ich specyficzne znaczenie czynnościowe i sugeruje, że są one neuromodulatorami a nawet neurotransmiterami. W przypadku wielu neuropeptydów określono rozmieszczenie ich miejsc receptorowych [17—19]. Przy użyciu metod elektronowo-mikroskopowych wykryto również obecność niektórych neuropeptydów w pęcherzykach synaptycznych [20—23].

Dzięki uzyskaniu wysoce specyficznych przeciwciał skierowanych przeciw poszczególnym neuropeptydom badania neuroanatomiczne dostarczają obecnie bardziej wiarygodnych danych, niż to miało miejsce w latach siedemdziesiątych. Jednakże mimo oczywistych korzyści wypływających z zastosowania immunohistochemicznych metod badawczych nie możemy zapominać, że reakcje immunologiczne bywają nie w pełni swoiste i że popełniono szereg błędów wyciągając zbyt daleko idące wnioski opierając się tylko na wynikach tych badań. Przeciwciała reagują bowiem z miejscem antygenowym a nie z określoną substancją. Dlatego pozytywny wynik reakcji immunohistochemicznej nie stanowi jeszcze pewnego dowodu wykazującego obecność badanej substancji. Z drugiej strony, brak pozytywnej reakcji nie wyklucza obecności poszukiwanego związku, ponieważ utrwalanie i inne czynniki towarzyszące histologicznej obróbce tkanki zmniejszają antygenowe właściwości peptydów. W odniesieniu do wyników badań morfologicznych, w przypadkach niedostatecznie potwierdzonych przez badania biochemiczne, mówimy raczej o występowaniu dodatniej peptydopodobnej reakcji immunologicznej (ang. *positive peptide-like immunoreaction*) a nie o obecności określonego związku.

Przedstawione dane o rozmieszczeniu neuropeptydów w ośrodkowym układzie nerwowym nie stanowią szczegółowego przeglądu obecnego stanu wiedzy na ten temat. Omawiamy tylko te struktury ośrodkowego układu nerwowego i układy neuronalne, które mają cechy pozwalające na powiązanie danych morfologicznych i biochemicznych z czynnością. Ponadto staraliśmy się w ogromnym materiale, nieraz bardzo rozbieżnych wyników, wybierać tylko te, które wydają się być pewne lub co najmniej wysoce prawdopodobne.

I. Ogólna charakterystyka rozmieszczenia neuropeptydów w ośrodkowym układzie nerwowym

Dotychczasowe badania neuroanatomiczne wykazują, że poszczególne neuropeptydy są szeroko rozprzestrzenione w wielu, częstokroć zupełnie różnych pod względem czynnościowym ośrodkach, a stężenia neuropeptydów w poszczególnych strukturach mózgu i rdzenia kręgowego różnią się bardzo wyraźnie. Tak na przykład istota galaretowata rdzenia kręgowego,

jądro pasma rdzeniowego nerwu trójdzielnego i istota czarna zawierają ponad 1000 pikomoli substancji P na g tkanki [24], podczas gdy kora czuciowa tylko 19 pikomoli/g [25].

NEUROPEPTYDY	OKOLICE MÓZGOWIA												
	Kora	Prążkowie	Gałka biała	Struk. hippocampalne	Ciało migdałowe	Przeogroda	Pole przedwzrokowe	Podwzgórze	Wzgórze	Śródmózgowie	Mózżek	Most	Rdzeń przedłużony
LH - RH					□	□	⊗	■					
TRH	□	□			□	⊗	⊗	■	⊗		□	□	□
Somatostatyna	■	□	□	□	⊗	□	⊗	■	□	□	□	□	□
CRF	□						□	■	□				
Wazopresyna	□			□	□	□		■	□				□
Oksytocyna						□	□	■	□				⊗
β-lipotropina	□	□	□	⊗	□	⊗		■	□	⊗	□	⊗	□
β-endorfina	□	□	⊗	□	⊗	□	⊗	■	□	□	□	□	⊗
ACTH	□	□	□	□	□	□	⊗	■	⊗	⊗	□	□	⊗
MSH	□	□	□	□	□	⊗	⊗	■	□	□	□	□	□
Hormon wzrostu	□			□	■			□					
Tyreotropina					□		□	■	⊗	□		□	□
Prolaktyna							□	■	□				
Substancja P	□	⊗	⊗	□	⊗	□	⊗	⊗	⊗	■	□	□	□
Neurotensyna	□	□	□	⊗	□	⊗	■	⊗	□	⊗	□	□	□
Enkefalina	□	■	■	□	⊗	□	□	⊗	□	⊗	□	□	□
Angiotensyna	□	□		□				□	□		⊗		⊗
Bradykinina	□	□				□	□	⊗	⊗				
VIP	■	⊗	□	⊗	⊗	□	□	⊗	□	□	□	□	□
Cholecystokinina	■	⊗	□	⊗	⊗	□	⊗	⊗	⊗	□	□	□	⊗

Ryc. 1. Stężenie neuropeptydów w głównych okolicach mózgowia. Opracowane na podstawie schematu Palkovitsa [22].

Skróty: ACTH — hormon adrenokortykotropowy; CRF — czynnik uwalniający ACTH; LH-RH — hormon uwalniający gonadotropiny; MSH — hormon melanokortykotropowy; TRH — hormon uwalniający tyreotropinę; VIP — naczynioaktywny peptyd jelitowy.

Większość neuropeptydów występuje na ogół w największym stężeniu w podwzgórzach i w ośrodkach układu limbicznego [10, 15] (Ryc. 1). Niektóre jednak występują głównie w innych obszarach mózgowia: enkefaliny (ENK) w ciele prążkowie, naczynioaktywny peptyd jelitowy (VIP) i cholecystokinina (CCK) w korze mózgu oraz w rogach tylnych rdzenia krę-

gowego [1, 2, 4—7, 9, 13, 14, 21, 26—29]. Obecność karnozyny wykryto niemal wyłącznie w opuszce węchowej [30].

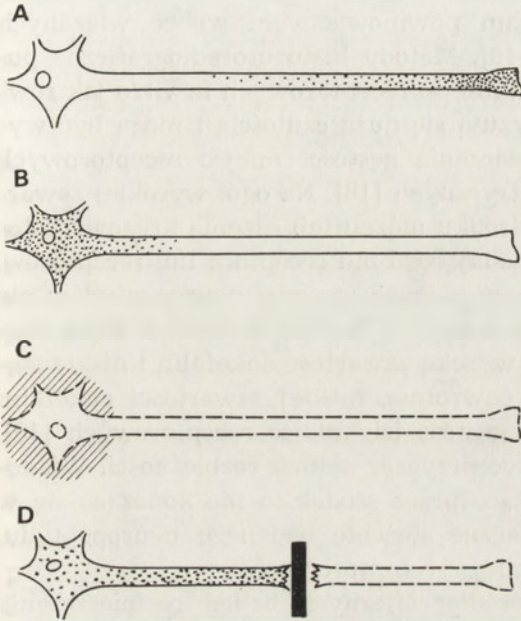
Duże stężenie określonych neuropeptydów w ośrodkach o dobrze poznanej roli czynnościowej sugeruje fizjologiczną rolę jaką mogą spełniać te substancje. Na przykład enkefalin występujące w dużych stężeniach w ośrodkach czuciowych oraz w układzie limbicznym wydają się mieć istotne znaczenie dla przewodzenia impulsów bólowych oraz wywierać znaczny wpływ modulujący na zachowanie zwierząt [6, 13, 29, 31—35]. Wysoka zawartość substancji P w istocie czarnej, a enkefalin w gałce bladej sugeruje, że substancje te mają istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania układu pozapiramidowego [6, 13, 36, 37]. Oczywiście związek między stężeniem neuropeptydów a czynnością poszczególnych ośrodków nie jest tak prosty i wnioski mogą być wysuwane dopiero na podstawie szczegółowych badań przeprowadzonych różnymi metodami.

Neuropeptydy lub ich bezpośrednie prekursorzy wytwarzane są w perikarionach, ale na ogół nie gromadzą się tam w znaczniejszych ilościach, ponieważ transport aksonalny przenosi je w kierunku zakończeń aksonalnych. Dlatego też w początkowym okresie badań immunohistochemicznych dodatnie reakcje immunologiczne obserwowano niemal wyłącznie w preterminalnych i terminalnych odcinkach aksonów. Dopiero zastosowanie kolchicyny, substancji hamującej transport aksonalny i na ogół nie zaburzającej syntezy peptydów, pozwoliło na uwidocznienie neuropeptydów w perikarionach (Ryc. 2). W niektórych populacjach neuronów jednak stwierdzono oddziaływanie kolchicyny prowadzące do zmian letalnych [38]. W takich przypadkach substancja ta nie spełnia oczekiwanego zadania i nie może być skutecznie zastosowana w badaniach immunohistochemicznych.

Badania elektronowo-mikroskopowe ujawniły dodatkowo, że niezależnie od rodzaju badanego peptydu barwny produkt reakcji immunohistochemicznej jest rozmieszczony dyfuzyjnie w cytoplazmie perikarionów i dendrytów neuronów peptydoergicznych, a przede wszystkim w dużych elektronogęstych pęcherzykach synaptycznych [20, 21, 23]. Zakończenia peptydoergiczne tworzą zwykle synapsy aksodendrytyczne, ale nierzadko spotyka się również peptydoergiczne połączenia aksosomatyczne [20, 21, 23]. Fakt występowania neuropeptydów głównie w zakończeniach aksonalnych potwierdzono w badaniach biochemicznych. Wykazały one obecność we frakcji synaptosomalnej 60—70% ogólnej ilości znajdujących neuropeptydów [22].

Neurony peptydoergiczne są w znacznej mierze interneuronami, tj. krótkoaksonalnymi neuronami typu Golgi II, których aksony kończą się w pobliżu perikarionu. Jako przykład służyć mogą neurony korowe zawierające naczynioaktywny peptyd jelitowy, cholecystokininę lub somatostatynę [4, 18, 29]. Neurony peptydoergiczne mają często również struktu-

re długooksonalnych neuronów typu Golgi I, których zakończenia znajdują się w dużej odległości od ciał komórek macierzystych [8, 11, 21, 31, 34, 39, 40, 41]. Długie aksony takich neuronów tworzą peptydoergiczne drogi ośrodkowego układu nerwowego, których poznanie umożliwia zidentyfikowanie w mózgowiu i rdzeniu kręgowym specyficznych neuropeptydowych układów neuronalnych. Konieczne jest jednak do tego łączenie badań immunohistochemicznych ze znanymi doświadczalnymi metodami neuroanatomicznymi (metody zwyrodnieniowe i metody transportu aksonalnego) (Ryc. 2).



Ryc. 2. Stężenie neuropeptydu w różnych częściach neuronu w stanie fizjologicznym i w warunkach doświadczalnych. A — neuron w stanie fizjologicznym. B — neuron po podaniu kolchicyny. C — neuron po zniszczeniu ośrodka. D — neuron po przecięciu aksonu.

Zniszczenie ośrodka zawierającego neurony bogate w określony neuropeptyd prowadzi do spadku stężenia tego neuropeptydu, a następnie do całkowitego jego zniknięcia z aksonów i zakończeń aksonalnych. Z kolei, przecięcie aksonu prowadzi do gromadzenia się wytwarzanego neuropeptydu w perikarionie, a szczególnie w odcinku proksymalnym (bliższym perikarionu) przeciętego aksonu i spadku ilości tego neuropeptydu w odcieętym odcinku dystalnym i w zakończeniach aksonalnych. Opierając się na powszechnie znanych zaburzeniach transportu aksonalnego, występujących po uszkodzeniu neuronów, ustalono między innymi przebieg różnego typu peptydoergicznych włókien w prążku końcowym [31, 42, 43, 11] oraz wykryto zawierającą substancję P drogę łączącą prążkowie z istotą czarną [27, 29]. Ponadto wykazano obecność substancji P w niektórych neuronach zwojów rdzeniowych, których włókna dośrodkowe kończą się na komórkach ośrodków czuciowych w rogu tylnym rdzenia [26, 44]. Zawierające substancję P neurony zwojów rdzeniowych stanowią prawdopodobnie

pierwszy etap drogi przewodzącej impulsy bólowe. Dokładne poznanie przebiegu dróg peptydoergicznych wymaga jednak dalszych badań neuroanatomicznych przy zastosowaniu bardziej precyzyjnych metod doświadczalnych. Między innymi niezwykle ważnym problemem jest uzyskiwanie wysoce specyficznych, najlepiej monoklonalnych, przeciwciał skierowanych przeciwko poszczególnym peptydom.

Dodatkowych informacji o neurotransmiterach i neuromodulatorach może dostarczyć autoradiograficzne zbadanie rozmieszczenia ich miejsc receptorowych. Znajdują się one w błonach komórkowych struktur postsynaptycznych a częściowo również presynaptycznych i charakteryzują się stereospecyficznością oraz wysokim powinowactwem wobec wiązanych substancji neuroaktywnych [17—19]. Metody histoautoradiograficzne pozwalają na badanie rozmieszczenia miejsc receptorowych *in vitro* jak również *in vivo*. Metody te charakteryzują się dużą czułością i mogą być wykorzystywane do ilościowego oznaczania gęstości miejsc receptorowych przy użyciu pomiarów densytometrycznych [18]. Na ogół wysokiej zawartości transmitera w określonym ośrodku mózgu lub rdzenia kręgowego towarzyszy znaczne stężenie odpowiadającego mu receptora lub receptorów. Znalezione jednak ośrodki mózgu, w których stężenia neuropeptydów nie odpowiadają gęstości miejsc receptorowych [17—19]. W zewnętrznym segmencie gałki bladej stwierdza się wysoką zawartość enkefalin i niskie stężenie ich miejsc receptorowych; odwrotnie, niskiej zawartości enkefalin w prążkowie odpowiada znaczna gęstość ich miejsc receptorowych [19]. Jak dotąd nie zdołano wytłumaczyć przyczyn takich rozbieżności. Wiadomo jedynie, że włókna przechodzące przez środek, a nie kończące się w prążkowie, mogą wykazywać znaczne stężenie badanego neuropeptydu, przy nieobecności odpowiednich miejsc receptorowych.

Interesującym wynikiem autoradiograficznych badań rozmieszczenia miejsc receptorowych jest stwierdzenie w mózgu i rdzeniu kręgowym tzw. gorących plam — „*hot spots*”. Tak nazywane obszary charakteryzują się dużym zagęszczeniem miejsc receptorowych odpowiadających różnym substancjom neuroaktywnym. Są to między innymi: istota galaretowata rdzenia kręgowego, jądro łożyskowe prążka krańcowego, opuszka węchowa i zakręt zębaty [17]. Są to miejsca konwergencji wielu dróg nerwowych zawierających różne neurotransmitery. Dotyczy to przeważnie ośrodków czuciowych i limbicznych — nigdy zaś ośrodków ruchowych.

II. Kora mózgu

Wynikający z rozwoju filogenetycznego podział kory mózgu pozwala wyróżnić prakorę, korę starą i korę nową. Badania biochemiczne wykazały, że nowa kora na ogół zawiera stosunkowo niewielkie stężenie neuropeptydów. Ale niektóre z nich są jednak charakterystyczne dla struktur

korowych. W korze mózgowej szczura znaleziono ciała komórek i zakończenia nerwowe dające immunododatnią reakcję przede wszystkim z przeciwciałami skierowanymi przeciwko naczynioaktywnemu peptydowi jelitowemu (VIP), cholecystokininie (CCK) i somatostatynie (SIH) [4, 14, 28]. Nieliczne badania obecności neurotransmiterów w korze mózgowej u naczelnych i człowieka potwierdzają powyższe dane [2, 45]. Podobnie kształtuje się rozmieszczenie neuropeptydów w neuronach starej kory, tj. w hipokampie i okolicy retrohipokampalnej oraz korze gruszkowatej [29, 32, 45, 47]. Obecność niektórych innych neuropeptydów (substancja P, enkefalina oraz neurotensyna) stwierdzono niemal wyłącznie w zakończeniach dróg dokorowych [4, 6, 9, 19, 28, 29]. Neurony wykazujące immunododatnią reakcję na obecność neurotensyny stwierdzono w jednym z obszarów hipokampa, w tzw. podkładce (*subiculum*) [29].

Znaczna liczba komórek nowej kory wykazuje immunododatnią reakcję na obecność naczynioaktywnego peptydu jelitowego (komórki VIP-dodatnie) [4, 28]. Populacja komórek VIP-dodatnich wydaje się być niemal całkowicie jednorodna, a neurony te występują przede wszystkim w warstwach II i III nowej kory. VIP-dodatnie zakończenia nerwowe znajdują się głównie w warstwach II, III i IV. Oblicza się, że u szczura przypada przeciętnie 1 do 5 VIP-dodatnich neuronów na każde 100 komórek nerwowych kory [4]. Korowe neurony VIP-dodatnie to prawie wyłącznie neurony dwubiegunowe, których wypustki skierowane są prostopadle do powierzchni kory, jedna ku oponie miękkiej, a druga w kierunku istoty białej. Są to przeważnie neurony otrzymujące projekcję z jąder wzgórza. Ich aksony kończą się zasadniczo w obrębie kory na komórkach piramidowych i nie dochodzą do struktur podkorowych. Za brakiem VIP-dodatnich połączeń z jądrami podkorowymi przemawiają badania biochemiczne, w których nie stwierdzono istotnych zmian ilościowych zawartości VIP w korze czołowej po odizolowaniu jej od struktur podkorowych [4, 42].

Charakterystyczny układ promienisty neuronów VIP-dodatnich w nowej korze wskazuje na ich lokalne oddziaływanie, ograniczone do małej przestrzeni. Komórki te mogą być ważnym elementem pojedynczych kolumn korowych, stanowiących jednostki funkcjonalne nowej kory. Ponadto stwierdzono obecność VIP w pęcherzykach synaptycznych i uzależnione od Ca^{2+} uwalnianie go z zakończeń presynaptycznych. Pozwala to przypuszczać, że VIP może być jednym z korowych przekaźników synaptycznych [4, 23].

VIP-dodatnie neurony stwierdza się także w korze starej, w obszarze zakrętu zębatego. Są to również głównie interneurony, aksony ich kończą się na komórkach kory hipokampa [29].

Komórki nowej kory wykazujące immunododatnią reakcję na obecność cholecystokininy (CCK-dodatnie) stanowią populację mniej jednorodną. Immunododatni odczyn na obecność tego neuropeptydu stwierdzono w poziomych neuronach warstwy I, oraz w wielobiegunowych neuronach war-

stwy II i III. Gęste sploty CCK-dodatnie znajdują się w warstwach II, III, V i VI [4, 28].

W filogenetycznie starszych częściach kory CCK-dodatnie neurony znajdują się we wszystkich warstwach. W hipokampie są to neurony różnego kształtu, rozprzestrzenione głównie poza warstwą komórek piramidowych. Przypuszcza się, że są to interneurony, których aksony kończą się na komórkach piramidowych [29, 46].

Rozmieszczenie CCK-dodatnich splotów nerwowych w korze śródwęchowej i innych obszarach okolicy retrohipokampalnej wskazuje, że pochodzą one głównie z ośrodków położonych poza tą okolicą [32, 46]. Przypuszcza się, że CCK-dodatnie układy włókien, unerwiające korę śródwęchową, mogą wywierać zasadniczy wpływ na czynność neuronów wysyłających aksony do zakrętu zębatego i hipokampa (śródwęchowa droga przesywająca), a więc na czynność znanego neuronalnego obwodu limbicznego: kora śródwęchowa — zakręt zębaty — komórki piramidowe hipokampa — podkładka — kora śródwęchowa.

Neurony i sploty nerwowe wykazujące immunododatnią reakcję na obecność somatostatyny (SIH) są szerzej rozprzestrzenione w nowej korze, niż neurony wykazujące odczyn VIP- i CCK-immunododatni [2, 4, 28, 45]. Pod względem morfologicznym SIH-dodatnie neurony stanowią populację niejednorodną; znajdują się one w warstwach II, III oraz V, VI. W mózgach ludzkich obserwowano duże immunododatnie neurony somatostatyczne, które towarzyszyły układom włókien opuszczających korę lub do niej dochodzących [45]. SIH-dodatnie sploty włókien nerwowych występują przede wszystkim w warstwie I, a opuszczające ją odgałęzienia znajdują się we wszystkich warstwach kory. Mniej liczne, ale wyraźnie SIH-dodatnie włókna obserwowano w substancji białej podkorowej. Sugeruje to, że również ośrodki podkorowe są zaopatrywane przez włókna zawierające ten neuropeptyd. Uważa się, że somatostatyna jako neurotransmitter może wywierać ważny wpływ na czynności lokomocyjne i świadomość [45].

W przeciwieństwie do dużego zróżnicowania i szerokiego rozprzestrzenienia komórek somatostatynowych w nowej korze SIH-dodatnie komórki hipokampa stanowią stosunkowo jednolitą populację neuronów i wydają się być prawie wyłącznie interneuronami [29].

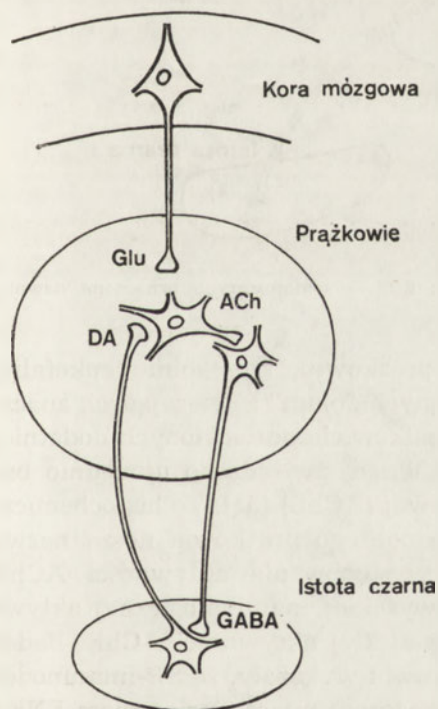
Jak już wyżej wspomniano, kora unerwiona jest również przez włókna zawierające inne peptydy, przede wszystkim substancję P (SP) i metioninową enkefalinę (Met-ENK) [4, 6, 48]. Układy peptydoergiczne włókien dorkorowych są jednak słabo poznane. Wiadomo, że włókna SP-dodatnie dochodzą do kory przedczołowej, gruszkowatej i do kory zakrętu obręczy [4, 48]. Chirurgiczne uszkodzenie mózgu na różnych poziomach wskazuje, że neurony wysyłające do kory włókna SP-dodatnie znajdują się głównie w pniu mózgu, prawdopodobnie na wysokości jąder szwu [4, 48]. Kora mózgowia zawiera stosunkowo niskie stężenie substancji opioidowych, enkefalin i endorfin. Tym niemniej wykazano zróżnicowane rozmieszcze-

nie receptorów opioidowych w poszczególnych polach korowych [19]. Przypuszcza się również, że enkefaliny mają związek z dokorową projekcją z niespecyficznych jąder wzgórza.

III. Układ pozapiramidowy

Według dawnych poglądów pod pojęciem układu pozapiramidowego rozumiano wszystkie ruchowe ośrodki mózgowia, z wyjątkiem tych, które kierują bezpośrednio ruchami dowolnymi i należą do układu piramidowego. Dziś do układu pozapiramidowego w ścisłym tego słowa znaczeniu, włącza się jedynie prążkowie (jądro ogoniaste i skorupa), gałkę błądą, istotę czarną, jądro niskowzgórzowe, jądro brzuszne przednie wzgórza oraz tzw. jądra pola Forela.

Układ pozapiramidowy jest łącznie z układem piramidowym współodpowiedzialny za wyzwalanie ruchów dowolnych. Reguluje on napięcie mięśni poprzecznie prążkowanych. Uważa się, że tzw. wtórne automatyzmy ruchowe wytwarzają się w układzie pozapiramidowym. Uszkodzenie jego ośrodków prowadzi do zmian napięcia mięśni oraz wyzwała ruchy mimowolne różnego typu (zespół Parkinsona, zespoły płasawicze, hemibalizm). Mimo wielu badań dotyczących budowy ośrodków układu pozapiramidowego nie jest ona w pełni poznana [49—53]. I tak, np. nie ma

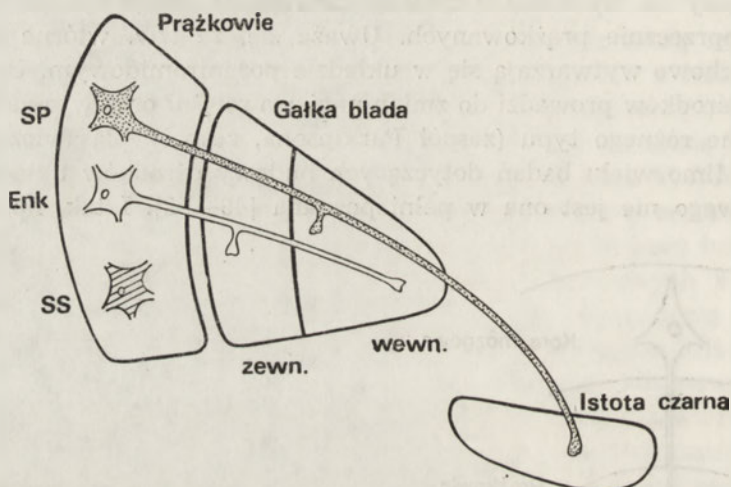


Ryc. 3. Schemat głównych połączeń prążkowie i ich prawdopodobnych transmiterów; nie uwzględniono neuronów peptydoergicznych.

Skróty: ACh — acetylocholina; DA — dopamina; GABA — kwas gamma-aminomasłowy; Glu — glutaminian.

całkowitej zgodności co do typów komórek nerwowych tworzących największy ośrodek pozapiramidowy — prążkowie. Również nie jest całkowicie wyjaśnione, które neurony prążkowie wysyłają projekcje do niższych pięter układu pozapiramidowego, tj. gałki bladej i istoty czarnej.

Połączenia między ośrodkami układu pozapiramidowego są często obukierunkowe. Najlepiej poznana jest zwrotna pętla nerwowa łącząca prążkowie z istotą czarną (Ryc. 3). Transmitterami drogi łączącej prążkowie z istotą czarną są kwas gamma-aminomasłowy (GABA) i substancja P (SP) [9, 39, 40, 52]. Zakończenie aksonów z istoty czarnej dochodzących do prążkowie uwalniają dopaminę (DA). Ponadto do prążkowie dochodzą drogi korowo-prążkowie, których domniemanym transmitterem jest glutaminian (Glu). Wewnątrz prążkowie rozgałęziają się aksony krótkoaksonalnych neuronów uwalniających acetylocholinę (ACh). Poza tym w prążkowie stwierdzono neurony wykazujące immunododatni odczyn na substancję P (SP), enkefalinę (ENK) i somatostatynę (SIH) [36, 54] (Ryc. 4).



Ryc. 4. Neurony peptydoergiczne prążkowie.

Skróty: ENK — enkefalinę; SP — substancja P; SIH — somatostatyna oznaczona dawniej używanym skrótem — SS.

Rozmieszczenie neuropeptydów w prążkowie, szczególnie enkefalin, wykazuje specyficzny układ naprzemiennych „plam” zawierających znaczne stężenie neuropeptydów lub niemal całkowicie pozbawionych dodatniej reakcji immunologicznej [36]. Podobny układ stwierdzono uprzednio badając aktywność esteraży acetylocholinowej (AChE) [55]. Te histochemicznie odmienne podjednostki pozornie jednolitego prążkowie noszą nazwę striosomów. Szczegółowe porównanie występowania aktywności AChE i enkefalin pozwala sądzić, że miejsca wysokiej immunologicznej aktywności enkefalin odpowiadają okolicom o niskiej aktywności AChE. Badania rozmieszczenia substancji P w prążkowie wykazały, że SP-immunododatnie obszary również odpowiadają w znacznej mierze striosomom ENK-

dotatnim, chociaż niekiedy lokalizacja SP bywa całkowicie odmienna [36]. Wydaje się, że trzeci z kolei neuropeptyd, somatostatyna, którego obecność stwierdzono również w neuronach prążkowania występuje w striosomach ENK- i SP-ujemnych, a AChE-dodatnich [36].

Badania rozmieszczenia zakończeń korowo-prążkowiowych i rozmieszczenia neuronów wysyłających drogi eferentne do niższych pięter układu pozapiramidowego wskazują, że striosomy ENK- i SP-dodatnie nie otrzymują bezpośredniej projekcji z kory, ale wysyłają połączenia eferentne do istoty czarnej i gałki bladej [36]. Obecny stan badań nad neuronami prążkowania pozwala na pewne sugestie odnośnie uwalnianych przez nie substancji przekąźnikowych. Wydaje się słusznym przypuszczenie, że neurony średniej wielkości, występujące w dużej liczbie i wysyłające projekcję do istoty czarnej, są przede wszystkim GABA-ergiczne. Być może jednak stanowią one populację heterogenną pod względem biochemicznym i pewna ich część to neurony peptydoergiczne uwalniające substancję P, lub enkefalinę [9, 54] (Ryc. 4). Obecność dodatniej reakcji immunochemicznej na enkefalinę stwierdzono bowiem w neuronach średniej wielkości, których dendryty posiadają liczne kolce [54]. Tego typu neurony oraz duże neurony bezkolcowe wysyłają aksony kończące się w istocie czarnej, a być może i w gałce bladej [41, 49, 50, 53, 56].

Obecność obfitych połączeń peptydoergicznych na osi prążkowie, gałka biała i istota czarna, potwierdzono doświadczalnie [39—41]. W istocie czarnej oraz w wewnętrznym segmencie gałki bladej stwierdzono wysokie stężenie substancji P [1—3, 9, 37, 40]. Zniszczenie prążkowania lub przecięcie mózgu pomiędzy prążkowie i gałką bladą prowadzi do drastycznego spadku zawartości substancji P, zarówno w gałce bladej jak i w istocie czarnej [41].

Znaczne stężenie enkefalin stwierdzono z kolei w zewnętrznym segmencie gałki bladej, a niższą ich zawartość w segmencie wewnętrznym [37]. W badaniach *in vivo*, stosując metodę „push-pull” wykazano wzrost uwalniania enkefalin w gałce bladej u szczura i kota pod wpływem stymulacji prążkowania [36]; przy czym proces ten zależał od obecności Ca^{2+} . Przemawia to za poglądem, że enkefalinowe włókna nerwowe rzeczywiście biegną z prążkowania do gałki bladej.

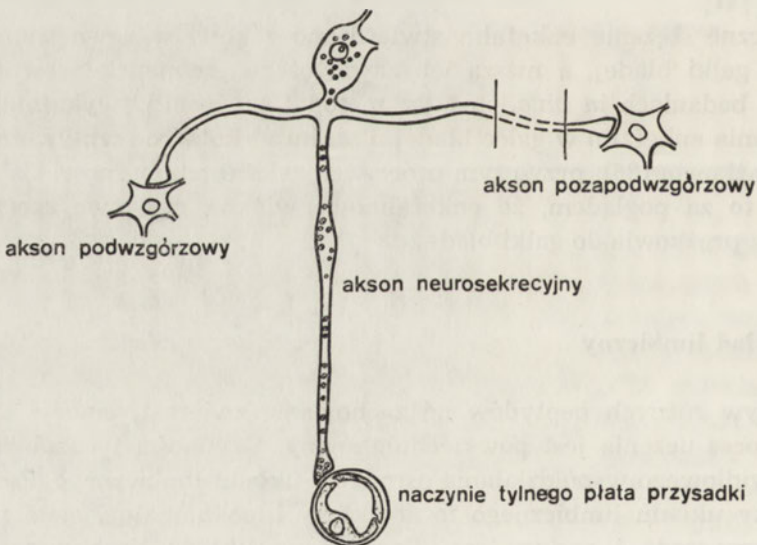
IV. Układ limbiczny

Wpływ różnych peptydów na zachowanie zwierząt, emocje i napędy oraz proces uczenia jest powszechnie znany. Czynności te uzależnione są od prawidłowego współdziałania ośrodków układu limbicznego. Zasadnicze elementy układu limbicznego to struktury hipokampalne, ciało migdałowate, przegródka i podwzgórze. Ponadto do układu limbicznego należą mniejsze jednostki takie, jak jądro łożyskowe prążka krańcowego, pole

przedwzrokowe, jądro półleżące, istota bezimienna i inne. Układy peptydoergiczne struktur hipokampalnych omówiono w rozdziale o peptydach kory mózgu. Ogólne wzorce rozmieszczenia neuronów peptydowych i peptydoergicznego unerwienia tej filogenetycznie starszej kory i kory nowej wykazują znaczne podobieństwa.

Jądra podwzgórza wytwarzają wiele neuropeptydów i są odpowiedzialne za peptydoergiczne unerwienie dużych obszarów mózgowia [7, 10, 15, 58, 59]. Jednak rola neuropeptydów podwzgórzowych jako przekaźników synaptycznych jest słabo poznana. Od dawna natomiast znane są ich właściwości endokrynne i oddziaływanie na przysadkę mózgową. Komórki jąder podwzgórza przykomorowego i nadwzrokowego oraz łukowatego, wytwarzają odpowiednio wazopresynę, oksytocynę i proopiomelanokortynę prekursor — wielu peptydów czynnych jako neurohormony, a być może również czynnych jako neurotransmitery.

Wbrew powszechnie dawniej akceptowanemu pogładowi neurony uwalniające wazopresynę i oksytocynę wysyłają aksony nie tylko do odpowiednich obszarów przysadki mózgowej, ale również do ośrodków umiejscowionych w różnych piętach ośrodkowego układu nerwowego, od opuszki węchowej aż do rdzenia kręgowego [15]. Można rozróżnić trzy rodzaje połączeń wysyłanych przez neurony wytwarzające neuropeptydy, a mianowicie połączenia przysadkowe, podwzgórzowe i pozapodwzgórzowe dochodzące do ośrodków innych części mózgowia (Ryc. 5). Nie wiemy dotąd czy są to połączenia wyłącznie peptydoergiczne, czy neuropeptydy występują w nich równocześnie z jednym z klasycznych transmiterów. W takim przypadku należałoby oczekiwać, że neuropeptydy działają tu jako modulatory.

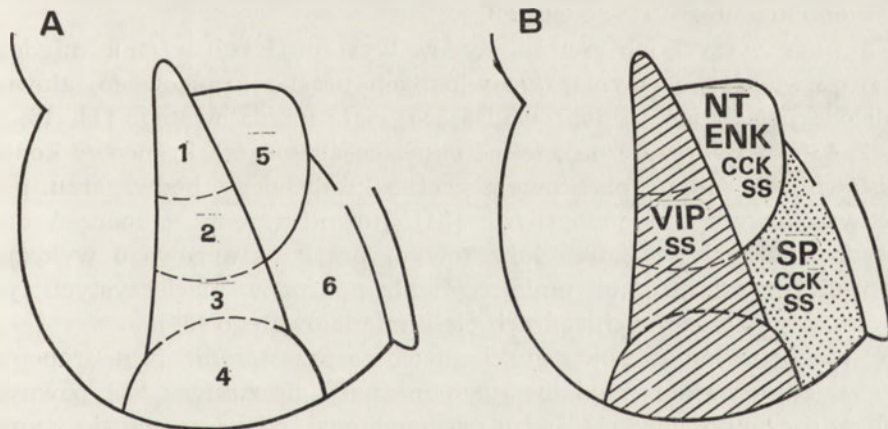


Ryc. 5. Przypuszczalny układ aksonów neuronu jądra przykomorowego.

Najlepiej znanymi pochodnymi proopiomelanokortyny są hormon adrenokortykotropowy (ACTH) i β -endorfina. Stosując immunohistochemiczne metody badań stwierdzono obecność tych substancji, lub ich prekursorów, jedynie w neuronach podwzgórza. Sploty nerwowe wykazujące immunododatnią reakcję na ACTH i β -endorfina są natomiast szeroko rozprzestrzenione w mózgowiu; znaleziono je w jądrach wzgórza, śródmózgowiu, ciele migdałowatym i hipokampie [10, 15, 57—60]. Zniszczenie wyżej wymienionych ośrodków prowadziło do zniesienia wpływu ACTH na zachowanie zwierząt doświadczalnych [60]. β -Endorfina znana jest jako endogenna substancja o najdłuższym działaniu opiatowym, być może zadaniem jej jest regulacja pręgu pobudliwości bólowej [59].

Jedną z budzących największe zainteresowanie struktur limbicznych jest ciało migdałowate. Charakteryzuje się ono skomplikowaną budową. Dzieli się ono na szereg jąder różniących się budową komórkową i znaczeniem czynnościowym (Ryc. 6A). Jądra ciała migdałowatego łączą się obukierunkowo z podwzgórzem, polem przedwzrokowym, jądrem łożyskowym prażka krańcowego, wieloma jądrami wzgórza i ośrodkami niższych pięter pnia mózgu. Ciało migdałowate gra rolę nadrzędnego ośrodka limbicznego i wywiera wpływ regulujący na czynność większości ośrodków tego układu.

Immunododatnią reakcję na obecność naczynioaktywnego peptydu jelitowego, cholecystokininy, substancji P, neurotensyny, metioninowej enkefaliny i somatostatyny stwierdzono w neuronach jąder ciała migdałowatego oraz splotach nerwowych tej struktury [8, 11, 16, 31, 32, 42]. Rozmieszczenie różnych neuropeptydów w jądrach ciała migdałowatego bywa podobne.



Ryc. 6. A. Topografia jąder ciała migdałowatego. 1 — jądro boczne; 2,3 — jądra podstawne; 4 — jądro korowe; 5 — jądro środkowe; 6 — jądro przyśrodkowe.

B. Zasadnicza lokalizacja neuropeptydów w poszczególnych jądrach ciała migdałowatego. Grubszymi literami oznaczono neuropeptydy najbardziej charakterystyczne dla odpowiedniego jądra lub grupy jąder.

Skróty: CCK — cholecystokinina; ENK — enkefalina; NT — neurotensyna; SP — substancja P; SIH — somatostatyna na ryc. oznaczona dawniej stosowanym skrótem SS; VIP — naczynioaktywny peptyd jelitowy.

Stosując jednak podwójną reakcję immunohistochemiczną na obecność różnych neuropeptydów w jądrach ciała migdałowatego nie stwierdzono nigdy podwójnego znakowania tego samego neuronu [32]. Stąd wynika wniosek, że pomimo wielu neuropeptydów zawartych w jądrach ciała migdałowatego, poszczególne neuropeptydy występują w odrębnych neuronach tej struktury.

Jądra ciała migdałowatego wykazują następujące charakterystyczne cechy rozmieszczenia neuropeptydów [32] (Ryc. 6B).

1. Neurony wykazujące immunododatnią reakcję na somatostatynę (SIH-dodatnie), są szeroko rozprzestrzenione i spotyka się je we wszystkich jądrach.

2. Immunododatni odczyn na naczynioaktywny peptyd jelitowy (VIP) i cholecystokininę (CCK), najbardziej typowe peptydy korowe, stwierdzono odpowiednio dla VIP w jądrach bocznym, korowym i podstawnych, zaś dla CCK w jądrze środkowym i przyśrodkowym.

3. Neurony wykazujące immunododatnią reakcję na substancję P (SP-dodatnie) są obecne głównie w jądrze przyśrodkowym, chociaż znaczną ich liczbę znaleziono również w jądrze środkowym.

4. Komórki wykazujące immunododatnią reakcję na enkefalinę (ENK-dodatnie) i neurotensynę (NT-dodatnie) znaleziono wyłącznie w jądrze środkowym. Jądro to stanowi obszar ciała migdałowatego, w którym znaleziono najwięcej różnorodnych komórek peptydoergicznych. Występują tu neurony wykazujące dodatni odczyn na cholecystokininę, neurotensynę, somatostatynę, substancję P i metioninową enkefalinę. Jądro środkowe jest również miejscem konwergencji wielu dróg peptydoergicznych. Nie zawiera ono komórek VIP-dodatnich.

Obecność wszystkich neuropeptydów występujących w ciele migdałowatym stwierdzono również we włóknach prążka krańcowego, głównej drogi odprowadzającej i doprowadzającej ciała migdałowatego [11, 16, 31, 34, 42, 43]. Peptydoergiczne włókna opuszczające prążek krańcowy kończą się głównie na jądrze łożyskowym prążka krańcowego, podwzgórzu, polu przedwzrostkowym i w przegrodzie [34]. Rozmieszczenie zakończeń dróg peptydoergicznych w jądrze łożyskowym prążka krańcowego wykazuje topograficzną zależność od umiejscowienia neuronów macierzystych tych włókien w poszczególnych jądrach ciała migdałowatego [34].

W przedstawionym powyżej schemacie rozprzestrzenienia neuropeptydów w jądrach ciała migdałowatego możnaby doszukiwać się pewnych implikacji czynnościowych. Jądro przyśrodkowe, odznaczające się stymulującym działaniem na niższe ośrodki układu limbicznego, charakteryzuje się wysoką zawartością substancji P, neuropeptydu o właściwościach pobudzających; jądro boczne i jądro podstawowe, uważane za część hamującą ciała migdałowatego, zawierają VIP, neuropeptyd szeroko rozprzestrzeniony w korze mózgu. Jądro środkowe, które jak się wydaje odpowiada za wyzwalanie szeregu reakcji autonomicznych towarzyszących agresji, połą-

czone odpowiednimi układami włókien z podwzgórzem, (być może z podwzgórzowym ośrodkiem agresji) i z wieloma wegetatywnymi ośrodkami niższych pięter mózgu, zawiera różnorodne neurony peptydoergiczne, w tym także neurony ekefolino- i neurotensyno-dodatnie. Enkefaliny i neurotensyna są to neuropeptydy, których regulujący wpływ na emocje jest powszechnie znany. Dalsze, jeszcze bardziej dokładne badania rozmieszczenia neuropeptydów w jądrach ciała migdałowatego są nadal konieczne, aby można było wnioskować o znaczeniu czynnościowym poszczególnych migdałowatych układów peptydoergicznych.

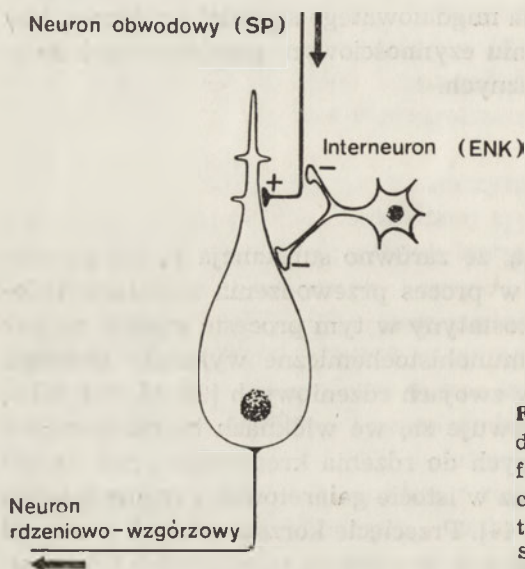
V. Czuciowe układy neuronalne

Badania fizjologiczne wskazują, że zarówno substancja P, jak i enkefaliny są bezpośrednio włączone w proces przewodzenia impulsów bólowych i termicznych. Udział somatostatyny w tym procesie wydaje się być też prawdopodobny. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność SP-immunododatnich neuronów w zwojach rdzeniowych [26, 44, 61]. Silną SP-immunododatnią reakcję obserwuje się we włóknach bezmielinowych i cienkich mielinowych dochodzących do rdzenia kręgowego przez korzenie tylne nerwów rdzeniowych oraz w istocie galaretowatej rogów tylnych rdzenia kręgowego [13, 21, 24, 35, 44]. Przecięcie korzeni tylnych prowadzi do zwiększenia zawartości substancji P w zwojach rdzeniowych i do równoczesnego spadku jej poziomu w istocie galaretowatej rdzenia [35, 44]. Cechy morfologiczne neuronów i włókien SP-immunododatnich oraz rozmieszczenie ich zakończeń potwierdzają wyniki badań fizjologicznych wskazujących, że substancja P jest prawdopodobnym przekaźnikiem synaptycznym uwalnianym przez pierwszy neuron drogi bólowej; tym bardziej, że SP-immunododatnie kolbki synaptyczne tworzą liczne synapsy akso-somatyczne i akso-dendryczne z komórkami istoty galaretowatej [21].

Istota galaretowata rdzenia kręgowego zawiera ponadto znaczną liczbę neuronów ENK-immunododatnich [35, 6]. Przecięcie korzeni tylnych nerwów rdzeniowych bądź też dróg rdzeniowo-wzgórzowych nie zmienia zawartości enkefalin w rogach tylnych rdzenia kręgowego [35, 61]. Stąd wnioskuje się, że ENK-immunododatnie neurony rogów tylnych to neurony pośredniczące. Badania elektronowo-mikroskopowe pozwalają bezpośrednio lub pośrednio wnioskować, że włókna interneuronów ENK-dodatnich kończą się synapsami na włóknach zawierających substancję P, lub też na neuronach istoty galaretowatej [21] (Ryc. 7). Enkefaliny mogą więc działać modulująco zarówno presynaptycznie poprzez połączenia akso-aksonalne z pierwszym neuronem drogi bólowej jak i postsynaptycznie poprzez połączenia z neuronami drogi rdzeniowo-wzgórzowej.

Substancja P uwalniana przez zakończenia pierwszego neuronu drogi bólowej oddziałuje pobudzająco bezpośrednio na neurony, których akso-

ny tworzą bólowe drogi wstępujące rdzenia [35]. ENK-dodatnie neurony pośredniczące, obniżają pobudliwość na styku pierwszego i drugiego neuronu drogi bólowej, oddziałując presynaptycznie lub postsynaptycznie; w pierwszym przypadku obniżając uwalnianie substancji P, a w drugim zmniejszając pobudliwość elementu postsynaptycznego [35]. Z kolei czyn-



Ryc. 7. Schemat przedstawiający prawdopodobny wpływ interneuronu enkefalinergicznego na czynność neuronu czuciowego istoty galaretowatej rogu tylnego rdzenia kręgowego.

Skróty: ENK — enkefaliny; SP — substancja P.

ność neuronów pośredniczących może być modulowana przez obocznicę włókien aferentnych zawierających substancję P lub też przez inne włókna aferentne zaopatrujące istotę galaretowatą. Przypuszcza się ponadto, że zakończenia nerwowe włókien mielinowych uwalnijące somatostatynę oddziałują hamująco na neuron pośredniczący, co w wyniku podwójnego hamowania, powinno znosić pierwotny hamujący efekt oddziaływania interneuronów (ang. *disinhibitory effect*) [61]. Drogi zstępujące do rdzenia z wyższych pięter ośrodkowego układu nerwowego mogą również oddziaływać modulująco, bądź bezpośrednio, bądź za pośrednictwem interneuronu na pobudliwość II neuronu drogi czucia bólu.

Wysoką zawartość substancji P i enkefalin stwierdzono również w czuciowych jądrach rdzenia przedłużonego — w jądrze pasma rdzeniowego nerwu trójdzielnego i w jądrze pasma samotnego [3, 5, 6, 12, 13, 19, 27, 33, 42]. Jądro pasma rdzeniowego nerwu trójdzielnego, podobnie jak istota galaretowata jest między innymi ośrodkiem bólowym. Kończą się w nim włókna nerwu trójdzielnego przewodzące impulsy bólowe, termiczne i dotykowe z obszaru głowy.

Jądro pasma samotnego stanowi miejsce zakończeń włókien czuciowych nerwu twarzowego, językowo-gardłowego i błędnego [27]. Jest to ośrodek czucia smaku i równocześnie ośrodek wiscerosensoryczny wpływający na

pracę serca, krążenie i oddychanie. Obszar jądra pasma samotnego najsilniej SP-immunododatni odpowiada występowaniu zakończeń włókien czuciowych nerwu błędnego, a czynnościowo odpowiada ośrodkowi regulującemu krążenie i pracę serca [27]. ENK-immunododatnie elementy jądra pasma samotnego to zarówno ciała neuronów jak i sploty nerwowe [27]. Przypuszcza się, że są to neurony pośredniczące, a być może częściowo również neurony wysyłające połączenia do wyższych pięter mózgu.

Jądro przyramieniowe należące także do układu wiscerosensorycznego mieszczące się na pograniczu mostu i śródmózgowia, posiada liczne, obukierunkowe połączenia z jądrem pasma samotnego. Wykazuje ono również wysoki poziom SP- i ENK-immunododatniej reakcji [3, 5, 6, 12, 13, 19, 33]. Jądro przyramieniowe, włączone jest w regulację wielu funkcji wegetatywnych.

Liczne analogie co do zawartości i rozmieszczenia neuropeptydów w czuciowych jądrach nerwów czaszkowych i w rogach tylnych rdzenia pozwalają przypuszczać, że mechanizm przewodzenia impulsacji aferentnej w tych ośrodkach jest podobny. Wysokie stężenie substancji P i enkefalin wydaje się być typowe tylko dla niższych ośrodków czuciowych; nie dotyczy to czuciowych ośrodków wzgórza i kory mózgu.

Biorąc pod uwagę znaczenie neuropeptydów w czynności mózgu, można oczekiwać, że dalsze badania ich rozmieszczenia w różnych strukturach mózgowych przyczynią się do zrozumienia patologii niektórych neurologicznych jednostek chorobowych. Dotyczy to szczególnie tych chorób, które w sposób wybiórczy obejmują niektóre, biochemicznie odrębne układy neuronalne.

Zaakceptowano do druku 20 maja 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Brownstein M. J., Mroz E. A., Kizer J. S., Palkovits M., Leeman S., (1976), *Brain Res.*, **116**, 229—305.
2. Cooper P. E., Fernstrom M. H., Rostad O. P., Leeman S. E., Martin J. B., (1981), *Brain Res.*, **218**, 219—232.
3. Cuello A., Kanazawa J., (1978), *J. Comp. Neurol.*, **178**, 129—150.
4. Emson P. C., Lindvall O., (1979), *Neuroscience*, **4**, 1—30.
5. Finley J. C. W., Maderdrut J. L., Petrusz P., (1981), *J. Comp. Neurol.*, **198**, 541—565.
6. Haber S., Elde R., (1982), *Neuroscience*, **7**, 1049—1095.
7. Henry J. L., (1979), *Intern., J. Neurol.*, **12**, 167—179.
8. Jennes L., Stumpf W. E., Kalivas P. W., (1982), *J. Comp. Neurol.*, **210**, 211—224.
9. Ljungdahl A., Hökfelt T., Nilsson G., (1978), *Neuroscience*, **3**, 861—943.
10. Palkovits M., (1981), *Advan. Physiol. Sci.*, **14**, 203—215.
11. Roberts G. W., Woodhams P. L., Bryant M. G., Crow T. J., Bloom S. R., Polak J. M., (1980), *Histochemistry*, **65**, 103—119.

12. Sar M., Stumpf W. E., Miller R. J., Chang K.-J., Cuatrecasas P., (1978), *J. Comp. Neurol.*, **182**, 17—38.
13. Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G. R., Snyder S. H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2167—2171.
14. Sims B. K., Hoffman D. L., Said S. I., Zimmerman E. A., (1980), *Brain. Res.*, **186**, 165—183.
15. Swaab D. F., (1982), *Progr. Brain. Res.*, **55**, 97—122.
16. Uhl G. R., Kuhar M. J., Snyder S. H., (1978), *Brain. Res.* **149**, 223—228.
17. Kuhar M. J., (1981), *Trends Neurosci.*, **4**, 60—64.
18. Palacios J. M., Wamsley J. K., (1982), *Progr. Brain Res.*, **55**, 265—278.
19. Wamsley J. K., Zarbin H. A., Young W. S., Kuhar M. J., (1982), *Neuroscience*, **7**, 595—613.
20. Buijs R. M., (1982), *Progr. Brain Res.*, **55**, 167—184.
21. Di Figlia M., Aronin N., Leeman S. E., (1982), *Neuroscience*, **7**, 1127—1140.
22. Mulder A. H., (1982), *Progr. Brain Res.*, **55**, 135—156.
23. Pelletier G., Leclerc R., Puviani R., Polak J. M., (1981), *Brain. Res.*, **210**, 356—360.
24. Kanazawa I., Jessef T., (1976), *Brain Res.*, **117**, 362—367.
25. Hong J. S., Yang H. Y. T., Fratta W., Costa E., (1977), *Brain Res.*, **134**, 383—386.
26. Hökfeld T., Kellerth J.-O., Nilsson G., Pernow B., (1975), *Brain Res.*, **100**, 235—252.
27. Maley B., Elde R., (1982), *Neuroscience*, **7**, 2469—2490.
28. Morrison J. H., Magistrelli J., (1981), *Trends Neurosci.*, **6**, 146—151.
29. Roberts G. W., Woodham P. L., Polak J. M., Crow T. J., (1984), *Neuroscience*, **11**, 35—78.
30. Halász N., Shepherd G. M., (1983), *Neuroscience*, **10**, 579—619.
31. Gros C., Pradelles P., Humbert J., Dray F., Le Gal la Salle G., Ben-Ari Y., (1978), *Neurosci. Letts.*, **10**, 193—196.
32. Roberts G. W., Woodhams P. L., Polak J. M., Crow T. J., (1982), *Neuroscience*, **7**, 99—131.
33. Uhl G. R., Goodman R. R., Kuhar M. J., Childers S. R., Snyder S. H., (1979), *Brain Res.*, **166**, 75—94.
34. Woodhams P. L., Roberts G. W., Polak J. M., Crow T. J., (1983), *Neuroscience*, **8**, 677—703.
35. Zieglgänsberger W., (1982), *Progr. Brain Res.*, **55**, 297—320.
36. Graybiel A. M., Ragsdale C. W., Yoneoka E. S., Elde R. P., (1981), *Neuroscience*, **6**, 377—397.
37. Haber S., Elde R., (1981), *Neuroscience*, **6**, 1291—1297.
38. Goldschmidt R. S., Steward O., (1982), *Neuroscience*, **7**, 695—714.
39. Kanazawa I., Emson P. C., Cuello A. C., (1977), *Brain Res.*, **119**, 447—453.
40. Kanazawa I., Mogaki S., Muramoto O., Kuzuhara S., (1980), *Brain Res.*, **184**, 481—485.
41. Paxinos G., Emson P. C., Cuello A. C., (1978), *Neurosci. Let.*, **7**, 133—136.
42. Palkovits M., Bensson J., Rotsztejn W., (1981), *Brain Res.*, **213**, 455—459.
43. Palkovits M., Epelbaum J., Gros C., (1981), *Brain Res.*, **216**, 203—209.
44. Takahashi T., Otsuka M., (1975), *Brain Res.*, **87**, 1—11.

45. Sorensen K. V., (1982), *Neuroscience*, **7**, 1227—1232.
46. Köhler Ch. Chain-Palay V., (1982), *J. Comp. Neurol.*, **210**, 136—146.
47. Leranth Cs., Frotscher M., (1983), *Brain Res.*, **276**, 357—361.
48. Paxinos G., Emson P. C., Cuello A. C., (1978), *Neurosci. Lett.*, **7**, 127—131.
49. Bolam J. P., Somogyi P., Totterdell S., Smith A. D., (1981), *Neuroscience*, **6**, 2141—2157.
50. Grofova J., (1975), *Brain Res.*, **91**, 286—291.
51. Hassler R., (1978), *J. Neurol. Sci.*, **36**, 187—224.
52. Hassler R., (1979), *Advan. Neurol.*, **24**, 93—108.
53. Somogyi P., Smith A. D., (1979), *Brain Res.*, **178**, 3—15.
54. Pickel V. M., Sumal K. K., Beckley S. C., Miller R. J., Reis D. J., (1980), *J. Comp. Neurol.*, **189**, 721—741.
55. Graybiel A. M., Ragsdale C. W., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 5723—5726.
56. Bayon A., Schoemaker J., Lugo L., Azad R., Ling N., Druker-Colin R., Bloom F. E., (1981), *Neurosci. Letts*, **24**, 65—70.
57. Bugnon C., Bloch B., Lenys D., (1981), *Neuroscience*, **6**, 1299—1313.
58. Pelletier G., (1980), *Neurosci. Lett.*, **16**, 85—90.
59. Smyth D. G., Zakarian S., (1982), *Progr. Brain Res.*, **55**, 123—134.
60. De Wied D., (1982), *Progr. Brain Res.*, **55**, 473—482.
61. Hökfeld T., Johansson O., Ljungdahl A., Lundberg J. M., Schultzberg M., (1980), *Nature*, **284**, 515—521.

RYSZARD PRZEWŁOCKI *)

Endogenne systemy opioidowe

Endogenous opioid systems

Spis treści

- I. Wprowadzenie**
- II. System proenkefalinowy**
- III. System β -endorfinowy**
- IV. System prodynorfinowy**
- V. Peptydy opioidowe i ich receptory**
- VI. Przeciwbólowe działanie peptydów opioidowych**
- VII. Peptydy opioidowe a zależność od opiatów**
- VIII. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Proenkephalin system**
- III. β -endorphin system**
- IV. Prodynorphin system**
- V. Opioid peptides and multiple opiate receptors**
- VI. Analgesic action of opioid peptides**
- VII. Opioid peptides and dependence**
- VIII. Concluding remarks**

I. Wprowadzenie

U podstawy wykrycia peptydów opioidowych znajdują się dwie zasadnicze obserwacje:

1) drażnienie elektryczne mózgu osłabia wrażliwość na bodźce bólowe [1], czemu co najmniej częściowo zapobiega antagonistą opioidowy nalokson [2], oraz

2) w mózgu istnieją miejsca specyficznie wiążące opiaty [3, 4, 5, 6].

Pierwsze spostrzeżenie sugerowało, że pod wpływem elektrycznego drażnienia niektórych struktur mózgu wydzielają się endogenne substan-

*) Dr, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

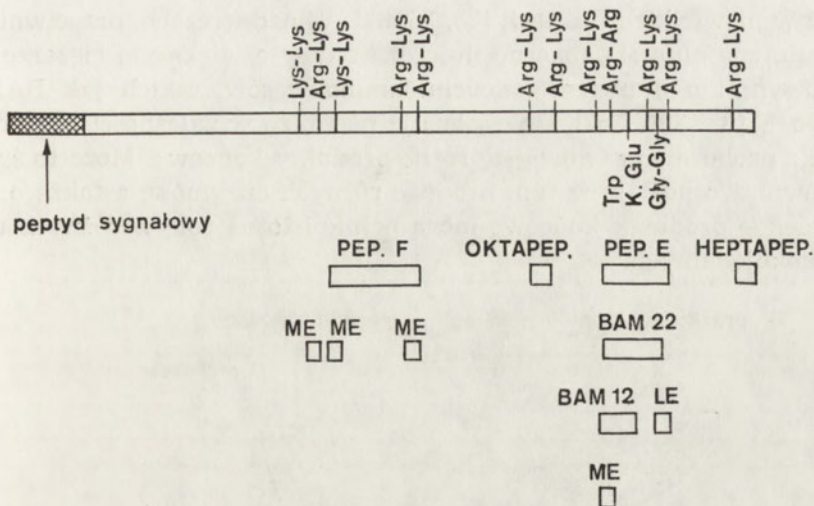
cje o działaniu podobnym do morfiny, drugie zaś, że w mózgu występują receptory, z którymi substancje te mogą się wiązać i poprzez nie działać. Już w roku 1975 [7, 8, 9, 10] w wielu ośrodkach badawczych wykazano obecność w ekstraktach z mózgu i przysadki substancji o podobnej do opiatów aktywności. W tym też roku wyizolowano w mózgu świnki morskiej i zidentyfikowano metionylową- (Met-) i leucylową- (Leu-) enkefalinę [11], a rok później wyodrębniono z przysadki świni [12] i wielbłąda [13] β -endorfinę, a także opiatowo-czynny fragment tego peptydu α -endorfinę [14]. Od tego czasu, wyizolowano z mózgu i przysadki zwierząt różnych gatunków szereg aktywnych peptydów opioidowych, a w szczególności dynorfinę [15, 16, 17], α - i β -neoendorfinę [18, 19], a także serię peptydów, które wyodrębniono z nadnerczy: Met-enkefalinę-Arg⁶-Phe⁷, Met-enkefalinę-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ [20, 21], BAM-12P, BAM-22P, peptyd E i peptyd F [22, 23, 24, 25].

Wszystkie te substancje mają na swym N-końcu sekwencję Met- lub Leu-enkefaliny, oraz pobudzają receptory opiatowe, czemu zapobiega nalokson. Początkowo, nadano im wspólną nazwę „endorfin”. Obecnie jednak częściej terminu używa się „endogenne peptydy opioidowe”, ponieważ termin używany uprzednio stał się mylący z chwilą odkrycia wielu peptydów opioidowych, różniących się strukturalnie od β -endorfiny. Peptydy opioidowe pochodzą z trzech prohormonów, których sekwencję aminokwasową ustalono na podstawie analizy sekwencji nukleotydów DNA, komplementarnego dla właściwych mRNA. Te trzy prekursorzy to: proopiomelanokortyna [26], prodynorfina zwana także proenkefaliną B [27], oraz proenkefalina (zwana także proenkefaliną A) [28, 29, 30].

II. System proenkefalinowy

Dotychczas poznano dwa białka, które mogą być prohormonami Met- i Leu-enkefaliny. Jedno z nich to białko zawierające 263 aminokwasy, zwane proenkefaliną, z którego mogą powstawać obie enkefaliny. Inne białko składające się z 256 aminokwasów zwane prodynorfiną, może być prekursorem jedynie Leu-enkefaliny, ponieważ nie zawiera sekwencji Met-enkefaliny. Nie jest jednak jeszcze całkowicie jasne, czy z prodynorfiny powstaje Leu-enkefalina, czy też dłuższe peptydy zawierające jej sekwencję, takie jak dynorfina, dynorfina B i α -neoendorfina. W strukturach mózgu, zawierających duże stężenie Leu-enkefaliny, w dużym stężeniu występują także peptydy pochodzące z proenkefaliny. Stosunek stężenia Met-enkefaliny do Leu-enkefaliny, w szeregu struktur mózgu jest zbliżony i wynosi 4 : 1 [31], a więc jest podobny do tego jaki występuje w proenkefalinie. Ponadto, ze szczegółowych badań immunohistochemicznych wynika, że w ciałach komórkowych neuronów zawierających dynorfinę, a więc peptyd pochodzący z prodynorfiny, nie występuje Leu-enkefalina.

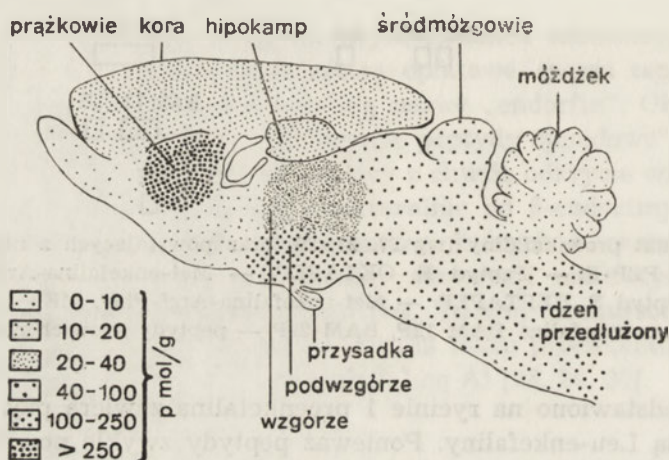
Jest ona natomiast obecna w neuronach zawierających fragmenty proenkefallyny [92]. Tak więc, wydaje się prawdopodobne, że mózgową Leu-enkefalina powstaje z proenkefallyny a nie z prodynorfiny, a co za tym idzie proenkefalina jest prohormonem obu enkefalin.



Ryc. 1. Schemat proenkefallyny (wg 27, 23, 29) oraz powstających z niej peptydów opioidowych. PEP·F — Peptyd F, OKTAPPEP. — Met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, PEP. E — Peptyd E, HEPTAPEP. — Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷, ME — Met-enkefalina, LE — Leu-enkefalina BAM 12P, BAM 22P — peptydy krowich nadnerczy.

Jak przedstawiono na rycinie 1 proenkefalina zawiera pięć sekwencji Met- i jedną Leu-enkefallyny. Ponieważ peptydy zwykle powstają z prekursorów przez cięcie proteolityczne, w miejscach zawierających pary aminokwasów zasadowych (Arg-Lys, Arg-Arg, Lys-Arg, Lys-Lys), zatem z proenkefallyny mogą powstawać, cztery Met-enkefallyny, jedna Leu-enkefalina, heptapeptyd (Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷) oraz oktapeptyd (Met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸). Peptydy, te faktycznie powstają w organizmie, i udało się je wyizolować z mózgu [11] oraz nadnerczy [20, 21]. Oprócz tego z nadnerczy wyodrębniono dłuższe peptydy, zawierające sekwencję Met-enkefallyny, zarówno na C jak i na N-końcu (Peptyd F) [25], sekwencję Met-enkefallyny oraz Leu-enkefallyny odpowiednio na N i C-końcu (Peptyd E) [24], a także, tzw. „peptydy krowich nadnerczy”: BAM-22P, BAM-20P [23] oraz BAM-12P [22]. Wszystkie one zawierają w swej strukturze podwójne reszty aminokwasów zasadowych. Fakt, że cięcie nie zachodzi we fragmentach zawierających pary aminokwasów zasadowych świadczy, że w reakcji tej biorą udział enzymy różne od trypsynopodobnych. Stężenie molarne w strukturach mózgu zwierząt i człowieka; Met-enkefallyny, Leu-enkefallyny, Met-enkefallyny-Arg⁶-Phe⁷ oraz Met-enkefallyny-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ jest większe niż pozostałych peptydów opioidowych, pochodzą-

cych z proenkefaliną. W mózgu występują więc głównie krótkie peptydy, oraz niewielka ilość BAM-12P [31, 33, 34]. W niektórych badaniach nie udało się wykryć, przy użyciu metod radioimmunologicznych, peptydów o wyższym ciężarze cząsteczkowym, tj. BAM-22P, Peptydu E i peptydu F [35]. Inne badania wskazują, że peptydy te występują jednak w mózgu chociaż w niewielkich ilościach [35, 36, 37]. W nadnerczach, przeciwnie niż w mózgu, znajdują się znaczne ilości peptydów o większym ciężarze cząsteczkowym i o dłuższym łańcuchu aminokwasów, takich jak BAM-22 i peptyd E [35, 38]. Fakt ten wskazuje na to, że w zależności od rodzaju tkanki, z prohormonu tworzą się różne produkty końcowe. Może to świadczyć również o udziale w tym procesie różnych enzymów, a także o tym, że odmienne produkty końcowe mogą pełnić istotną rolę w różnych układach funkcjonalnych.



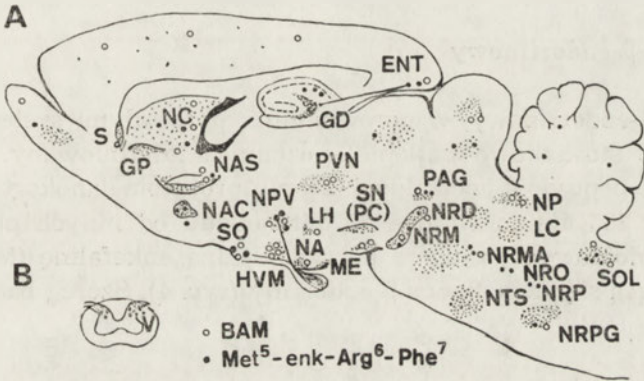
Ryc. 2. Rozmieszczenie Met-enkefalin-Arg⁶-Phe⁷ w strukturach mózgu szczura. (Stężenie przedstawiono w pmol/g tkanki).

Badania nad rozmieszczeniem neuropeptydów w strukturach mózgu, prowadzone są zasadniczo przy użyciu technik radioimmunologicznych oraz immunohistochemicznych. Przy użyciu tych pierwszych, zbadano zawartość peptydów proenkefalinowych; Met-enkefalin, Met-enkefalin-Arg⁶-Phe⁷ (ryc. 2) oraz Met-enkefalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ w szeregu struktur mózgu różnych gatunków zwierząt [31, 33, 39, 40, 41, 42, 43] jak i człowieka [33, 34, 40, 42]. Największą zawartość tych substancji stwierdzono w strukturach układu pozapiramidowego; w jądrze ogoniastym, gałce bladej, pokrywie i istocie czarnej. Wysokie stężenie występuje także w moście i śródmózgowiu. Peptydy te znajdują się również w dużej ilości w rdzeniu kręgowym zarówno u różnych gatunków zwierząt [44, 45] jak i u człowieka [46, 47].

W mózgu występują także niewielkie ilości BAM-12P [33]. Peptyd ten nie występuje jednak w rdzeniu kręgowym. U szczura w prążkowie i pod-

wzgorzu poziom BAM-12P jest stosunkowo niski, u człowieka natomiast jest on względnie wysoki [33, 45]. W mózgu szczura stwierdzono także niewielkie stężenie BAM-22P [33, 38] oraz peptydu F [38], podczas gdy w mózgu człowieka peptydy te są niewykrywalne [33]. W przysadce, zarówno zwierząt jak i człowieka nie występuje ani Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷, ani Met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ [33]. Stwierdzono tam natomiast wysokie stężenie Met- i Leu-enkefaliny [34, 48].

Komórki zawierające peptydy systemu proenkefalinowego występują w licznych strukturach mózgowych oraz w rdzeniu kręgowym i przysadce (ryc. 3). Peptydy te znajdują się głównie w małych komórkach o krótkich i cienkich aksonach, grupy których stwierdza się nieomal w całym mózgu. Występują one także sporadycznie w neuronach o długich aksonach jak to na przykład wykazano w przypadku enkefalin w rdzeniu kręgowym szczura [49]. Największe zagęszczenie zakończeń nerwowych zawierających te neuropeptydy znajduje się w gałce bladej oraz w środkowym jądrze migdałowatym [50, 51]. Neurony peptydergiczne należące do układu



Ryc. 3. Rozmieszczenie komórek i zakończeń nerwowych układu proenkefalinowego w mózgu (A) i rdzeniu kręgowym (B) szczura. ● ciała komórkowe zawierające Met-enkefalinę-Arg⁶-Phe⁷, ○ ciała komórkowe zawierające peptydy krowich nadnerczy (BAM), kropkami oznaczono zakończenia nerwowe zawierające peptydy systemu proenkefalinowego

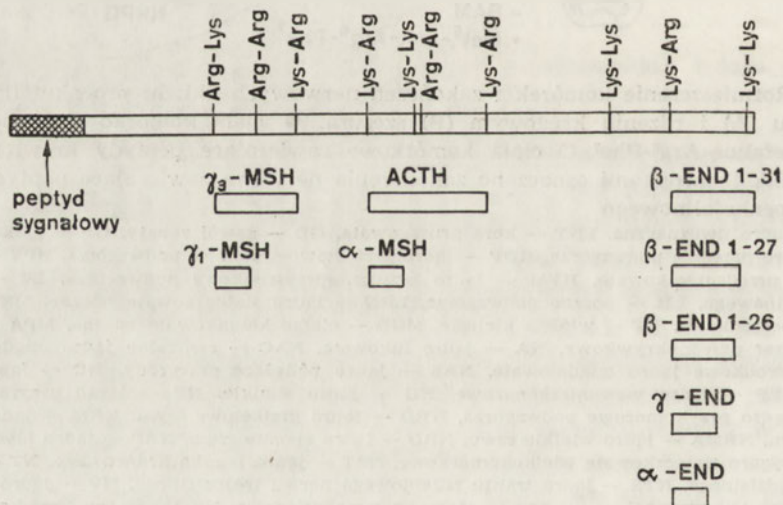
AMB — jądro dwuznaczne, ENT — kora gruszkowata, GD — zawój zębaty, GP — gałka bladeja, HA — jądro przednie podwzgórza, HDV — jądro grzbietowo-środkowe podwzgórza, HPV — jądro brzuszne przedsuteczkowe, HVM — jądro brzuszno-przysiodkowe podwzgórza, LC — jądro miejsca sinawego, LH — boczne podwzgórze, LRN — jądro siateczkowe boczne, ME — wyniosłość pośrodkowa, MF — włókna kiciaste, MGB — ciatko kolankowate boczne, MPA — środkowy obszar przedpokrywkowy, NA — jądro łukowate, NAC — centralne jądro migdałowate, NAM — środkowe jądro migdałowate, NAS — jądro połyżące przegrody, NC — jądro ogoniaste, NEP — jądro wewnątrzkroniarowe, NG — jądro smukłe, NP — jądro przyramienne, NPV — jądro przykomorowe podwzgórza, NRD — jądro grzbietowe szwu, NRM — jądro środkowe szwu, NRMA — jądro wielkie szwu, NRO — jądro ciemne szwu, NRP — jądro blade szwu, NRPG — jądro siateczkowe wielkokomórkowe, NST — jądro pęczka krańcowego, NT — jądro nerwu tójdzielnego, NTS — jądro traktu rdzeniowego nerwu tójdzielnego, NV — jądro błędne, OL — jądro oliwki, PAG — substancja szara okołowodociągowa, PVH — jądro okołokomorowe podwzgórza, PVN — jądro przykomorowe wzgórza, RLP — jądro siateczkowe drobnokomórkowe, S — przegroda, SN — istota czarna, SN(PC) — istota czarna (warstwa siateczkowata), SO — jądro nadwzrokowe, SOL — jądro pasma samotnego, ST — prążek krańcowy, VNC — jądro przedsionkowe. Oznaczenia też do Ryc. 6 i 9.

proenkefalinowego są szeroko rozprzestrzenione w mózgu [52, 53, 54], przysadce [55, 56] a także w rdzeniu kręgowym [57, 58].

Upřednie badania immunohistochemiczne wskazywały na identyczność lokalizacji niektórych produktów proenkefaliny tzn. Met-enkefaliny jak i Met-enkefaliny-Arg⁶-Phe⁷ w komórkach i włóknach nerwowych [59]. Obecne badania Williamsa i Dockray'a [60] dowodzą jednak, że w pewnych obszarach mózgu znajdują się komórki zawierające wyłącznie Met-enkefalinę-Arg⁶-Phe⁷, w innych natomiast Met-enkefalinę lub BAM-22P [36]. Wyniki tych badań skłaniają do przypuszczenia, że w niektórych neuronach produktem przechowywanym i nagromadzonym jest Met-enkefalina, w innych natomiast Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷ lub też peptydy BAM. Fakty te mogą wskazywać na zróżnicowanie dystrybucji różnych peptydów pochodnych proenkefaliny w mózgu, co może mieć znaczenie dla jego funkcji, tym bardziej że pochodzące z proenkefaliny peptydy wykazują odmienne powinowactwo do różnych receptorów opiatowych [61].

III. System β -endorfinowy

System β -endorfinowy, w porównaniu z pozostałymi systemami opioidowymi jest stosunkowo najlepiej poznany i zdefiniowany. Prohormon β -endorfiny i peptydów pochodnych zwany proopiomelanokortyną (POMC) składa się z 265 aminokwasów. W odróżnieniu od innych prohormonów systemów opioidowych, zawiera on tylko jedną enkefalinę (Met-enkefalinę), znajdującą się na N-końcu β -endorfiny (ryc. 4). Szereg badań nad bio-

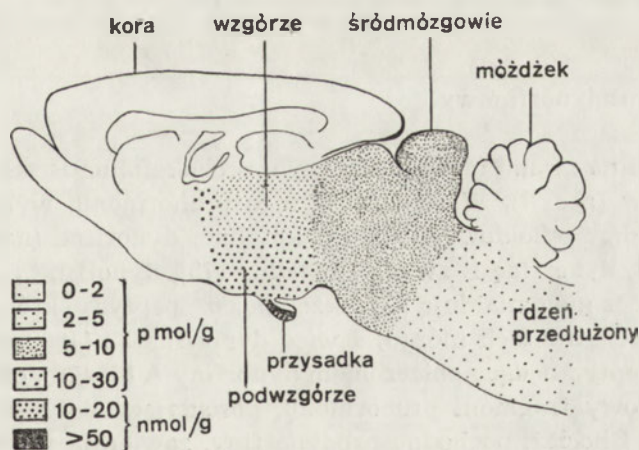


Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie proopiomelanokortyny i pochodzących z niej peptydów. γ_1 -MSH, γ_3 -MSH i γ -MSH — hormony melanotropowe, ACTH — hormon adrenokortykotropowy, α -END, β -END, γ -END — α -, β -, γ -endorfina.

syntezą tego prohormonu przeprowadzonych w płatach lub w hodowlach komórkowych pochodzących z przysadki, wskazuje na to, że z POMC wytwarzana jest początkowo β -lipotropina (hormon przejściowy), a następnie β -endorfina [62]. W badaniach *in vitro*, nie stwierdzono, żeby w przysadce z β -endorfiny powstawały α - i γ -endorfiny, chociaż obecność tych peptydów wykazano w tkance nerwowej [63, 64]. Wydaje się natomiast prawdopodobne, że β -endorfina jest dalej przekształcana w aktywne peptydy opioidowe o krótszym łańcuchu aminokwasów, takie jak β -endorfina₁₋₂₆ oraz β -endorfina₁₋₂₇ [65]. Wskazują na to badania nad rozmieszczeniem tych fragmentów oraz peptydu macierzystego w mózgu i przysadce, a w szczególności porównywanie ich wzajemnych stosunków ilościowych. W pewnych bowiem strukturach mózgowych przeważa β -endorfina₁₋₂₇ oraz β -endorfina₁₋₂₆, w innych natomiast β -endorfina [66]. Podobnie w przysadce szczura, w płacie pośrednim występują głównie krótsze fragmenty, a w płacie przednim β -endorfina. Prawdopodobne jest także, że z β -endorfiny mogą powstawać peptydy pozbawione działania opiatowego, ale aktywne biologicznie, takie jak des-Tyr¹- γ -endorfina [64] lub też N-końcowe fragmenty β -endorfiny, o których sądzi się, że mogą mieć znaczenie w reakcjach odpornościowych organizmu [67].

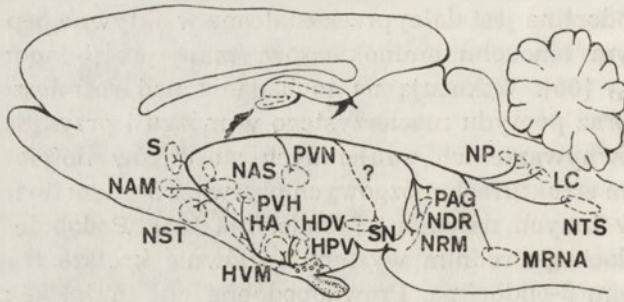
Rozmieszczenie β -endorfiny w mózgu jest zasadniczo podobne zarówno u zwierząt różnych gatunków jak i u człowieka [34, 68, 69]. Wielokrotnie większe niż w mózgu, stężenie β -endorfiny występuje w przysadce [70]. U szczura największe stężenie znajduje się w podwzgórzu, a następnie w przegrodzie, wzgórzu, śródmózgowiu oraz w moście (ryc. 5). W przysadce najwięcej β -endorfiny znajduje się w płacie pośrednio-tylnym, mniej w płacie przednim, brak jej natomiast w płacie tylnym [71].

Wyniki badań immunohistochemicznych zgodne są z wynikami badań radioimmunologicznych. W mózgu (w jądrze łukowatym podwzgórza) ist-



Ryc. 5. Rozmieszczenie β -endorfiny w strukturach mózgu i przysadce szczura. (Stężenie przedstawiono w pmol/g i nmol/g tkanki).

nieje zgrupowanie komórek zawierających β -endorfinę [72]. Komórki te wysyłają aksony do przodu, bocznie poniżej jądra brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza, aż do bocznej granicy podwzgórza, które następnie skręcają do tyłu wzdłuż linii środkowej, przykomorowo, by zakończyć się w strukturach pnia mózgu (ryc. 6).

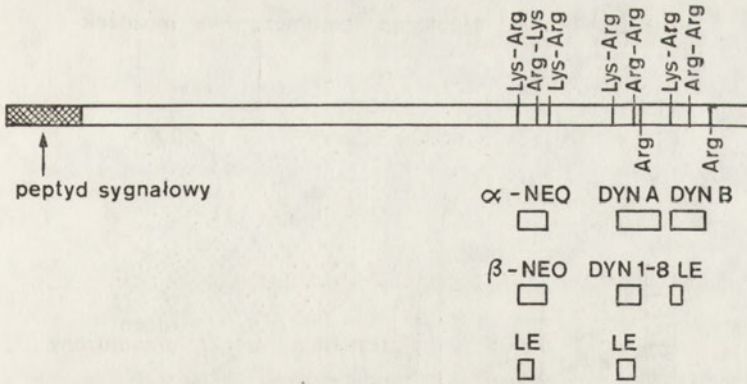


Ryc. 6. Schemat układu proopiomelanokortynowego w mózgu szczura. Oznaczenia struktur jak na rycinie 3.

Neurony tego systemu unerwiają szereg struktur podwzgórza: takich jak obszar przedwzrokowy, przednie podwzgórze, jądro brzuszno-przyśrodkowe i grzbietowo-środkowe, a także przegrodę i środkowe jądro migdałowe, pęczek krańcowy, przykomorowe jądro wzgórza, jądra szwu, boczne części substancji czarnej, szarą substancję okołowodociągową, jądro sinawe oraz jądro pasma samotnego. Wiele włókien znajduje się w wiązках aksonów adrenergicznych, zarówno w grzbietowej jak i brzusznej, jednakże biegną one w kierunku zstępującym [73]. W przysadce peptydy POMC znajdują się w komórkach gruczołowatych płata przedniego i pośredniego [65, 71]. Występowanie tych peptydów stwierdzono także ostatnio w komórkach nadnerczy człowieka [74].

IV. System prodynorfinowy

Prodynorfina zwana także początkowo proenkefaliną B składa się z 256 aminokwasów (ryc. 7). W strukturze tego prohormonu, wyróżnić można szereg peptydów opioidowych: Leu-enkefalinę, dynorfinę (nazwaną także dynorfiną A), dynorfinę B zwaną rimorfiną [75], dynorfinę $1-13$, i α -neoenendorfinę. Oprócz nich znajdują się także większe peptydy, których istnienie wykazano w ekstraktach mózgu, a więc dynorfina-32 (4000-daltonów dynorfina) — peptyd będący połączeniem dynorfiny A i B [76], oraz Leu-morfina (C-końcowy fragment prohormonu, posiadający na N-końcu dynorfinę B) [77]. Chociaż, pochodne prodynorfiny, zawierają w swej sekwencji pary aminokwasów zasadowych Arg-Lys (α -neoenendorfina), lub też Arg-Arg (zarówno dynorfina jak dynorfina B), nie są one w tych miej-



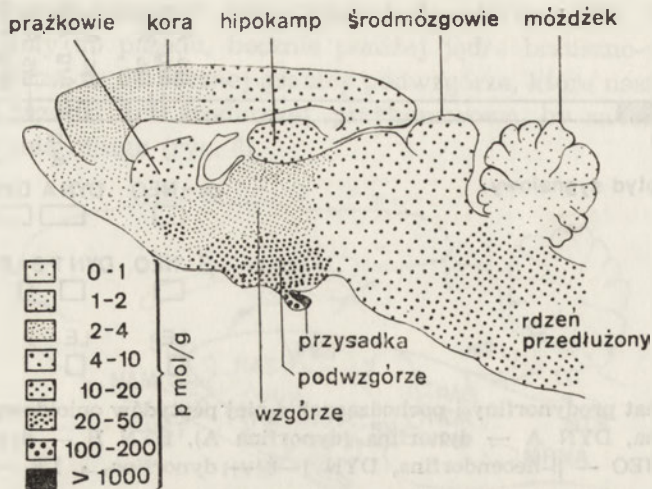
Ryc. 7. Schemat prodynorfiny i pochodzących z niej peptydów opioidowych. α -NEO — α -neoendorfina, DYN A — dynorfina (dynorfina A), DYN B — dynorfina B (rimorfina), β -NEO — β -neoendorfina, DYN 1-8 — dynorfina₁₋₈, LE — Leu-enkefalina.

scach rozszczepiane przez enzymy proteolityczne. Interesującym wydaje się także fakt, który początkowo, kiedy wskazywano na równoległość występowania α -neoendorfiny oraz dynorfiny w tkance mózgowej [78], nie został zauważony. W pewnych strukturach mózgu (prążkowie, śródmózgowie, kora, hipokamp) dynorfina jest w dużym stopniu przekształcana w dynorfina₁₋₈, stąd stężenie dynorfiny₁₋₈ (oraz α -neoendorfiny) w tych strukturach jest większe, w innych natomiast (rdzeń kręgowy i tylny płat przysadki) znajduje się więcej dynorfiny niż dynorfiny₁₋₈ [79]. Dane te mogą wskazywać na istnienie w strukturach ośrodkowego układu nerwowego, różnych dróg enzymatycznej proteolizy prodynorfiny, co w konsekwencji prowadzi do powstawania różnych produktów końcowych, które w odmienny sposób mogą wpływać na jego funkcje.

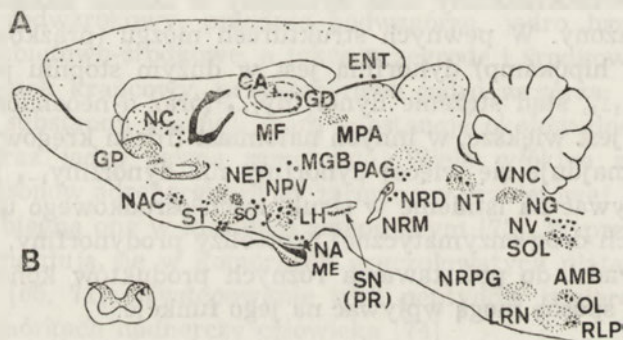
Dynorfina występuje w wielu strukturach mózgu (ryc. 8). Stosunkowo znaczną jej zawartość stwierdza się w podwzgórzu, jądrze migdałowatym, hipokampie, moście, pniu i rdzeniu przedłużonym, zarówno u zwierząt jak i u człowieka [78, 79, 80, 81, 82, 83]. Wysokie stężenie występuje także w rdzeniu kręgowym [46, 84]. Największe stężenie dynorfiny u zwierząt stwierdzono w części nerwowej przysadki [81, 82]. U człowieka jednakże poziom w tym rejonie nie należy do najwyższych [83], bowiem większe stężenie występuje w substancji czarnej, w przednim podwzgórzu, a także w rdzeniu kręgowym.

Neurony systemu prodynorfinowego podobnie jak proenkefalinowego znajdują się w wielu strukturach mózgowych [85, 86, 87, 88]. (Ryc. 9).

Istnienie ciał komórkowych neuronów zawierających dynorfina wykazano w szeregu strukturach mózgu a w szczególności w układzie limbicznym i podwzgórzu. Na szczególną uwagę zasługują zawierające dynorfina zakończenia nerwowe występujące w substancji czarnej, ponie-



Ryc. 8. Rozmieszczenie dynorfiny w strukturach mózgu i przysadce szczura. (Stężenie przedstawiono w pmol/g tkanki).



Ryc. 9. Schemat układu prodynorfinowego w mózgu (A) i rdzeniu kręgowym (B) szczura. Oznaczenia struktur jak na rycinie 3.

waż mogą one uczestniczyć w funkcji układu pozapiramidowego. Unerwiają one bowiem warstwę siateczkową, neurony układu proenkefalinowego, natomiast unerwiają warstwę zbitą. Położenie komórek, z których pochodzą te włókna nie jest jeszcze w pełni poznane. Określone, jak się wydaje, natomiast są drogi nerwowe z jądra przedwzrokowego, oraz jądra przykomorowego podwzgórza prowadzące do tylnego płata przysadki. Inna, poznana droga neuronalna, to włókna kiciaste (*mossy fibers*) w hipokampie [89]. Dynorfina znajduje się w zwoju zębatym tej struktury, w komórkach ziarnistych, które wysyłają swe aksony do komórek piramidowych obszaru CA₃ oraz CA₄. Komórki te są także unerwiane przez układ enkefalinowy, pochodzący z kory gruszkowatej. Zespół komórek

i włókien występuje również w rdzeniu kręgowym, w brzeżnej warstwie substancji galaretowatej oraz warstwie V, a więc w strukturach związanych z przewodnictwem bólowym [90].

V. Peptydy opioidowe i ich receptory

Receptory opioidowe są to miejsca w błonach neuronalnych, z którymi łączą się zarówno opiaty jak i peptydy opioidowe i poprzez nie, wywierają działanie biologiczne. W organizmie zarówno zwierząt jak i człowieka, mamy do czynienia z receptorami opioidowymi wielu typów. Nie jest jeszcze co prawda całkowicie jasne, czy są to oddzielne, niezależne od siebie molekuly, czy też kompleksy białkowe wchodzące w skład jednego receptora. W przeciwieństwie do uprzednich badań, które wskazywały na bardzo zróżnicowaną masę cząsteczkową receptorów opioidowych (od 23.000 do 700.000 daltonów), obecne prace przeprowadzone przy użyciu technik inaktywacji białek receptorowych poprzez ich irradiację, wskazują na bardzo zbliżoną (≈ 90.000 daltonów) masę cząsteczkową receptorów opiatowych różnych typów. Jest więc możliwe, że to samo białko receptorowe, jest miejscem działania różnych ligandów, chociaż jego właściwości fizykochemiczne mogą ulegać zmianom, zależnie od właściwości błon neuronalnych, w których się znajduje, co może w konsekwencji prowadzić do powstania receptorów opioidowych różnych typów [91].

Koncepcja istnienia różnych receptorów opioidowych, powstała w wyniku badań nad reakcjami psów, u których przecięto rdzeń kręgowy, na podanie różnych alkaloidów opiatowych. Na ich podstawie, Martin i jego koledzy [92, 93] zaproponowali istnienie trzech typów receptorów opioidowych: μ , κ , i σ . Według tych badaczy na receptory μ działa morfina i podobne do niej substancje, z receptorem κ oddziałują benzomorfiny, takie jak ketocyklazocyna, a dla receptora σ prototypowym ligandem jest N-allylo-norcyklazocyna (SKF-10047). Przypuszczenie to zostało potem szeroko potwierdzone przez badania nad siłą działania różnych opiatów w różnych testach, takich jak badania na narządach izolowanych, w których stwierdzono występowanie różnych receptorów, a także metody: behawioralne, elektrofizjologiczne oraz badanie wiązania specyficznych ligandów z błonami neuronalnymi [94, 95, 96, 97, 98].

Po odkryciu enkefalin, Kosterlitz i w s.p. wzbogacili tę listę o receptor δ [9], z którym mają one oddziaływać. Po wykryciu β -endorfiny natomiast, zaproponowano istnienie dla niej receptora ϵ , który znaleziono w powrózku nasiennym szczura [100]. Wydaje się jednak, że nie ma wyraźnych dowodów na istnienie tego receptora w ośrodkowym układzie nerwowym. Ponadto nowsze badania wskazują, że receptor σ nie jest, jak się wydaje, prawdziwie opiatowym receptorem [97, 98].

Przyjmuje się, że w ośrodkowym układzie nerwowym występują receptory trzech klas: μ , δ i κ które różnią się miejscem występowania, gęstością, a także powinowactwem w stosunku do różnych agonistów opiatowych. Powstaje pytanie, czy istniejące w układzie nerwowym endogenne systemy opioidowe, produkują specyficzne substancje, ligandy dla tych receptorów, i czy ich rozmieszczenie jest zgodne z występowaniem miejsc posiadających zdolność ich stereospecyficznego wiązania. Nie sposób, na ówczesnym etapie wiedzy, odpowiedzieć na to pytanie w sposób ostateczny. Obserwacje poczynione z jednej strony, w badaniach aktywności różnych peptydów na narządach izolowanych, z drugiej zaś, pomiary hamowania specyficznego wiązania różnych znakowanych ligandów opioidowych (wiążących się z poszczególnymi typami receptorów), zdają się jednak prowadzić do pewnych wniosków. Wydaje się mianowicie, że zarówno Met-enkefalina jak Leu-enkefalina, końcowe produkty proenkefaliny, wykazują znaczne powinowactwo do receptora opioidowego δ [39, 101]. Z drugiej strony, β -endorfina, która działa podobnie na jelito świnki morskiej (receptor μ) jak i powrózek nasienny myszy (receptor δ), a także w podobnym stopniu hamuje wiązanie ^3H -naloksonu (znakującego receptory μ), jak i związków znakujących receptory δ , wydaje się mieć powinowactwo do tych obu receptorów [102]. Z kolei, w bardzo przekonujący sposób udowodniono, że dynorfina a także inne peptydy pochodzące z prodynorfiny takie jak: α -neendorfina czy dynorfina $_{1-8}$, oddziałują z receptorem κ [103, 104, 105]. Jeszcze do niedawna nie było wiadomo, który z endogennych układów opioidowych wytwarza peptydy działające na receptor μ . Obecnie wydaje się, że mogą to być niektóre pośrednie peptydy z proenkefaliny, takie jak peptyd E oraz BAM-22P [61, 106, 107]. G á r z o n i w s p. [61] przeprowadzili ostatnio badania nad powinowactwem peptydów opioidowych receptorów opioidowych wobec różnych typów. Stwierdzono, że β -endorfina wykazuje największe powinowactwo do receptora μ , mniejsze do δ , a najmniejsze do κ . Fragment tego peptydu, pozbawiony dwu aminokwasów na C-końcu, wykazuje nieznacznie obniżone powinowactwo, jednak bez zasadniczej zmiany selektywności. Dalsze skracanie tego peptydu, powoduje spadek powinowactwa do receptorów μ i κ , co w konsekwencji, prowadzi do zwiększenia jego selektywności w stosunku do receptora δ . Tak więc w zależności od długości łańcucha, selektywność ulega zmianie. Zbadanie różnych peptydów pochodzących z proenkefaliny pozwoliło stwierdzić istotne różnice pomiędzy nimi. Pośrednie peptydy (peptyd E, BAM-22P, BAM-12P) charakteryzują się wyższym powinowactwem do receptorów μ i κ niż do δ . Peptydy o krótszym łańcuchu natomiast, takie jak Met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, lub Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷, cechuje mniejsze powinowactwo do tych receptorów. Powinowactwo peptydów do receptora δ , nie ulega przy tym istotnym zmianom, wraz ze skracaniem łańcucha. Inne cechy posiadają produkty prodynorfiny. Zarówno dynorfina B jak i dynorfina, mają wyższe powi-

nowactwo do receptora κ , niż do dwu pozostałych. α -Neoendorfina, jednakże, nie wykazuje jakiejś szczególnej preferencji do określonego receptora. Skracanie łańcucha dynorfiny, powoduje stopniowy spadek powinowactwa w stosunku do receptora κ (choć dla dynorfiny₁₋₈ powinowactwo ponownie nieznacznie wzrasta), a powinowactwo do receptora δ nie ulega dużym zmianom. Kiedy porównujemy siłę działania różnych peptydów opioidowych, to na receptory μ najsilniej wydaje się działać β -endorfina₁₋₂₉, BAM-12P, BAM-22P oraz peptyd E; na receptory δ α -neoendorfina, a na receptory κ dynorfina.

Dodatkowych danych dostarczyły badania nad wpływem różnych peptydów opioidowych na wywoływane drażnieniem elektrycznym, skurcze powrózka nasiennego królika [108], w którym stwierdzono występowanie jedynie receptorów κ [109]. Rezultaty tych badań ponownie wskazują, że zarówno proenkefalina jak i prodynorfina dają początek peptydom, które oddziałują z receptorem κ . Należy także podkreślić, że peptydy pochodzące z prodynorfiny działają silniej na ten receptor niż peptydy wywodzące się z proenkefaliny. β -endorfina jak i enkefaliny nie wykazują natomiast istotnego działania w tym teście.

Powyższe dane zdają się prowadzić do wniosku, że pośród peptydów opioidowych nie występują substancje specyficzne w stosunku do któregośkolwiek z omawianych receptorów opiatowych. Wszystkie one wiążą się z receptorem δ , chociaż enkefaliny są najbardziej selektywne w stosunku do tego podtypu receptora. Wydłużenie łańcucha peptydów, zarówno tych wywodzących się z proenkefaliny jak i prodynorfiny prowadzi do pewnego wzrostu selektywności w stosunku do dwóch pozostałych receptorów (μ , κ), przy czym w przypadku peptydów z prodynorfiny, w kierunku receptora κ (około dziesięciokrotnie) a w przypadku proenkefaliny w stosunku do receptora μ (około trzykrotnie).

Podsumowując, enkefaliny wydają się być więc względnie selektywne jako ligandy receptorów δ , a dłuższe peptydy z prodynorfiny jako ligandy receptorów κ (choć także mogą działać na receptory δ). Dłuższe peptydy pochodzące z proenkefaliny mogą działać głównie na receptory μ ale także κ i δ . β -Endorfina wydaje się działać w równym stopniu na receptory μ i δ , nie wpływa natomiast na receptory κ . Należy jednak podkreślić, że powyższa klasyfikacja może mieć ograniczone znaczenie w układach fizjologicznych, w których o oddziaływaniu peptydu z receptorem może decydować jego dostępność w okolicy danego receptora.

Porównanie danych dotyczące rozmieszczenia receptorów oraz stężenia peptydów opioidowych w różnych strukturach mózgu prowadzi do wniosku, że nie zachodzi tam prosta zależność: większa gęstość receptorów opioidowych — większe stężenie neuropeptydów. W pewnych obszarach mózgu bowiem, znajduje się wiele miejsc receptorowych, a niewielki jest poziom neuropeptydów. W korze mózgowej na przykład występuje dużo receptorów opioidowych szczególnie typu δ [96], jednakże poziom enke-

fałin jest tam stosunkowo niski [34]. Znajduje się tam również niewiele neuronów zawierających enkefalinę [110]. W jądrze ogoniastym natomiast, gdzie występuje wysokie stężenie zarówno peptydów jak i receptorów opioidowych, znajduje się niewiele zakończeń nerwowych zawierających peptydy opioidowe. Z drugiej strony, w gałce bladej jest niewiele receptorów [111], ale znaczne zagęszczenie neuronów zawierających peptydy opioidowe [112].

Zastanawiając się nad oddziaływaniem peptydów opioidowych z receptorami należy zwrócić uwagę także na następujące fakty: β -endorfina, a także jej C-końcowe fragmenty nie tylko wiążą się stereospecyficznie z nieopiodowym receptorem na limfocytach [67, 113], ale powodują ich proliferację [114]. Pozbawione tyrozyny analogi zarówno dynorfiny jak i β -endorfiny: des-Tyr¹-dynorfina oraz des-Tyr¹- γ -endorfina, które także nie wiążą się z receptorami opiatowymi, wykazują znaczne działanie biologiczne [115, 116, 117]. Tak więc, możliwość specyficznego, biologicznie istotnego oddziaływania peptydów opioidowych z receptorami nieopiodowymi wydaje się być bardzo prawdopodobna.

VI. Przeciwbólowe działanie peptydów opioidowych

Enkefalinę (po ich dokomorowym podaniu) działają albo słabo przeciwbólowo, mimo podawania ich w znacznych dawkach [118] lub też, jak stwierdzają inni autorzy, nie wpływają istotnie na percepcję bodźców bólowych [119, 120]. Brak wyraźnego przeciwbólowego działania tych substancji wydaje się być jednak związany ze szczególną ich podatnością na działanie enzymów proteolitycznych, gdyż bardziej odporne na degradację analogi wykazują właściwości przeciwbólowe [121]. Inne pochodzące z pro-enkefaliny peptydy, takie jak Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷, Met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ i BAM-12P wykazują pewne [106, 122], a peptydy o dłuższym łańcuchu takie jak BAM-22P, peptyd E oraz peptyd F silne działanie przeciwbólowe [106].

W odróżnieniu od enkefaliny, β -endorfina działa silnie przeciwbólowo a działanie to jest dłuższe i silniejsze od morfiny [123]. Modyfikacje tego peptydu, natomiast nie wpływają zasadniczo na zwiększenie siły działania, skracanie łańcucha powoduje spadek aktywności. Tak więc pełna sekwencja peptydu jest wymagana aby działał on przeciwbólowo.

Kontrowersyjne dane uzyskano badając potencjalne przeciwbólowe działanie peptydów pochodzących z prodynorfiny. Początkowo, po wykryciu dynorfiny spodziewano się jej silnego przeciwbólowego działania. Oparte to było na obserwacji, iż peptyd ten w testach *in vitro*, wykazywał aktywność wielokrotnie silniejszą niż enkefalinę [15]. Jednakże tylko nieliczne doniesienia opisują pewne przeciwbólowe działanie dynorfiny po jej dokomorowym podaniu [124, 125], w większości prac natomiast nie

stwierdza się istotnej przeciwbólowej aktywności tego peptydu [126, 127]. Co więcej, wykazano, że podana dokomorowo u myszy dynorfina, nie tylko nie działa przeciwbólowo, ale zapobiega przeciwbólowemu działaniu zarówno morfiny jak i β -endorfiny [127, 128]. Zaobserwowano, że substancja ta powoduje nasilenie przeciwbólowego działania morfiny i β -endorfiny u zwierząt, u których rozwinięto tolerancję na morfinę [128].

W odróżnieniu od działania na ośrodkowy układ nerwowy, dynorfina wykazuje wyraźne działanie przeciwbólowe po podaniu do rdzenia kręgowego [117, 126]. Działaniu takiemu towarzyszą pewne zmiany napięcia mięśniowego, które nie wydają się jednak być wynikiem wpływu peptydu na receptory opioidowe [117].

Powyższe dane wskazują na potencjalne przeciwbólowe działanie syntetycznych peptydów opioidowych. Czy znaczy to jednak, że endogenne peptydy opioidowe, których stężenie w mózgu jest znacznie niższe od tego które zwykle używa się w doświadczeniu farmakologicznym, uczestniczą w transmisji bodźców bólowych?

Niektóre fakty zdają się o tym świadczyć. Zarówno endogenne peptydy opioidowe, jak i ich receptory występują w szeregu strukturach ośrodkowego układu nerwowego, o których wiadomo, że biorą udział w percepcji bólu. Należą do nich grzbietowa część rdzenia, jądra szwu, szara substancja okołowodociągowa, a także wzgórze. Elektryczne drażnienie, niektórych z tych obszarów, zarówno u zwierząt jak i człowieka powoduje osłabienie wrażliwości na bodźce wywołujące ból [129, 130]. Działanie takie połączone jest zwykle ze zwiększeniem uwalniania β -endorfiny lub enkefalin do płynu mózgowo-rdzeniowego [131, 132]. Podobnie, zarówno mechaniczne jak i elektryczne drażnienie niektórych obszarów skóry, zwane akupunkturą, oprócz obniżenia wrażliwości na ból, powoduje również zwiększenie poziomu peptydów opioidowych w płynie mózgowo-rdzeniowym u człowieka [133]. W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono udziałowi endogennych opioidów w zmianach wrażliwości na ból, jakie mogą być wywołane stresem [134]. Obecnie wiadomo, że co najmniej w części tych zjawisk pośredniczą neuropeptydy. Świadczyć o tym może fakt że: 1) nalokson częściowo zapobiega efektom przeciwbólowym stresu [134]; 2) stresowi towarzyszy uwalnianie peptydów opioidowych z mózgu i przysadki [135, 136]. Szczególnie ważną rolę w tych zjawiskach przypisuje się raczej systemowi β -endorfinowemu niż innym systemom opioidowym. Stwierdzono bowiem, że stress powoduje uwalnianie tego peptydu zarówno z mózgu jak i z przysadki, oraz, że zniszczenie komórek podwzgórza zawierających β -endorfinę osłabia znacznie przeciwbólowe efekty wywołane stresem [137]. Układ dynorfinowy, szczególnie ten zlokalizowany w rdzeniu kręgowym wydaje się także ulegać pewnym zmianom w wyniku stresu [138]. Rola mózgowych enkefalin, natomiast, a tym bardziej innych peptydów systemu proenkefalinowego w przeciwbólowym działaniu stresu, nie jest jeszcze w pełni poznana, a uzyskane do tej pory

dane są kontrowersyjne [135, 139]. Interesująca wydaje się jednak obserwacja, że usunięcie nadnerczy osłabia działanie przeciwbólowe stresu [140], co może wskazywać na udział nadnerczowych peptydów proenkefalinowych w tym zjawisku. Tak więc wydaje się, że endogenne systemy opioidowe biorą udział w modulacji bodźców bólowych.

VII. Peptydy opioidowe a zależność od opiatów

Wykrycie peptydów opioidowych stworzyło nadzieję na poznanie mechanizmów leżących u podstaw zarówno tolerancji jak i zależności od opiatów. W początkowych badaniach nad rolą endogennych peptydów opioidowych w tym zjawisku stwierdzono, że wielokrotne, domózgowe podawanie enkefalin lub β -endorfiny, w ilościach co prawda daleko większych niż występujące w organizmie, prowadzi do rozwoju tolerancji, a także do zależności podobnej do tej, jaką wywołuje morfina [141, 142]. Z drugiej strony peptydy te nie działały u zwierząt, u których rozwinięto tolerancję na morfinę. Dane te sugerują, że endogenne peptydy opioidowe pochodząc z proenkefalin lub proopiomelanokortyny wywołują tolerancję i zależność poprzez receptory opioidowe, w sposób podobny do syntetycznych opiatów. Dynorfina jednak wydaje się działać inaczej. Podana dokomorowo, powoduje u zwierząt hamowanie przeciwbólowego działania zarówno morfiny jak i β -endorfiny, podczas gdy u zwierząt zależnych od morfiny nasila jej przeciwbólowe działanie [127, 128]. Peptyd ten potęguje wywołaną morfiną depresję oddechu, a osłabia ją u zwierząt, u których podawano chronicznie morfinę (H. Loh — informacja osobista). Z drugiej strony, substancja ta wydaje się skutecznie zastępować morfinę u zwierząt uzależnionych, nie wywołując zarazem objawów abstynencji po jej odstawieniu [143]. Jak więc działa dynorfina i peptydy jej podobne w stanach zależności i tolerancji na opiaty? Peptyd ten, wydaje się modulować działanie agonistów opioidowych, szczególnie tych działających na receptor μ , w taki sposób aby zachować podobną wrażliwość receptora w różnych jego stanach. Chociaż pełne poznanie tego oddziaływania wymaga dalszych badań, to jednak obserwacje powyższe wydają się mieć istotne znaczenie, mogą bowiem doprowadzić do lepszego poznania dróg kontroli i regulacji stopnia tolerancji i zależności od opiatów przez endogenne układy opioidowe.

Badania nad zmianami poziomu endogennych peptydów opioidowych w zjawiskach abstynencji, oraz uzależnienia od opiatów, dostarczyły danych, które wskazują, że systemy opioidowe ulegają zmianom w tych stanach. Długotrwałe podawanie morfiny prowadzi nie tylko do drastycznego spadku poziomu β -endorfiny, szczególnie w pośrednim płacie przysadki, ale także do spadku poziomu tego peptydu oraz Met-enkefalin, w niektórych strukturach mózgu szczura [144]. Zmianom tym towarzyszy także obniże-

nie poziomu β -endorfiny we krwi [135]. Spadek poziomu tego peptydu we krwi stwierdzono także u heroinistów [146]. Należy jednak zaznaczyć, że niektórzy autorzy nie obserwowali istotnych zmian w poziomie enkefalin oraz β -endorfiny w przysadce, po chronicznym podawaniu innych opiatów lub też po krótkotrwałym podawaniu morfiny [147, 148].

Informacje dotyczące zmian zachodzących w systemie dynorfinowym są bardzo skąpe i kontrowersyjne. Obserwowano bowiem, albo nieznaczny wzrost poziomu tego peptydu w strukturach mózgu u szczurów uzależnionych od morfiny [149], lub też nie stwierdzano zmian [150, 151]. Tak więc, chociaż zagadnienie udziału endogennych systemów opioidowych w stanach uzależnienia od opiatów wymaga dalszych badań, wydaje się, że w układzie β -endorfinowym (a być może także proenkefalinowym) dochodzi do osłabienia aktywności, połączonego z obniżeniem syntezy tego peptydu i, a być może także od dysfunkcji tego systemu.

Ponieważ endogenne peptydy opioidowe wywołują podobnie jak morfina stan uzależnienia, powstaje pytanie czy w wyniku zwiększonej aktywacji układów (np. w warunkach długotrwałego stresu) może dochodzić do zjawisk zależności od endogennych opioidów. Niektóre dane, wydają się przemawiać za taką możliwością. Stwierdzono bowiem, że wywołane stresem zmiany wrażliwości na bodźce bólowe, w których wydają się uczestniczyć endogenne peptydy opioidowe, ulegają osłabieniu w wyniku częstego stosowania bodźców je wywołujących. Co więcej, u zwierząt poddawanych chronicznym stanom stresowym, można niekiedy obserwować oznaki odstawienia takie jak po podaniu naloksonu u zwierząt uzależnionych [147]. Fakty te wydają się przemawiać za możliwością powstawania, w pewnych warunkach, zarówno tolerancji jak i uzależnienia od endogennych peptydów opioidowych. To przypuszczenie może dalej prowadzić do poglądu, że w stanach zależności organizmu wytworzonych przez czynniki zarówno zewnętrzne jak i endogenne, istotną rolę mogą odgrywać zmiany zachodzące w endogennych systemach opioidowych i ich receptorach.

VIII. Uwagi końcowe

Dziesięciolecie, które upłynęło od czasu wykrycia enkefalin, zaowocowało niezwykle dużą ilością informacji o peptydach opioidowych. Poznano bowiem wiele różnych peptydów opioidowych, a także prohormony z których one pochodzą. Zbadano ich właściwości chemiczne, rozmieszczenie w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, ich receptory i właściwości farmakologiczne. Nadal niewiele jednak wiadomo o specyficznym znaczeniu fizjologicznym tych substancji. Wczesne nadzieje na szybkie poznanie ich roli, postulowane przecież w szeregu funkcjach układu nerwowego, nie całkiem się spełniły. Wynika to z braku, jak do tej pory, adekwatnych metod oceny aktywności endogennych systemów opioido-

wych. Biosynteza i obrót peptydów opioidowych w mózgu, nie są dotychczas poznane, chociaż czyni się pewne obiecujące kroki w tym kierunku. Badania nad uwalnianiem peptydów z mózgu (w odróżnieniu od przysadki gdzie uczyniono pewien postęp) są nieliczne a mechanizmy uwalniania prawie nieznanne. Brak jest wreszcie narzędzi farmakologicznych, a więc specyficznych egzogennych substancji agonistycznych i antagonistycznych różnych receptorów opioidowych. Badania nad rolą peptydów opioidowych w funkcjonowaniu mózgu polegają więc głównie na pomiarze zmian ich poziomu w tej tkance, w różnych fizjologicznych i patologicznych stanach, na pomiarach zmian zachodzących w receptorach, oraz na badaniach wpływu syntetycznych peptydów na czynności organizmu. Jednakże, na podstawie zmian neuropeptydów nie w pełni potrafimy odpowiedzieć na pytanie o stan aktywności endogennych systemów opioidowych. Badania receptorowe nie mogą odpowiedzieć na pytania o zachodzące pomiędzy peptydem a receptorem oddziaływania. Wreszcie badanie efektów peptydów, zwykle w ilościach farmakologicznych, a nie fizjologicznych, prowadzi jedynie do ograniczonych wniosków, biorąc pod uwagę ich stosunkowo niewielką specyficzność, a także co dalej komplikuje sytuację, ich przypuszczalne oddziaływanie z receptorami nieopiatowymi.

Zdając sobie sprawę z powyższych ograniczeń, które miejmy nadzieję, zostaną w najbliższym czasie pokonane, nie możemy jednak nie docenić roli peptydów opioidowych w wielu podstawowych funkcjach ośrodkowego układu nerwowego takich jak: zapobieganie bólowi, pobieranie pokarmu, regulacja hormonalna, regulacja ciśnienia, temperatury i oddychania. Trudno jest zresztą, we współczesnej literaturze przedmiotu znaleźć chociażby jedną funkcję mózgu, w której istotne zaangażowanie układów opioidowych nie byłoby postulowane. Endogenne systemy opioidowe uczestniczą więc prawdopodobnie w wielu funkcjach organizmu, a działanie peptydów, które są w nich wytwarzane, wybiega daleko poza to, które wywołują syntetyczne opiaty. Szczególną rolę wydają się one spełniać w stanach zaburzonej homostazy organizmu, w warunkach stresu lub chorobie. W stanach równowagi natomiast wydają się być mniej aktywne.

Zaakceptowano do druku 28 marca 1985 r.

PISMIENICTWO

1. Reynolds D. V., (1969), *Science*, **164**, 444—445.
2. Akil H., Mayer D. I., Liebeskind J. C., (1976), *Science*, **191**, 961—962.
3. Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1947—1949.
4. Goldstein A., Lowney L. I., Pal B. K., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1742—1747.
5. Terenius L., (1973), *Acta Pharmacol. Toxicol.* (Copenh.), **32**, 317—320.
6. Pert C. B., Snyder S. H., (1973), *Science*, **179**, 1011—1014.

7. Terenius L., Wahlström A., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1759—1764.
8. Hughes J., (1975), *Brain Res.*, **88**, 295—308.
9. Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1765—1769.
10. Cox B. M., Opheim K. E., Teschemacher H., Goldstein A., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1777—1782.
11. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R., (1975), *Nature*, **258**, 577—579.
12. Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., Bridesall N. J. M., Hulme E. C., (1976), *Nature*, **260**, 793—795.
13. Li C. H., Chung D., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1145—1148.
14. Guillemain R., Ling N., Burgus R., (1976), *C. R. Acad. Sci.*, (Paris) **274**, 783—785.
15. Goldstein A., Tachibana S., Lowney L. T., Hunkapiller M., Hood L., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6666—6670.
16. Goldstein A., Fischli W., Lowney L. I., Hunkapiller M., Hood L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7219—7223.
17. Tachibana S., Araki K., Ohya S., Yoshida S., (1982), *Nature*, **295**, 339—340.
18. Kangawa K., Minamino N., Chino N., Sakakibara S., Matsuo H., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 871—878.
19. Minamino N., Kangawa K., Fukuda A., Matsuo H., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 864—870.
20. Stern A. S., Lewis R. V., Kimura S., Rossier J., Gerber L. D., Brink L., Stein S., Udenfriend S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6680—6683.
21. Kilpatrick D. L., Jones B. N., Kojima K., Udenfriend S., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 698—705.
22. Mizuno K., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1482—1488.
23. Mizuno K., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1283—1290.
24. Kilpatrick D. L., Taniguchi T., Jones B. N., Stern A. S., Shively Y. E., Hullihan Y., Kimura S., Stein S., Udenfriend S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3265—3268.
25. Lewis R. V., Stern A. S., Kimura S., Rossier J., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Science*, **208**, 1459—1461.
26. Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A. C. Y., Cohen S., Numa S., (1979), *Nature*, **278**, 423—427.
27. Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda M., Morimoto Y., Hirose T., Asai H., Inayama S., Nakanishi S., Numa S., (1982), *Nature*, **298**, 245—249.
28. Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S., Numa S., (1982), *Nature*, **295**, 202—206.
29. Comb M., Seeburg P. H., Adelman I., Eidon L., Hebert E., (1982), *Nature*, **295**, 663—665.
30. Gubler U., Seeburg P., Hoffman B. J., Gage L. P., Udenfriend S., (1982), *Nature*, **295**, 206—208.
31. Yang H.-Y. T., Hong J. S., Costa E., (1977), *Neuropharmacol.*, **16**, 303—307.
32. Khachaturian H., Lewis M. E., Watson S. J., (1983), *Brain Res.*, **279**, 368—373

33. Pittius Ch. W., Seizinger B. R., Pasi A., Mehraein P., Herz A., (1984), *Brain Res.*, (w druku).
34. Gramsch Ch., Höllt V., Mehraein P., Pasi A., Herz A., (1979), *Brain Res.*, **171**, 261—270.
35. Lindberg I., Yang H.-Y. T., Costa E., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl. I, 5—9.
36. Bloch B., Baird A., Ling N., Benoit R., Guillemin R., (1983), *Brain Res.*, **263**, 251—257.
37. Baird A., Ling N., Bohlen P., Benoit R., Klepper R., Guillemin R., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2023—2025.
38. Höllt V., Haarmann I., Grimm C., Herz A., Tulunay F. C., Loh H., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1883—1886.
39. Wesche D., Höllt V., Herz A., (1977), *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **301**, 79—82.
40. Rossier J., Audigier Y., Ling N., Cros J., Udenfriend S., (1980), *Nature*, **288**, 88—90.
41. Hong J. S., Yang H.-Y. T., Fratta W., Costa E., (1977), *Brain Res.*, **134**, 383—386.
42. Ikeda Y., Nakao K., Yoshimasa T., Sakamoto M., Suda M., Yanaihara N., Imura H., (1983), *Life Sci.*, **33**, 65—68.
43. Yang H.-Y. T., Panula P., Tang J., Costa E., (1983), *J. Neurochem.*, **40**, 969—976.
44. Majane E. A., Iadarola M. J., Yang H.-Y. T., (1983), *Brain Res.*, **264**, 336—339.
45. Cesselin F., Montastruc J. L., Gros C., Bourgoin S., Hamon M., (1980), *Brain Res.*, **191**, 289—293.
46. Przewłocki R., Gramsch C., Pasi A., Herz A., (1983), *Brain Res.*, **280**, 95—103.
47. Pittius C. W., Seizinger B. R., Mehraein P., Pasi A., Herz A., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl. I, 41—44.
48. Duka T., Höllt V., Przewłocki R., Wesche D., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 1119—1127.
49. Hökfelt T., Terenius L., Kuypers H. G. J. M., Dann O., (1979), *Neurosci. Lett.*, **14**, 55—60.
50. Pickel V. M., Sumal K. K., Beckley S. C., Miller R. J., Reis D. J., (1982), *J. Comp. Neurol.*, **189**, 721—740.
51. Wamsley J. K., Young W. S., Kuhar M. J., (1980), *Brain Res.*, **190**, 153—174.
52. Sar M., Stumpf W. E., Miller R. J., Chang K. J., Cuatrecasas P., (1978), *J. Comp. Neurol.*, **182**, 17—38.
53. McGinty J. F., Henriksen S. J., Goldstein A., Terenius L., Bloom F. E., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1797—1800.
54. Finley J. C. W., Maderdrut J. L., Petrusz P., (1981), *J. Comp. Neurol.*, **198**, 541—565.
55. Rossier J., Battenberg E., Pittman Q., Bayon A., Koda L., Miller R., Guillemin R., Bloom F., (1979), *Nature*, **277**, 653—655.
56. Vanderhaegen J. J., Lotstra F., Liston D. R., Rossier J., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5139—5143.
57. Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L., (1977), *Neurosci. Lett.*, **5**, 25—31.
58. Elde R., Hökfelt T., Johansson O., Terenius L., (1976), *Neuroscience*, **1**, 349—351.

59. Weber E., Evans C. J., Samuelsson S. J., Barchas J. D., (1981), *Science*, **214**, 1248—1251.
60. Williams R. G., Dockray G. J., (1983), *Neuroscience*, **9**, 563—586.
61. Garzón J., Sánchez-Blázquez P., Höllt V., Lee N. M., Loh H. H., (1983), *Life Sci.*, **33**, Sup. I, 291—294.
62. Mains R. E., Eipper R. A., Ling N., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3014—3018.
63. Guillemin R., Ling N., Lazarus L., Burgus R., Minick S., Bloom F., (1977), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **297**, 131—157.
64. Verhoeft I., Viegant V. M., De Wied D., (1982), *Brain Res.*, **231**, 454—460.
65. Zakarian S., Smyth D. G., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5972—5976.
66. Zakarian S., Smyth D. G., (1982), *Nature*, **296**, 250—252.
67. Schweigerer L., Bhakdi S., Teschemacher H., (1982), *Nature*, **296**, 572—577.
68. Rossier J., Vargo T. M., Minick S., Ling N., Bloom F. E., Guillemin R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5162—5165.
69. Przewłocki R., Gramsch C., Höllt V., Millan M. J., Osborne H., Herz A., (1980), w: *Neuropeptides and Neural Transmission* red. Marsan C. A., Traczyk T. W. IBRO Monographs Series, t. 7, str. 245—256, New York Raven Press.
70. Fratta W., Yang H.-Y. T., Majane B., Costa E., (1979), *Neuroscience*, **4**, 1903—1908.
71. Bloom F., Battenberg E., Rossier I., Ling N., Guillemin R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **3**, 1591—1595.
72. Bloom F., Battenberg E., Rossier I., Ling N., Guillemin R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1591—1595.
73. Bloom F., Battenberg E. L., Rossier J., Ling N., Leppaluoto J., Vargo T. M., Guillemin R., (1977), *Life Sci.*, **20**, 43—48.
74. Evans Ch. J., Erdelyi E., Weber E., Barchas J. D., (1983), *Science*, **221**, 957—960.
75. Kilpatrick D. L., Wahlström A., Lahm H. W., Blacher R., Udenfriend S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6480—6483.
76. Fischli W., Goldstein A., Hunkapiller M. W., Hood L. E., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5435—5437.
77. Nakao K., Suda M., Sakamoto M., Yoshimasa T., Ikeda I., Yanaihara N., Numa S., Imura H., (1983), International Narcotics Research Conference, Garmisch-Partenkirchen, June 26 — July 1, Abstract L—4.
78. Maysinger D., Höllt V., Seizinger B. R., Mehraein P., Pasi A., Herz A., (1982), *Neuropeptides*, **2**, 211—225.
79. Weber E., Evans Ch. J., Barchas J. D., (1982), *Nature*, **299**, 77—79.
80. Molineaux C. J., Feuerstein G., Faden A. L., Cox B. M., (1982), *Neurosci. Lett.*, **33**, 179—184.
81. Höllt V., Haarmann I., Boverman K., Jerlicz M., Herz A., (1980), *Neurosci. Lett.*, **18**, 149—153.
82. Goldstein A., Ghazarossian V. E., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6207—6210.
83. Gramsch C., Höllt V., Mehraein P., Pasi A., Herz A., (1982), *Brain Res.*, **233**, 65—74.
84. Boticelli L. I., Cox B. M., Goldstein A., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7783—7786.

85. Khachaturian H., Watson S. I., Lewis M. E., Coy D., Goldstein A., Akil H., (1982), *Peptides*, **3**, 941—954.
86. Weber E., Roth K. A., Barchas J. D., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3062—3066.
87. Watson S. I., Khachaturian H., Akil H., Coy D. H., Goldstein A., (1982), *Science*, **218**, 1134—1136.
88. McGinty J. F., van der Kooy D., Koda L. Y., Bloom F. E., (1982), *Anat. Rec.*, **202**, 125A.
89. McGinty J. F., Henriksen S. J., Goldstein A., Terenius L., Bloom F. E., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 589—593.
90. Vincent S. R., Hökfelt T., Christensson I., Terenius L., (1982), *Neurosci. Lett.*, **33**, 185—190.
91. Ott S., Costa T., Hietel B., Schlegel W., Wüster M., (1983), *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, **324**, 160—162.
92. Martin W. R., Eades C. G., Thompson J. A., Huppler R. E., Gilbert P. E., (1976), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **197**, 517—532.
93. Gilbert P. E., Martin W. R., (1976), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **198**, 66—82.
94. North R. A., (1979), *Life Sci.*, **24**, 1527—1546.
95. Simon E., Hiller J. M., (1978), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **18**, 371—394.
96. Goodman R. R., Snyder S. H., Kuhar M. I., Young W. S. III., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6239—6243.
97. Wood P. L., (1982), *Neuropharmacol.*, **21**, 487—497.
98. Zukin R. S., Zukin S. R., (1981), *Life Sci.*, **29**, 2681—2690.
99. Lord J. A. H., Waterfield A. A., Hughes I., Kosterlitz H. W., (1977), *Nature*, **267**, 495—499.
100. Schulz R., Fasse E., Wüster M., Herz A., (1979), *Life Sci.*, **24**, 843—850.
101. Kosterlitz H. W., Lord I. A., Paterson S. I., Waterfield A. A., (1980), *Br. J. Pharmacol.*, **68**, 333—342.
102. Smith A. P., Lee N. M., Loh H. H., (1983), *Trends Pharmacol. Sci.*, **4**, 163—164.
103. Chavkin C., James I. F., Goldstein A., (1982), *Science*, **215**, 413—415.
104. Wüster M., Schulz R., Herz A., (1980), *Neurosci. Lett.*, **20**, 79—83.
105. Corbett A. D., Paterson S. J., McKnight A. T., Magnan J., Kosterlitz H. W., (1982), *Nature*, **299**, 79—81.
106. Höllt V., Tulunay C., Woo S. K., Loh H. H., Herz A., (1982), *Eur. J. Pharmacol.*, **85**, 355—356.
107. Höllt V., (1983), *Trends in Neurosci.*, **6**, 24—26.
108. Rezvani A., Höllt V., Way L., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl. I, 271—274.
109. Oka T., Negishi K., Suda M., Matsumya T., Inazu T., Nebi M., (1980), *Eur. J. Pharmacol.*, **73**, 235—236.
110. Wamsley J. K., Zarbin M. A., Young III W. S., Kuhar M. J., (1982), *Neuroscience*, **7**, 595—613.
111. Pickel V. M., Sumal K. K., Beckley S. C., Miller R. Y., Reis D. Y., (1980), *J. Comp. Neurol.*, **189**, 721—740.
112. Lewis M. E., Khachaturian H., Watson S. I., (1983), *Life Sci.*, **33**, 239—242.
113. Hazum E., Chang K. J., Cuatrecasas P., (1979), *Science*, **205**, 1033—1035.
114. Gilaman S. C., Schwartz J. M., Milner R. J., Bloom F. E., Feldman R. J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4226—4230.
115. Van Ree J. M., De Wied D., (1981), *Neuropharmacol.*, **20**, 1271—1277.

116. Walker J. M., Moises H. C., Coy D. H., Baldrigh G., Akil H., (1982), *Science*, **218**, 1137—1138.
117. Przewłocki R., Shearman G. T., Herz A., (1983), *Neuropeptides*, **3**, 233—240.
118. Belluzzi J. D., Grant N., Garsky F., Sarantakis D., Wise C. D., Stein L., (1976), *Nature*, **260**, 625—626.
119. Dewey W. L., Chan-Pham T. T., Day A., Lujan M., Harris L. S., Freer R. J., (1976), w: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides* red. Kosterlitz H. str. 103-110 North—Holland Publishing Company, Amsterdam.
120. Jacquet Y., Marks N., Li C. H., (1976) w: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides* red. Kosterlitz H. str. 411—414, North—Holland Publishing Company, Amsterdam.
121. Coy D. H., Kastin A. J., Walker M. J., McGivern R. F., Sandman C. A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 977—1002.
122. Inturrisi C. K., Umans T., Wolff D., Stern A. S., Lewis P. V., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5514—5515.
123. Loh H. H., Tseng L. F., Wei E., Li C. H., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2895—2899.
124. Hayes A. G., Skingle M., Tyers M. B., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl. I, 657—660.
125. Kaneko T., Nakazawa T., Ikeda H., Yamatsu K., Iwama T., Wada T., Satoh M., Takagi M., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl. I, 661—664.
126. Piercey M. F., Varner K., Schroeder L. A., (1982), *Eur. J. Pharmacol.*, **80**, 283—284.
127. Friedman H. J., Jen M. F., Chang Y. K., Lee N. M., Loh H. J., (1981), *Eur. J. Pharmacol.*, **69**, 357—360.
128. Tulunay F. V., Jen M. F., Chang J. K., Loh H. H., Lee N. M., (1981), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **219**, 296—298.
129. Richardson D. R., (1982), *Appl. Neurophysiol.*, **45**, 116—122.
130. Hosobuchi V., Adams J., Linchitz R., (1977), *Science*, **197**, 183—186.
131. Hosobuchi Y., Rossier I., Bloom F. E., Guillemin R., (1979), *Science*, **203**, 279—281.
132. Akil H., Richardson D., Hughes I., Barchas I., (1978), *Science*, **201**, 463—465.
133. Clement-Jones V., McLouhlin L., Tomlin S., (1980), *Lancet*, **2**, 946—948.
134. Akil H., Madden I., Patrick R., Barchas I., (1976), w: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides* red. Kosterlitz H., str. 63—70, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
135. Millan M. J., Przewłocki R., Jerlicz M., Gramsch C., Höllt V., Herz A., (1981), *Brain Res.*, **208**, 325—338.
136. Guillemin R., Vargo T., Rossier I., Minick S., Ling N., Rivier C., Vale W., Bloom F., (1977), *Science*, **197**, 1367—1369.
137. Millan M. J., Gramsch C., Przewłocki R., Höllt V., Herz A., (1980), *Life Sci.*, **27**, 1513—1523.
138. Millan M. I., Tsang Y. F., Przewłocki R., Höllt V., Herz A., (1981), *Neurosci Lett.*, **24**, 75—79.
139. Rossier I., Guillemin R., Bloom F. E., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **48**, 465—466.
140. Lewis I. W., Tordoff M. G., Sherman I. E., Liebeskind I. C., (1982), *Science*, **217**, 557—559.

141. Wei E., Loh H., (1976), *Science*, **193**, 1262—1264.
142. Huidobro-Toro J. P., Way E. L., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **52**, 179—189.
143. Khazan N., Young G. A., Calligaro D., (1983), INRC International Narcotic Research Conference, Garmisch-Partenkirchen, June 2 — July 1, Abstract L46.
144. Przewłocki R., Höllt V., Duka T., Kleber G., Gramsch Ch., Haarman I., Herz A., (1979), *Brain Res.*, **174**, 357—361.
145. Ho W. W. K., Wen H. L., Ling N., (1980), *Neuropharmacology*, **19**, 117—121.
146. Höllt V., Emrich H. M., Bergmann M., Nedopil N., Dieterle D., Gurland H. J., Nusselt L., von Zerssen D., Herz A., (1982), w: *Endorphins and Opiate Antagonists in Psychiatric Research* red. Shah N. S., Donald A. G., str. 231—244, Plenum Press, New York.
147. Christie M. I., Chesher G. B., (1982), *Life Sci.*, **30**, 1173—1178.
148. Wüster M., Schulz R., Herz A., (1980), *Brain Res.*, **189**, 403—411.
149. Höllt V., Seizinger B., Herz A., (1981), w: *Advances in Endogenous and Exogenous Opioids*, INRC, July 26—30, Kyoto, Japan, Abstract 0—22.
150. Przewłocki R., Lason W., Stach R., Kacz D., Stala L., Przewłocka B., (1981), w: *International Narcotic Research Conference*, Kyoto, July 26—30, Abstract P—32.
151. Ho W. K. K., Wan C. C., Chan W. Y., Cheung W. K., Kwok K. Y., Wen H. L., (1982), *Pharmacol. Res. Commun.*, **14**, 861—866.

ZBIGNIEW S. HERMAN *)

Działanie farmakologiczne neurotensyny, substancji P i tuftsyny

Pharmacological action of neurotensin, substance P and tuftsin

Spis treści

I. Neurotensyna

I-1. Odkrycie i budowa

I-2. Rozmieszczenie neurotensyny

I-3. Wpływ dożylnego podania neurotensyny na układ krążenia

I-4. Rola neurotensyny w przewodzie pokarmowym

I-5. Efekty hormonalne neurotensyny

I-6. Działanie neurotensyny na ośrodkowy układ nerwowy

I-7. Działanie neurotensyny na neurony dopaminowe

II. Substancja P

II-1. Rozmieszczenie substancji P w ośrodkowym układzie nerwowym

II-2. Biosynteza i metabolizm

II-3. Receptory substancji P

II-4. Rola w przekazywaniu impulsów nerwowych

II-5. Wpływ ośrodkowego podania substancji P na odczuwanie bólu

II-6. Interakcje substancji P z acetylocholiną lub dopaminą

III. Tuftsyna

III-1. Rola fizjologiczna tuftsyny w procesach odpornościowych

III-2. Efekty ośrodkowe tuftsyny

Contents

I. Neurotensin

I-1. Discovery and structure.

I-2. Distribution of neurotensin.

I-3. Influence of intravenous administration of neurotensin in the cardio-vascular system.

I-4. Function of neurotensin in gastro-intestinal tract.

I-5. Hormonal effects of neurotensin.

I-6. Effects of neurotensin on the central nervous system.

I-7. Influence of neurotensin on dopamine neurons.

II. Substance P

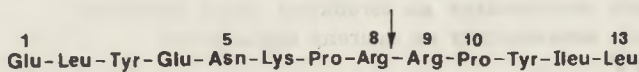
II-1. Distribution of substance P in the central nervous system.

II-2. Biosynthesis and metabolism.

*) Prof. dr, Katedra Farmakologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, ul. Medyków 18, 40-754 Katowice

II-3. Receptors of substance P.**II-4. The role in the neurotransmission.****II-5. Effects of the administration of substance P into the central nervous system on the pain****II-6. Interactions of substance P with acetylcholine or dopamine.****III. Tuftsin****III-1. Physiological role of tuftsin in immunogenic processes.****III-2. Central effects of tuftsin.****I. Neurotensyna****I.1. Odkrycie i budowa**

Neurotensynę odkryli Leeman i Carraway w 1973 r. w czasie próby wyodrębnienia substancji P z wyciągów podwzgórza wołu [1]. Wymienieni badacze wraz z współpracownikami wyizolowali neurotensynę z wyciągów jelita cienkiego wołu [2] i człowieka [3]. Obecnie otrzymuje się neurotensynę z tkanek zwierzęcych za pomocą chromatografii cieczowej. Neurotensyna jest peptydem składającym się z 13 aminokwasów (Ryc. 1).



Ryc. 1. Neurotensyna. ↓ miejsce rozkładu enzymatycznego.

Wstępne badania wskazują, że rozkład neurotensyny odbywa się za pośrednictwem endopeptydaz proliny [4, 5, 6]. Pęknięciu ulega wiązanie pomiędzy 8 a 9 aminokwasem. Prawdopodobnie w ten sposób unieczynnia się neurotensyna uwolniona do szczeliny synaptycznej. Neurotensyna ma na końcu aminowym kwas glutaminowy podobnie jak hormon uwalniający tyreotropinę, (tj. tyreoliberyna) i czynnik uwalniający gonadotropiny LH-RN i FSH, (tj. gonadoliberyna). Sekwencja aminokwasów końca karboksylowego neurotensyny (Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH) jest podobna do sekwencji aminokwasów występujących na końcu karboksylowym angiotensyny I (His-Pro-Phe-His-Leu-OH). Fragment neurotensyny: Arg⁹-Pro¹⁰ natomiast występuje na końcu aminowym substancji P. Badania nad zależnością funkcji od struktury wykazały, że główną rolę w efektach biologicznych wywoływanych przez neurotensynę odgrywa pentapeptyd końca karboksylowego (Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) [7].

I.2. Rozmieszczenie neurotensyny

Za pomocą badań radioimmunologicznych wykazano nierównomierne rozmieszczenie neurotensyny w ośrodkowym układzie nerwowym i przewodzie pokarmowym szczura, gdzie najwięcej peptydu znaleziono w jelicie czczym i cienkim [78] (Tab. 1).

tensyna znajduje się w drogach nerwowych biegnących z jądra migdałowatego do prążka końcowego, z jądra migdałowatego do kory gruszkowatej i części brzusznej prążkowiec, z hipokampa do kory czołowej. Na uwagę zasługuje obecność neurotensyny w zakończeniach nerwowych i bardzo cienkich włóknach rdzenia kręgowego. Znajduje się ona tylko w dwu warstwach rdzenia, zewnętrznej w obrębie blaszki I i II, oraz wewnętrznej w części blaszki III graniczącej z blaszką II. Pochodzi ona w tych miejscach prawdopodobnie z neuronów czuciowych biegnących ze zwojów korzonków tylnych. Opisane rozmieszczenie neurotensyny wskazuje na miejsce jej działania oraz oddziaływania na układy neuroprzekaznikowe, a także na jej wpływ na impulsy przewodzące bodźce węchowe, wzrokowe i bólowe. Ponieważ neurotensyna znajduje się w znacznych stężeniach w jądrach podstawy mózgu i substancji czarnej może ona regulować czynności ruchowe. Rozmieszczenie neurotensyny przemawia też za możliwością jej wpływu na procesy termoregulacyjne i czynności neuroendokrynologiczne. Neurotensyna znajduje się we krwi krążącej w stężeniu 15—25 fmoli/ml [12]. Jej zawartość we krwi znacznie wzrasta u ludzi po spożyciu posiłku bogato tłuszczowego. Neurotensyna z krwi nie przenika przez barierę naczyniowo-mózgową, dlatego też podana obwodowo nigdy nie wywołuje działań ośrodkowego. Natomiast ośrodkowe wstrzyknięcie tego peptydu wywołuje efekty obwodowe na skutek zmian hormonalnych lub zmian zachodzących w neuronach ośrodkowego układu nerwowego.

1.3. Wpływ dożylnego podania neurotensyny na układ krążenia

Neurotensyna wpływa na ciśnienie krwi i na czynność serca, jednak jej efekty zależą od gatunku badanego zwierzęcia, oraz rodzaju zastosowanego znieczulenia. Uzyskano dowody, że działanie hipotensyjne neurotensyny u szczurów znieczulonych pentobarbitem występuje za pośrednictwem histaminy i serotoniny, uwalnianych z komórek tucznych [13]. U znieczulanych pentobarbitem świnek morskich neurotensyna powodowała natomiast wzrost ciśnienia oraz pobudzenie układu adrenergicznego w naczyniach oraz tachykardię wywołaną bezpośrednim działaniem pobudzającym na węzeł zatokowy. Pobudzenie układu adrenergicznego występowało również u znieczulanych pentobarbitem owiec, objawiające się wzrostem ciśnienia krwi i przyspieszeniem czynności serca. Szereg obserwacji wskazuje, że neurotensyna może mieć znaczenie zarówno w fizjologii jak i patologii układu sercowo-naczyniowego bowiem: a) wywiera działanie po zastosowaniu bardzo małych dawek, rzędu 50—100 pmoli; b) znaleziono ją w nerwach sercowych; c) wpływa na nerwy adrenergiczne regulujące czynność serca; d) znajduje się w dużych ilościach w przewodzie pokarmowym, skąd może przenikać w znacznych ilościach do krwi i powodować istotne zmiany w układzie krążenia [14].

I.4. Znaczenie funkcjonalne neurotensyny w przewodzie pokarmowym

Rolę neurotensyny w przewodzie pokarmowym poznano jedynie fragmentarycznie. Wyniki dotychczasowych doświadczeń prowadzą do wniosku, że neurotensyna słabo hamuje wydzielanie i motorykę żołądka, słabo pobudza wydzielanie dwuwęglanów z trzustki, zwiększa lipolizę oraz wpływa na rozmieszczenie tłuszczów w tkance tłuszczowej. Obok katecholamin neurotensyna jest następną dotąd poznaną substancją regulującą szybkość przepływu krwi przez tkankę tłuszczową. W związku z dużą zawartością w przewodzie pokarmowym nasuwa się przypuszczenie o jej istotnym tam znaczeniu funkcjonalnym [15].

I.5. Efekty hormonalne neurotensyny

U szczurów wstrzyknięcie neurotensyny w dawkach 0.5—5 μg do trzeciej komory mózgu powodowało zmniejszenie stężenia prolaktyny we krwi. Zmniejszenie zawartości prolaktyny spowodowane przez neurotensynę było znoszone podaniem α -metylo-tyrozyny hamującej syntezę katecholamin lub zastosowaniem leku blokującego receptory dopaminergiczne spiroperidolu. Neurotensyna podana dożylnie zwiększała natomiast zawartość prolaktyny i nie wpływała na ilość innych zbadanych hormonów przedniej części przysadki we krwi.

W doświadczeniach *in vitro* neurotensyna w stężeniach 50—500 $\mu\text{g/ml}$ zwiększała uwalnianie prolaktyny i hormonu tyreotropowego ze skrawków przedniej części przysadki do płynu inkubacyjnego nie wpływając na uwalnianie gonadotropin i hormonu wzrostu. Neurotensyna prawdopodobnie bierze udział w mechanizmach regulujących uwalnianie hormonów z przedniej części przysadki, gdyż znajduje się ona w częściach mózgu kontrolujących czynność tej części przysadki [16].

I.6. Działanie neurotensyny na ośrodkowy układ nerwowy

Neurotensyna w mózgu znajduje się w ziarnistościach zakończeń synaptycznych [17, 18], skąd jest uwalniana przez bodźce wywołujące depolaryzację neuronu [19, 20].

Badania elektrofizjologiczne ośrodkowego układu nerwowego wykazały, że neurotensyna działa albo pobudzająco, albo hamująco, bądź nie wpływa wcale na neurony w tej samej części mózgu. Neurotensyna pobudza lub hamuje pojedyncze neurony czuciowe rogów tylnych rdzenia kręgowego. Ponieważ hamuje ona pobudzenie wywołane podaniem kwasu glutaminowego można przypuszczać, że działanie neurotensyny dotyczy neuronów postsynaptycznych.

Różne, często przeciwstawne efekty elektrofizjologiczne opisano w hipokampie, prążku końcowym, wzgórze, jądrze przegrody. Wbrew oczeki-

waniu natomiast neurotensyna nie zmieniała potencjałów pojedynczych neuronów podwzgórza. Jedynym obszarem mózgu, w którym neurotensyna wywołuje zawsze taki sam efekt mianowicie pobudzenie pojedynczych neuronów jest kora mózgowa. Brak jednorodnych efektów elektrofizjologicznych neurotensyny w poszczególnych częściach mózgowia można tłumaczyć jej działaniem bezpośrednim na jedne neurony oraz działaniem pośrednim na neurony sąsiadujące, lub/i wydzielaniem przez nią nieznanego dotąd czynnika, wywołującego pobudzenie jednych, a hamowanie innych neuronów, wreszcie możliwością istnienia różnych typów receptorów wrażliwych na neurotensynę [21]. Śródoponowe wstrzyknięcie szczurom 1—100 μg neurotensyny wywołało działanie przeciwbólowe, znoszone przez nalokson, który jest antagonistą endogennych peptydów opiatowych. Drażnienie prądem nerwu kulszowego u kota powodowało wzrost stężenia neurotensyny w płynie mózgowo-rdzeniowym. Zaobserwowane działanie antagonistyczne naloksonu wobec neurotensyny nie zostało potwierdzone przez innych badaczy po domózgowym podawaniu neurotensyny i systemowym wstrzykiwaniu naloksonu. Ponieważ neurotensyna nie łączy się z receptorami opiatowymi można przypuszczać, że w opisanym doświadczeniu spowodowała ona uwolnienie endogennej substancji działającej na receptory wrażliwe na działanie naloksonu. Warto w tym miejscu wspomnieć, że ciała komórkowe zawierające neurotensynę znajdują się w najbliższym sąsiedztwie komórek zawierających enkefalinę w substancji galaretowatej rdzenia kręgowego [22]. Zaobserwowano również działanie przeciwbólowe neurotensyny po jej podaniu do komory bocznej mózgu [23, 24] lub podaniu docysternowym u szczurów [24]. Wykazano, że surowica przeciweurotensynowa wywołuje zwiększoną wrażliwość na bodźce bólowe oraz, że znosi ona przeciwbólowe działanie neurotensyny u szczurów [25]. Najsilniejsze działanie przeciwbólowe neurotensyny zaobserwowano po jej wstrzyknięciu do środkowej części wzgórza, okolicy przedwzrokowej środkowej, substancji szarej okołowodociągowej, centralnego jądra migdałowatego i układu siatkowatego mostu [26].

W badaniach przeprowadzonych w naszym Zakładzie wykazaliśmy, że neurotensyna wstrzyknięta myszy docysternowo wyraźnie antagonizowała działanie przeciwbólowe enkefalin oraz D-Ala² metenkefalinamidu, natomiast potęgowała działanie przeciwbólowe tuftsyny [27].

Podana ośrodkowo neurotensyna wywołuje zależnie od dawki działanie hipotermiczne u myszy znajdujących się w temp. 4°C. Efekt ten w temperaturze otoczenia 25°C jest słabszy. Działanie hipotermiczne neurotensyny było częściowo antagonizowane przez hormon uwalniający tyreotropinę, a nasilane przez haloperydol oraz selektywne uszkodzenie neuronów dopaminowych za pomocą 6-hydroksydopaminy. Nalokson nie wpływał na hipotermię wywołaną neurotensyną. Po podaniu obwodowym neurotensyna nie zmieniała temperatury ciała. Działanie hipotermiczne jest spowodowane zahamowaniem ogólnego metabolizmu przez neurotensynę. Hipo-

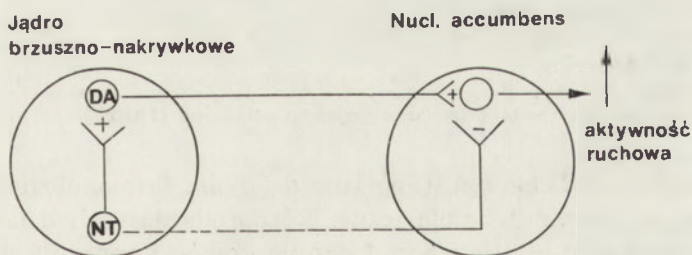
tezę tę popiera fakt, że neurotensyna nie powoduje hipotermii u zwierząt znajdujących się w wysokiej temperaturze, w której nie ma potrzeby wzmożonej produkcji ciepła [28].

Po dokomorowym wstrzyknięciu 10 μg neurotensyny obserwowano zmniejszenie aktywności ruchowej szczurów. Neurotensyna hamowała zwiększoną ruchliwość zwierząt wywołaną amfetaminą, zmniejszała reaktywność szczurów na drażnienie prądem elektrycznym łap zwierząt, a także hamowała odruch unikania u szczurów. U myszy neurotensyna wywoływała katalepsję. Katalepsja neurotensynowa była słabo hamowana przez hormon uwalniający tyreotropinę. Nalokson nie miał żadnego wpływu na to nienormalne zachowanie się zwierząt wywołane neurotensyną [29]. Tak więc niektóre efekty behawioralne neurotensyny są podobne do wywołanych przez neuroleptyki. Neurotensyna jednak nie hamuje łączenia się ^3H -spiroperidolu z receptorami dopaminowymi jądra ogoniastego i jądra półleżącego [30].

Neurotensyna przedłużała czas trwania snu myszy wywołanego pentobarbitem na skutek zmniejszenia metabolizmu pentobarbitalu w mózgu i wątrobie, oraz przedłużała czas trwania snu etanolowego nie wpływając jednak na metabolizm etanolu. Neurotensyna w dawkach nieaktywnych wywoływała sen u niektórych myszy po podaniu dawek etanolu, które nie wywołują snu. Wypływa stąd hipoteza, że różna wrażliwość na etanol może być związana z różnicami w aktywności układu neurotensynowego w mózgu [31].

1.7. Działanie neurotensyny na neurony dopaminowe

Po wstrzyknięciu neurotensyny do części brzusznej jądra nakrywkowego u szczurów stwierdzono wzrost aktywności ruchowej zwierząt oraz zwiększenie uwalniania dopaminy z neuronów jądra półleżącego [32, 33]. Na tej podstawie Kalivas i wsp. [26] wysunęli hipotezę, że neurotensyna reguluje aktywność neuronów dopaminowych w jądrze półleżącym (*nucleus accumbens*) (Ryc. 2).



Ryc. 2. Działanie neurotensyny (NT) na neurony dopaminowe układu mezolimbicznego. DA-dopamina, (+) — pobudzenie, (—) — zahamowanie.

Dokomorowe podanie neurotensyny wywołuje zahamowanie aktywności ruchowej szczurów [34]. Ponieważ istnieje hipoteza, że zaburzenia układu dopaminowego mezolimbicznego są jedną z przyczyn schizofrenii można przypuszczać, że w ten łańcuch patogenetyczny może być również włączona neurotensyna. Jednak u ludzi chorych na schizofrenię nie stwierdzono zmian w zawartości neurotensyny w układzie limbicznym, natomiast stwierdzono wzrost jej ilości w korze mózgowej. W płynie mózgowo-rdzeniowym schizofreników obserwowano niski poziom neurotensyny, ulegał on normalizacji w czasie leczenia neuroleptykami [34]. Podawanie neuroleptyków szczurom powodowało zwiększenie zawartości neurotensyny w mózgu w jądrze półleżącym i w prążkowie [34, 35]. U ludzi z płąsawicą wykazano wyraźny wzrost neurotensyny w jądrze ogoniastym [36]. Efekty farmakologiczne neurotensyny zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Działanie farmakologiczne neurotensyny

A. Po podaniu ośrodkowym	
a) Na ośrodkowy układ nerwowy	
Nasilenie długości snu po barbituranach i alkoholu	x
Zahamowanie pobudzenia po lekach amfetaminopodobnych	
Zmniejszenie działania przeciwbólowego morfiny u zwierząt uzależnionych	
Zmniejszenie aktywności ruchowej	
Obniżenie temperatury ciała	x
Działanie przeciwbólowe	x
Zwiotczenie mięśni prążkowanych	x
Zmniejszenie odruchu unikania	x
Zmniejszenie samodrażnienia elektrycznego	
Zmniejszenie przyjmowania pokarmu	x
Katalepsja	x
b) Na obwód	
Uwalnianie wazopresyny	
Zmniejszenie uwalniania TSF, PRL, GH i LH-RH	
B. Po podaniu obwodowo	
a) Na ośrodkowy układ nerwowy — brak działania	
b) Na obwód	
Obniżenie ciśnienia krwi	
Rozszerzenie naczyń krwionośnych	
Hiperglukemia, hyperglukagonemia, hipoinsulinemia	
Uwalnianie histaminy	

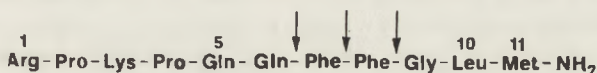
x — oznacza antagonizowanie działania przez tyreoliberynę (TRH)

Jak dotąd nie wiadomo, czy opisane działania farmakologiczne neurotensyny mają znaczenie fizjologiczne. Różnorodność tych działań można tłumaczyć wpływem miejscowym, tylko na komórki znajdujące się w pobliżu miejsca wydzielania neurotensyny, gdzie jest ona szybko rozkładana ($t_{1/2} = \text{ok. } 30 \text{ s.}$) albo wpływem na receptory wrażliwe na inne peptydy

lub wrażliwe na neuroleptyki. Efekty farmakologiczne neurotensyny pozwalają na zaliczenie jej do układu trofotropowego wg koncepcji dawno zaproponowanej przez Hessa [37]. Ponieważ neurotensyna znajduje się także w tych samych komórkach endokrynnych lub w tych samych neuronach zawierających neuroprzekazniki zalicza się ją wg pojęcia wprowadzonego przez Pearse'a [38] do układu, którego komórki neuroendokrynnie i neuronalne pochodzą z ektoblasta, nazwanego układem APUD od słów *amine precursor uptake decarboxylase* (prekursor aminy — wychwyty — dekarboksylaza).

II. Substancja P

Substancję P odkryli von Euler i Gaddum w 1931 r. w wyciągach z jelita i mózgu koni [39]. Dopiero w latach pięćdziesiątych zaczęto badać jej rozmieszczenie w ustroju oznaczając ją za pomocą metod biologicznych [40, 41]. Amin i wsp. [42] wykryli, że w grzbietowych rogach rdzenia kręgowego znajduje się jej znacznie więcej aniżeli w rogach brzusznych. Lembeck [40] jako pierwszy wysunął hipotezę, że substancja P może być neuroprzekaznikiem impulsów nerwowych w neuronach czuciowych. Warto w tym miejscu przypomnieć, że substancja P była pierwszym peptydem, któremu przypisano rolę przypuszczalnego neuroprzekaznika. Wyraźny rozwój badań nad rolą biologiczną substancji P rozpoczął się w r. 1971, kiedy to Leeman wraz z Changiem i Niall ustalili budowę chemiczną tego peptydu, składającego się z 11 aminokwasów [43] (Ryc. 3).



Ryc. 3. Substancja P. ↓ miejsca rozkładu enzymatycznego.

II.1. Rozmieszczenie substancji P w ośrodkowym układzie nerwowym

Za pomocą metod immunohistochemicznych wykazano, że substancja P występuje w bardzo wielu różnych grupach neuronów poszczególnych części ośrodkowego układu nerwowego [44, 45, 46, 47] (Tab. 4). Opisano również drogi nerwowe, w których ten peptyd się znajduje.

Wykryto szlak neuronalny zawierający substancję P biegnący z prądkowia do substancji czarnej. Ciała komórkowe zawierające substancję P, od których włókna biegną do substancji czarnej znajdują się głównie w jądrze ogoniastym i jądrze skorupy [48, 49, 50]. W tyłomózgowiu substancję P znaleziono w jądrze przegrody w niektórych neuronach razem z 5-hydroksytryptaminą [51]. Substancja P w rogach tylnych rdzenia kręgowego znajduje się w blaszce I i II substancji galaretowatej. Należy podkreślić, że w blaszce II-giej oraz jądrze nerwu trójdzielnego w rdzeniu krę-

Tabela 4

Rozmieszczenie substancji P w ośrodkowym układzie nerwowym (44)

Część ośrodkowego układu nerwowego	Szczur pmol/10 mg masy	Człowiek pmol/10 mg masy
Zwoje korzonków grzbietowych	0.6	
Rogi tylne rdzenia kręgowego	9.4	
Jądro nerwu V	12.1	
Kora czołowa		0.08
ciemieniowa		0.07
Jądro ogoniaste	2.2	1.13
Gałka błada	2.9	5.18
Substancja czarna	15.1	
Podwzgórze	5.5	
Jądro migdałowe	3.3	3.4
Hipokamp	0.3	
Jądro przegrody grzbietowej		2.8
bocznej		3.6
<i>Nucl. accumbens</i>	1.9	
Mózdzek	0.1	0.1

gowym znaleziono zarówno substancję P jak i enkefalinę. Prawdopodobnie substancja P i enkefalinę wiążą się z tymi samymi miejscami postsynaptycznymi [52, 53].

Substancja P znajduje się w neuronach zawierających inne peptydy lub syntetyzujących aminy biogenne. W początkowych neuronach czuciowych znaleziono ją w komórkach, w których stwierdzono obecność cholecystokininy oraz naczynioaktywnego polipeptydu jelitowego (VIP) [54]. W rdzeniu przedłużonym stwierdzono obecność w 70% tych samych neuronów substancji P i 5-hydroksytryptaminy [55, 56, 57, 58]. Wykazano obecność włókien nerwowych zawierających zarówno 5-hydroksytryptaminę jak też i enkefalinę biegnących z pnia mózgu do jądra wielkiego szwu. Wskazuje to na modulujący wpływ pnia mózgu przez enkefalinę i substancję P aktywności neuronów wymienionego jądra szwu biorącego udział w procesach odczuwania bólu [59].

II.2. Biosynteza i metabolizm

Syntezę substancji P wykazano w zwojach korzonków grzbietowych rdzenia kręgowego szczura [60]. Zawierają one dwa rodzaje komórek: duże jasne komórki A i małe ciemne komórki B. Substancja P znajduje się w komórkach B, w zakończeniach biegnących z tych komórek do rogów grzbietowych rdzenia kręgowego, oraz w zakończeniach biegnących obwodowo do skóry i innych tkanek. Stwierdzono, że synteza substancji P odbywa się w rybosomach ciał komórkowych, ponieważ była ona hamo-

wana przez substancje blokujące syntezę białek, mianowicie cykloheksymid oraz anisomycynę. Następnie potwierdzono syntezę rybosomalną substancji P za pomocą wbudowywania ^{35}S metioniny lub ^3H proliny do substancji P. Równocześnie z powstawaniem substancji P jest syntetyzowany fragment zawierający sekwencję aminokwasów 8—11 substancji P. Na razie nie wykryto prekursora tych substancji. Obydwa peptydy są szybko transportowane do zakończeń neuronalnych ośrodkowych i obwodowych w postaci ziarnistości. Oprócz tego istnieje powolny transport peptydów. Nasuwa się pytanie, czy substancja P transportowana wzdłuż aksonów jest jej jedynym źródłem w zakończeniach neuronalnych. Jak dotąd nie stwierdzono syntezy substancji P *de novo* w zakończeniach nerwów. Istnieje jednak możliwość, że nieznaną dotąd prekursor substancji P może być przenoszony wzdłuż aksonu i w czasie tego procesu może odszczepiać się substancja P. Gdyby tak było ilość substancji P powinna wzrastać w miarę przedłużania czasu inkubacji izolowanych aksonów. W doświadczeniach *in vitro* tego zjawiska nie stwierdzono. Wykazano też, że synteza substancji P nie zależy od transportu aksonalnego. Zaburzenie transportu bowiem za pomocą kolchicyny nie zmieniło szybkości syntezy substancji P w ciałach komórkowych. Długotrwałe drażnienie tych zakończeń powoduje obniżenie ich reaktywności, w związku z wyczerpaniem się zapasów substancji P. Prawdopodobnie jest to kompensowane dużą ilością zapasów substancji P w zakończeniach nerwowych. Obrót substancji P w rdzeniu kręgowym jest bardzo wolny, jej okres półtrwania wynosi 4—5 dni. Zapasy w rdzeniu kręgowym ulegają zmniejszeniu po jego drażnieniu elektrycznym oraz pod wpływem przewlekłego bólu.

W mózgu ludzkim wykryto enzym rozkładający substancję P (E.C. 3.4.2.4) [61]. Wyosobniono go z międzymózgowia. Aktywność jego zbadano mierząc znikanie substancji P poddanej działaniu enzymu za pomocą metod: radioimmunologicznej, radiochemicznej lub biologicznej. Enzym scharakteryzowano jako ciepłochwiejną, obojętną metaloendopeptydazę o masie cząsteczkowej 50 000 daltonów. Rozszczepia on wiązania $\text{Gln}^6\text{-Phe}^7$, $\text{Phe}^7\text{-Phe}^8$, $\text{Phe}^8\text{-Gly}^9$ w stosunku 0.7:1:1. Powstałe produkty rozpadu peptydu zidentyfikowano za pomocą chromatografii cieczowej. Podobne produkty rozpadu substancji P, jak te stwierdzone w mózgu człowieka, wykryto również w mózgu szczura. Enzym rozkładający substancję P znajduje się w błonach synaptycznych. Wskazuje to, że jest on głównym czynnikiem inaktywującym ten peptyd w błonach komórkowych oraz, że może on brać udział w fizjologicznej inaktywacji substancji P w tkance nerwowej.

II.3. Receptory Substancji P (62)

Jedną z metod badania receptorów substancji P w ośrodkowym układzie nerwowym jest pomiar wiązania ^3H substancji P z fragmentami błon komórkowym mózgowia *in vitro* w obecności inhibitorów peptydaz, np. bacytracyny w temp. 4°C . Stwierdzono, że miejsca receptorowe substancji P są wysycalne odwracalnie, a wysycanie to jest zależne liniowo od stężenia błon neuronalnych w płynie inkubacyjnym. Stwierdzono duże powinowactwo ^3H substancji P do miejsc receptorowych ($K_d = 0.4 \text{ nM}$) i małą ich gęstość ($B_{\text{max}} = 27 \text{ fmoli/mg białka}$). Fragmenty substancji P konkurują z nią o miejsce wiązania. Siła tego wiązania jest na ogół proporcjonalna do siły skurczu jelita świnki morskiej wywieranego przez ligand (Tab. 5).

Tabela 5

Wiązanie substancji P(SP) i jej fragmentów z błonami neuronalnymi mózgowia (62)

Peptyd	Wiązanie z błonami mózgowia $\text{IC}_{50} \text{ SP}/\text{IC}_{50} \text{ peptydu}$	Skurcz jelita świnki morskiej $\text{EC}_{50} \text{ SP}/\text{EC}_{50} \text{ peptydu}$
SP	1.0	1.0
SP wolny kwas	0.03	0.0005
Fragmenty karboksylowe SP		
2—11	0.3	1.0
3—11	0.08	1.9
4—11	0.05	0.9
5—11	0.5	0.3
6—11	1.7	0.4
7—11	0.01	0.0005
Fragmenty aminowe		
1—10 amid	0.01	8
1—9 amid	7.5	2
1—9 wolny kwas	$< 10^{-6}$	—
2—9 amid	4.0	$< 10^{-6}$

Innym sposobem badania receptorów substancji P jest porównanie jej siły działania z siłą działania tachykinin na różne narządy np. jelito lub nasieniowód świnki morskiej, nasieniowód lub jelito szczura, pęcherz moczowy chomika lub psa, wydzielanie śliny u psa, ciśnienie krwi u szczura. Na tej podstawie wyróżniono dwa typy receptorów: typ P: fizalemina $>$ SP $>$ eleodoizyna = kasinina oraz typ E: eleodoizyna = kasinina $>$ SP = fizalemina.

II.4. Rola w przekazywaniu impulsów czuciowych

Substancja P silnie pobudza neurony ruchowe rdzenia kręgowego żaby. Po elektrycznym drażnieniu rdzenia kręgowego szczurów stwierdzono uwalnianie się substancji P do płynu perfuzyjnego [63]. Wyniki te wska-

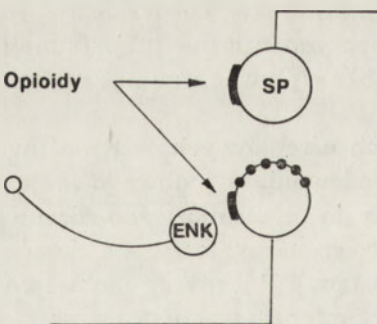
zują, że pobudzenie początkowych wstępujących zakończeń czuciowych w rdzeniu kręgowym powoduje uwalnianie z tych zakończeń substancji P i pobudzenie przez nią neuronów rogów grzbietowych rdzenia kręgowego [64, 65, 66]. W zwojach adrenergicznych kręgowych substancja P jest neuroprzekaznikiem, który wytwarza powolne potencjały postsynaptyczne pobudzeniowe, inne od potencjałów wzbudzanych przez acetylocholinę. Natomiast enkefaliny w tych zwojach hamują czynność neuronów presynaptycznych [63].

Komórki zwojów grzbietowych rdzenia kręgowego są dwubiegunowe, wychodzi z nich jedno włókno, które kończy się na obwodzie, a drugie kończy się w rdzeniu kręgowym lub w dolnych częściach mózgu. Istnieją grube (C) i cienkie (A_α) włókna rdzeniowe, które różnią się szybkością przewodzenia impulsów. Włókna A_α przewodzą impulsy bardzo szybko, zaś włókna C bardzo powoli. Tak więc impulsy z włókien A_α mogą docierać do mózgu w momencie gdy impulsy przewodzone przez włókna C dojdą dopiero do rdzenia kręgowego. Substancja P znajduje się w cienkich włóknach korzonków tylnych rdzenia kręgowego [67]. Związkiem, który działa silnie na cienkie włókna wstępujące rdzenia kręgowego jest kapsaicyna. Działa ona kilkufazowo. Początkowo wywołuje ona niezwykle krótkotrwałe uwalnianie substancji P a także somatostatyny, następnie kilkunutowe zaburzenie przewodzenia impulsów we włóknach, w czasie którego peptydy nie są uwalniane, wreszcie występuje utrzymujące się kilka miesięcy uwalnianie substancji P bez objawów degeneracji aksonów u szczurów dorosłych. Podanie kapsaicyny noworodkom szczurzym powoduje degenerację neuronów, a więc zniknięcie substancji P [68, 69]. Kapsaicyna wywiera swoiste działanie na neurony czuciowe, podobnie jak gwanetydyna na neurony adrenergiczne, mianowicie powoduje blokowanie funkcji neuronu, uwalnianie substancji P oraz początkowe pobudzenie zakończeń nerwowych. Jest więc związkiem blokującym neurony czuciowe.

Jak już wspomniano, substancja P jest transportowana przez aksoplazmę do zakończeń czuciowych ośrodkowych i obwodowych. Podanie miejscowe kapsaicyny do nerwu kulszowego szczurów hamowało zupełnie transport aksonalny substancji P, a także somatostatyny nie naruszając transportu noradrenaliny i acetylocholinesterazy, co wskazuje na swoiste działania kapsaicyny na neurony peptydoergiczne [67]. Istnieją jednak dowody wskazujące, że kapsaicyna może wpływać również na inne neurony poza zawierającymi substancję P.

Badanie funkcji substancji P w neuronach ośrodkowych jest możliwe tylko po jej podaniu do tych neuronów. Podawanie jej obwodowe jest nieprzydatne, gdyż bardzo słabo przenika ona do płynu mózgowo-rdzeniowego, a ponadto działa silnie na układ sercowo-naczyniowy. Po domózgowym lub dordzeniowym wstrzyknięciu substancji P u myszy zaobserwowano nienormalne zachowanie się w postaci intensywnego drapania się.

Podobne zachowanie się myszy wywoływało śródoponowe wstrzyknięcie 5-hydroksytryptaminy [70]. Objawu tego po podaniu substancji P nie stwierdzono u szczurów [71, 72]. Substancja P jest przenoszona we włóknach nerwowych do zakończeń czuciowych znajdujących się w skórze, naczyniach krwionośnych, zwojach adrenergicznych i trzewiach. Uwalnianie substancji P z obwodowych zakończeń nerwowych wykazano po drażnieniu elektrycznym nerwu trójdzielnego, oraz po podaniu jonów potasowych lub kapsaicyny do zwojów adrenergicznych [73]. Efekty powstające na skutek działania bodźców szkodliwych na zakończenia czuciowe tłumaczy się obecnie następująco. Impulsy spowodowane tymi bodźcami powodują uwolnienie w rogach tylnych rdzenia kręgowego substancji P, co może spowodować odczucie bólu. Inne impulsy wędrują w odwrotnym kierunku (antydzromowo) powodując wydzielenie substancji P z zakończeń czuciowych co wywołuje rozszerzenie naczyń krwionośnych, oraz uwolnienie histaminy z komórek tucznych skóry. To rozszerzenie naczyń skórnych stanowi jedyny mechanizm zapobiegający miejscowemu uszkodzeniu przez usuwanie szkodliwych związków powstających na skutek bodźców mechanicznych, termicznych lub chemicznych. Rozszerzenie naczyń skórnych pod wpływem szkodliwych bodźców, w którym bierze udział substancja P jest nazywane odruchem aksonalnym. Utrata tego odruchu spowodowana degeneracją zakończeń czuciowych prowadzi do zaburzeń troficznych skóry. Przedstawione zjawiska wskazują, że początkowe włókna nerwowe przewodzące impulsy bólowe spełniają dwie czynności: ośrodkową polegającą na przekazaniu impulsu do rdzenia kręgowego i wzbudzeniu uczucia bólu, oraz obwodową w postaci odruchu aksonalnego, którego celem jest zapobieżenie uszkodzeniu skóry [67, 74]. Jak już wspomniano, substancja P podana do neuronów rogu tylnego rdzenia kręgowego powoduje ich pobudzenie. Te same neurony są pobudzane po drażnieniu cieplnym skóry. Biorąc pod uwagę obecność substancji P we wstępujących cienkich włóknach czuciowych i opisany powyżej fakt wysunięto przypuszczenie, że substancja P jest czynnikiem pobudzającym drogi czuciowe przewodzące ból [75]. Następnie stwierdzono, że substancja P pobudza neurony w rdzeniu kręgowym, które są również pobudzane przez



Ryc. 4. Interakcja enkefalin (ENK) i opioidów z neuronami wytwarzającymi substancję P (SP), ■ — receptory opioidowe, ● — receptory substancji P.

szkodliwe bodźce mechaniczne [76]. Substancja P uwalnia się także z początkowych neuronów przewodzących impulsy bólowe do pnia mózgu oraz neuronów jądra ogonowego nerwu trójdzielnego [77]. Po odnerwieniu występuje nadwrażliwość na substancję P [78, 79, 80]. Uwalnianie substancji P w rdzeniu kręgowym jest hamowane przez opioidy i enkefalinę [81] (Ryc. 4).

Związek antagonistyczny w stosunku do substancji P: D-Pro² D-Trp^{7,9} — substancja P podany śródoponowo wywołuje działanie przeciwbólowe i hamuje działanie zmniejszające próg pobudliwości nerwowej wywołany substancją P [81]. Innymi substancjami antagonistycznymi są: D-Pro⁴, D-Trp^{7,9,10}, Val⁸-SP₄₋₁₁ oraz D-Pro⁴-D-Trp^{7,9,10} substancja P₄₋₁₁ [82].

II.5. Wpływ ośrodkowego podania substancji P na odczuwanie bólu

Substancja P podana domózgowo u myszy ma dwojakie działanie na próg pobudliwości bólowej. W zależności od dawki oraz indywidualnej wrażliwości na ból, wywołuje działanie przeciwbólowe lub zmniejszające próg pobudliwości bólowej. Mniejsze dawki substancji P wywierają u myszy działanie przeciwbólowe prawdopodobnie na skutek uwalniania peptydów opiatowych [83], natomiast wyższe dawki peptydu wywołują zmniejszenie progu pobudliwości bólowej na skutek bezpośredniego działania na drogi przewodzące impulsy bólowe. Następujące fragmenty substancji P wywołują działanie analgetyczne 5—11; 6—11, 1—7 i 1—8 [84]. D-Ala²-D-Leu⁵ enkefalina nasilała działanie analgetyczne substancji P podanej dokomorowo w dawce 50 ng u szczurów lub myszy, natomiast D-Ala²-Met⁵ enkefalinamid antagonizował przeciwbólowe działanie substancji P [85]. Wydaje się więc, że substancja P powoduje normalizację wrażliwości na ból. Oehme i wsp. uważają substancję P za peptyd regulatorowy i proponują nazwę regulid [86]. Podobne normalizujące działanie substancji P wymienieni autorzy stwierdzili w wypadku zaburzenia snu, zachowania się i zaburzeń ciśnienia krwi wywołanych stresem u szczurów.

II.6. Interakcje substancji P z acetylocholiną lub dopaminą

Substancja P podana jontoforetycznie do komórek Renshawa u kota hamuje pobudzające działanie acetylocholino na te komórki. Substancja P nie wywierała natomiast hamującego wpływu na receptory nikotynowe mięśni prążkowanych u zaby i kurczęcia. Substancja P powoduje pobudzenie komórek Renshawa. Tak więc substancja P działa selektywnie tylko na niektóre receptory nikotynowe co może wskazywać na jej rolę neuromodulatora [87]. W prążkowie stwierdzono powstawanie ³⁵S substancji P z ³⁵S metioniny oraz jej transport do substancji czarnej. Na tej podstawie można sądzić, że substancja P wpływa na czynność neuronów dopaminergicznych. Ponadto stwierdzono, że jednostronne podanie substan-

cji P do prążkowania wywołuje uwalnianie w tym miejscu świeżo zsyntetyzowanej ^3H 5-hydroksytryptaminy jak też uwalnianie tej aminy z jądra ogoniastego znajdującego się po stronie przeciwnej do wstrzyknięcia substancji P [88].

Podanie obustronne substancji P w dawce 3 μg do grupy neuronów dopaminowych A10 znajdujących się w okolicy brzuszno-nakrywkowej u szczurów wywołało wzrost aktywności ruchowej i spontanicznej zwierząt [89, 90]. Wskazuje to, że substancja P aktywuje neurony dopaminergiczne A10, które unerwiają układ limbiczny. Wstrzyknięcie substancji P natomiast do grupy neuronów dopaminowych A9 wywoływało stereotypię u szczurów [89]. Substancja P podana dokomorowo zwiększała akumulację DOPA w mózgu u szczurów u których zahamowano aktywność dekarboksylazy L-aminokwasów aromatycznych oraz zwiększała aktywność ruchową zwierząt [91].

Oprócz działania substancji P na ośrodkowy układ nerwowy wykazano jej wpływ na inne układy (Tab. 6).

Tabela 6

Właściwości farmakologiczne substancji P

Układ sercowo naczyniowy:	Spadek ciśnienia krwi rozszerzenie naczyń krwionośnych	SP ₄₋₁₁
Wydzielanie:	wzrost wydzielania śliny wzrost wydzielania prolaktyny	SP ₁₋₁₁
Przewód pokarmowy:	indukcja odruchów perystaltycznych wzrost napięcia i kurczliwości żołądka i jelit	SP ₃₋₁₁ SP ₄₋₁₁
Ośrodkowy układ nerwowy:	analgezja, hiperalgezja depolaryzacja lub hiperpolaryzacja neuronów ułatwienie lub utrudnienie przewodzenia synaptycznego zwiększenie lub zmniejszenie aktywności ruchowej	

III. Tuftsyna

Tuftsyna jest czteropeptydem o następującej sekwencji aminokwasów treonina-lizyna-prolina-arginina (Thr-Lys-Pro-Arg). Odkryli ją Najjar i Nishioka w r. 1970 na Uniwersytecie Tufts w Bostonie, stąd jej nazwa [92]. Jak się okazało tuftsyna stanowi fragment ciężkiego łańcucha immunoglobuliny γ (leukokininy) łączącej się swoiście z granulocytami wielojądrami obojętnochnnymi. Leukokinina pobudza aktywność fagocytarną granulocytów. Jak się okazało ta jej właściwość zależy od fragmentu odpowiadającego tuftsynie znajdującego się pomiędzy 289 a 292 aminokwasem leukokinin: ...H-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Gln-Gln-Tyr-OH.... W śledzienie wiązanie Arg-Glu jest

rozrywane przez enzym nazwany endokarboksypeptydazą tuftsyny. Na skutek tej reakcji powstaje leukokina S (*spleen* — śledziona), która zawiera sekwencję aminokwasów tuftsyny na wolnym końcu karboksylowym. Leukokina S łączy się granulocytami, na których błonie komórkowej znajduje się swoisty enzym leukokininaza, uwalnia on z polipeptydu tuftsynę [93]. Ta z kolei łączy się ze swoistym receptorem znajdującym się na powierzchni granulocytów [94]. Rozwój badań nad właściwościami biologicznymi tuftsyny był możliwy dzięki opracowaniu kilku metod jej syntezy oraz oznaczania najpierw za pomocą metod biologicznych, a obecnie metody radioimmunologicznej [95].

III.1. Rola fizjologiczna tuftsyny w procesach odpornościowych

Tuftsyna pobudza czynności biologiczne dwu głównych rodzajów fagocytów, mianowicie granulocytów i makrofagów. Połowa maksymalnego ich pobudzenia występuje po zastosowaniu stężenia 100 nM. Tuftsyna nasila ruchliwość fagocytów, i wywołuje ich gromadzenie się w miejscu gdzie pojawiają się bakterie lub martwe komórki. Zwiększa właściwości żerne oraz pinocytozę fagocytów. Tuftsyna nasila właściwości bakteriobójcze makrofagów. Zjawisko to stwierdzono wobec gronkowców złocistych, pałeczek okrężnicy, *Listeria monocytogenes* oraz *Serratia marcescens*. Zastosowanie tuftsyny wybitnie zmniejszyło śmiertelność myszy spowodowaną wymienionymi bakteriami. Tuftsyna zwiększa właściwości immunologiczne limfocytów T. Niszczy ona komórki białaczkowe i komórki czerniaka złośliwego u myszy [95, 96, 97, 98]. Własności żerne, bakteriobójcze i niszczące komórki nowotworowe są spowodowane aktywacją fagocytów przez tuftsynę, która powoduje powstawanie w nich wolnych rodników hydroksylowych oraz nadtlenu wodoru [98].

Ostatnio zaobserwowano remisję białaczki przewlekłej u ludzi po zastosowaniu tuftsyny w dawce 0.1 mg/kg *i.v.* Za dawkę bezpieczną uważa się u ludzi podanie do 1 mg/kg *i.p.* [99]. Opisano zespół wrodzonego niedoboru tuftsyny. Występuje on dziedzicznie, a jego przyczyną jest występowanie zmutowanej tuftsyny będącej związkiem antagonistycznym normalnej tuftsyny. Nabyty niedobór tuftsyny występuje po usunięciu śledziona lub po jej uszkodzeniu procesami chorobowymi. Obydwa rodzaje niedoboru przejawiają się klinicznie wyraźnie zmniejszoną odpornością powodującą nawracające zakażenia o ciężkim przebiegu [100].

Wykazano niedawno [101, 102, 103], że substancja P łączy się z receptorami tuftsynowymi makrofagów, co zwiększa ich aktywność. Również neurotensyna pobudza właściwości żerne makrofagów. Ta właściwość neurotensyny i substancji P zależy jak się wydaje, od sekwencji Lys-Pro-Arg [102]. Biologiczną konformację tuftsyny oraz zależność opisanego powyżej działania od budowy chemicznej analogów tuftsyny opisali S i e m i o n i K o n o p i ń s k a [104].

III.2. Efekty ośrodkowe tuftsyny

W czasie badań nad działaniem przeciwbólowym nowych syntetycznych analogów enkefalin wykazaliśmy przeciwbólowe działanie tuftsyny oraz jej dwu analogów D-Arg³ oraz D-Arg⁴ tuftsyny zastosowanych w dawce 200 µg do komory bocznej mózgu szczura [105, 106]. Nalokson nie zmieniał tego działania. Natomiast bradykinina w dawkach 1—3 µg podana dokomorowo zmniejszała działanie przeciwbólowe tuftsyny u szczurów i myszy. Tuftsyna zmieniała też zachowanie się szczurów wpływając na nie dwufazowo. W ciągu pierwszych 15 min. po wstrzyknięciu hamowała zarówno aktywność ruchową, poznawczą jak i spontaniczną, a następnie po 60—90 min. zwiększała obydwie typy aktywności ruchowej. Dokomorowe wstrzyknięcie tuftsyny wywołało zależny od dawki wzrost ciśnienia krwi, był on znoszony przez bradykininę i niezmieniony przez nalokson [107].

Wspomniano, że substancja P i neurotensyna obecne w ośrodkowym układzie nerwowym mają pewne działanie odpornościowe podobne do działania tuftsyny. W interferonie leukocytów ludzkich wykazano obecność gamma endorfiny [108].

Wyniki naszych doświadczeń nad ośrodkowym działaniem tuftsyny [107] pozwalają na wysunięcie hipotezy, że istnieje powiązanie pomiędzy procesami odpornościowymi, a czynnościami ośrodkowego układu nerwowego. Ponadto tuftsyna i jej analogi stanowią klasę substancji mogącą mieć znaczenie dla poszukiwania nowych związków przeciwbólowych.

Zaakceptowano do druku 27 kwietnia 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Carraway R., Leeman S. E., (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 6854—6861.
2. Kitaboi P., Carraway R., Leeman S. E., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7053—7058.
3. Hammer R. A., Leeman S. E., Carraway R., Williams R. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2476—2480.
4. Carraway R., Leeman S. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1907—1911.
5. Andrews P. C., Hines C. M., Dixon J. E., (1979), *Biochemistry*, **19**, 5494—5500.
6. Kato T., Nakano T., Kojima K., Nagatsin T., Sakakibara S., (1980), *J. Neurochem.*, **35**, 527—535.
7. Leeman S. E., Carraway R. E., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 1—16.
8. Emson P. C., Goedert M., Williams B., Ninkovic M., Hunt S. P., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 198—215.
9. Uhl G. R., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 132—149.
10. Fernstrom M. H., Carraway R., Leeman S. E., (1980), W: *Frontiers in Neuroendocrinology* red. Martini L., t. 6, str. 103—127. Raven Press, New York.
11. Polak J. M., Bloom S. R., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 75—93.
12. Carraway R., Hammer R. A., Leeman S. E., (1980), *Endocrinology*, **107**, 400—406.

13. Carraway R., Cochrane D. E., Lansman J. B., Leeman S. E., Paterson B. M., Welch H. J., (1982), *J. Physiol.*, **323**, 403—414.
14. Rioux K., Kérovac R., Quirion R., St. Pierre G., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 56—74.
15. Bloom S. R., Polak J. M., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 105—116.
16. McCann S. M., Vijayan E., Koenig J., Krulich L., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 160—171.
17. Uhl G., Kuhar M., Snyder S., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4059—4063.
18. Uhl G., Snyder S., (1976), *Life Sci.*, **19**, 1827—1832.
19. Iversen L. L., Iversen S. D., Bloom F., Doughas C., Brown M., Vale W., (1978), *Nature*, **273**, 161—163.
20. Maeda K., Frohman L. A., (1981), *Brain Res.*, **210**, 261—269.
21. Henry J. L., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 216—227.
22. Yaksh T. L., Schmauss C., Micevoych P. E., Abay E. O., I Go V. L. W., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 228—243.
23. Clineschmidt B. V., McGuffin J. C., (1977), *Eur. J. Pharmacol.*, **46**, 395—398.
24. Clineschmidt B. V., McGuffin J. C., Bunting P. B., (1979), *Eur. J. Pharmacol.*, **54**, 129—139.
25. Bodnar J. R., Wallace M. M., Nilaver G., Zimmermann E. A., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 244—258.
26. Kalivas P. W., Nemeroff C. B., Prange A. J. Jr., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 307—315.
27. Herman Z. S., Jeż W., Siemion I. Z., Nawrocka E., (1984), *Acta Physiol. Pol.* **35**, 442—446.
28. Bisette G., Luttinger D., Mason G. A., Hernandez D. E., Loosen P. T., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 268—282.
29. Dunn A. J., Snijders R., Hurd R. W., Kramarcy N. R., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 345—353.
30. Widersma Greidanus van Tj. B., Praag van M. G. G., Kalman R., Rinkel G. J. E., Croiset G., Hoeke E. C., Egmond van M. A. K., Fekete M., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 319—329.
31. Luttinger D., Frye G. D., Bisette G., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 259—267.
32. Kalivas P. W., Nemeroff C. B., Prange A. J. Jr., (1981), *Brain Res.*, **520**—529.
33. Ervin G. N., Birkemo L. S., Nemeroff C. B., Prange A. J. Jr., (1981), *Nature*, **291**, 73—76.
34. Prange A. J. Jr., Nemeroff C. B., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 368—375.
35. Govoni S., Hong J. S., Yang H. Y. T., Costa E., (1980), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **215**, 413—417.
36. Manberg P. J., Nemeroff C. B., Iversen L. L., Rosser M. N., Kizer J. S., Prange A. J. Jr., (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **400**, 354—367.
37. Hess W. R., (1954), Grune and Stratton, New York.
38. Pearse A. G. E., (1978), W: Centrally Acting Peptides red. J. Hughes, str. 49—57, Macmillan, London.
39. von Euler U. S., Gaddum J. H., (1931), *J. Physiol.*, (Lond.), **72**, 74—87.
40. Lembeck F., (1953), *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **219**, 197—213.

41. Pernow B., (1953), *Acta Physiol. Scand.*, **105**, Suppl. 29, 1—90.
42. Amin A. H., Crawford T. B. B., Gaddum J. H., (1954), *J. Physiol.*, (Lond.), **126**, 596—618.
43. Chang M. M., Leeman S. E., Niall H. D., (1971), *Nature New Biol.*, **232**, 86—87.
44. Cuello A. C., Kanazawa I., (1978), *J. Comp. Neurol.*, **178**, 129—156.
45. Ljungdahl A., Hökfelt T., Nilsson G., (1978), *Neuroscience*, **3**, 861—943.
46. Paxinos G., Emson P. C., Cuello A. C., (1978), *Neurosci. Lett.*, **7**, 127—131.
47. Paxinos G., Emson P. C., Cuello A. C., (1978), *Neurosci. Lett.*, **7**, 133—136.
48. Brownstein M. J., Mroz E. A., Tappaz M. L., Leeman S. E., (1977), *Brain Res.*, **135**, 315—323.
49. Gale K., Hong J. S., Guidotti A., (1977) *Brain Res.*, **136**, 371—375.
50. Jessel T. M., Emson P. C., Paxinos G., Cuello A. C., (1978), *Brain Res.*, **152**, 487—498.
51. Bowker R. M., Steinbusch H. W. M., Coulter J. D., (1981), *Brain Res.*, **211**, 412—417.
52. Cuello A. G., Priestley J. V., Matthews M. R., (1982), *Ciba Found. Symp.*, **91**, Pitman, London 55—83.
53. Hunt S. P., Kelly I. S., Emson P. G., Kimmel J. R., Miller R. J., Wu J. Y., (1981), *Neuroscience* **6**, 1883—1898.
54. Jancsó G., Hökfelt T., Lundberg J. M., (1981), *J. Neurocytol.*, **10**, 963—980.
55. Chan-Palay B., (1979), *Anat. Embryol.*, **156**, 241—254.
1881.
56. Hökfelt T., Ljungdahl A., Steinbusch H., (1978), *Neuroscience* **3**, 517—538.
57. Johansson O., Hökfelt T., Pernow B., (1981) *Neurosci.*, **6**, 1857—1881.
58. Pelletier G., Steinbusch H. W. M., Verhofstad A. A. J., (1981), *Nature*, **293**, 71—71.
59. Beitz A. J., (1982), *Neuroscience*, **7**, 2753—2768.
60. Keen P., Harmar A. J., Spears F., Winter E., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 145—164.
61. Lee C. M., (1982), *Ciba Found Symp.* **91**, Pitman, London, 165—185.
62. Iversen U., Henley M. R., Sandberg B. E. B., Lee C. M., Pinnock R. D., Watson S. P., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 186—205.
63. Otsuka M., Konishi S., Yanogishawa M., Tsuneo A., Akagi H., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 13—34.
64. Jessel T. M., Iversen L. L., Cuello A. C., (1978), *Brain Res.*, **152**, 183—188.
65. Nagy J. I., Hunt S. P., Iversen L. L., Emson P. C., (1981), *Neuroscience* **6**, 1923—1934.
66. Akagi H., Otsuka M., Yanagisawa M., (1980), *Neurosci. Lett.*, **20**, 259—263.
67. Lembeck F., Gamse R., (1982), *Ciba Found. Symposium* **91**, Pitman, London, 35—54.
68. Gamse R., Leeman S. E., Holzer P., Lembeck F., (1981), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **317**, 140—148.

69. Lembeck F., Donner J., (1981), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **316**, 240—243.
70. Fasmer O. B., Berge O. G., Hole K., (1983), *Neuropharmacol.*, **22**, 485—487.
71. Dobry P. J. K., Piercey M. F., Schroeder L. A., (1981), *Neuropharmacol.*, **20**, 267—272.
72. Hylden J. L. K., Wilcox G. L., (1981), *Brain Res.*, **217**, 212—215.
73. Lembeck F., (1982), *Adv. Pharmacol. Ther.*, **II**, **1**, 115—126.
74. Wall P. D., Fitzgerald M., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 249—266.
75. Henry J. L., (1976), *Brain Res.*, **114**, 439—451.
76. Randić M., Miletić V., (1977), *Brain Res.*, **128**, 164—169.
77. Henry J. L., (1980), *Trends Neurosci.*, **3**, 95—97.
78. Nakata Y., Kusaka Y., Segawa T., (1979), *Life Sci.*, **24**, 1651—1654.
79. Hayes A. G., Tyers M. B., (1979), *Br. J. Pharmacol.*, **66**, 488P.
80. Yosphal K., Wright D. M., Henry L. L., (1980), *Neurosci. Abstr.*, **6**, 490.
81. Henry J. L., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 206—224.
82. Stoppini L., Baertschi A. J., Mathison R., Barja F., (1983), *Neurosci. Lett.*, **37**, 279—283.
83. Naranjo J. R., Sanchez-Franco F., Del Rio J., (1982), *Neuropharmacol.*, **21**, 1295—1299.
84. Oehme P., Krivoy W. A., (1983), *Trends in Pharmacol., Sci.*, **4**, 521—523.
85. Naranjo J. R., Del Rio J., (1982), *Eur. J. Pharmacol.*, **82**, 213—216.
86. Oehme P., Hecht K., Piesche L., Hilse H., Rath sack R., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 296—306.
87. Ryall R. W., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 267—280.
88. Glowinski J., Torrens Y., Beaujonan J. C., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 281—285.
89. Iversen S. D., (1982), *Ciba Found. Symp.* **91**, Pitman, London, 307—324.
90. Pinnock R. D., Woodruff G. M., Turnbull M. J., (1983), *Neuropharmacol.*, **22**, 687—696.
91. Garcia-Sevilla J. A., Magnusson T., Carlsson A., Folkers K., (1983), *Arzneim. Forsch.*, **9**, 1249—1254.
92. Nijjar V. A., Nishioka K., (1970), *Nature*, **228**, 672—673.
93. Nishioka K., Constantopoulos A., Satoh P. S., Mitchell W. M., Najjar V. A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 217—229.
94. Constantopoulos A., Likhite V., Crosby W. K., Najjar V. A., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 1230—1234.
95. Najjar V. A., (1980), W: *The Reticuloendothelial System*, t. 2, red. Sharra A. J., Strazss R., Plenum Publ. Corp. New York, str. 45—71.
96. Najjar V. A., Chaudhuri M. K., Konopinska D., Beck B. D., Layne P. P., Linehan L., (1981), w: *Augmenting Agents in Cancer Therapy*, red. Hersh E. M., str. 459—478, Raven Press, New York.
97. Najjar V. A., Schmidt J. J., (1980), *Lymphokine Reports*, t. 1, Academic Press, New York, 157—179.
98. Nishioka K., Amoscato A. A., Bobcock G. F., (1981), *Life Sci.*, **28**, 1081—1090.
99. Catane R., Schlanger S. M., Fuks Z. Y., (1984), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, w druku.
100. Najjar V. A., (1981), *Med. Biol.*, **59**, 134—138.

101. Bar-Shavit Z., Goldman R., Stabinsky Y., Gottlieb P., Fridkin M., Teichberg V. I., Blumberg S., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**, 1445—1448.
102. Bar-Shavit Z., Goldman R., (1982), w: *Biochemistry and function of phagocytes*, red. Rossi F., Patriarca P., str. 549—558, Plenum Publ. Corp. New York.
103. Hartung H. P., Toyka K. V., (1983), *Eur. J. Pharmacol.*, **89**, 301—305.
104. Siemion I. Z., Konopińska D., (1981), *Mol. Cell. Biochem.*, **41**, 99—112.
105. Herman Z. S., Stachura Z., Siemion I. Z., Nawrocka E., (1980), *Naturwissenschaften*, **67**, 613—614.
106. Herman Z. S., Stachura Z., Opielka Ł., Siemion I. Z., Nawrocka E., (1981), *Experientia*, **37**, 76—77.
107. Herman Z. S., Stachura Z., Krzemiński T., Plech A., Siemion I. Z., Nawrocka E., (1983), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **419**, 156—163.
108. Smith E. M., Blalock J. E., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 7530—7534.

STANISŁAW PUŻYŃSKI *)

Neuropeptydy a patogeneza i leczenie zaburzeń psychicznych typu endogennego

Neuropeptides in pathogenesis and treatment of endogenous psychiatric disorders

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Neuropeptydy a patogeneza i leczenie psychoz schizofrenicznych
 - II-1. Neuropeptydy opioidowe
 - II-2. Cholecystokinina
 - II-3. Neurotensyna
- III. Neuropeptydy a patogeneza i leczenie chorób afektywnych
 - III-1. Tyreoliberyna
 - III-2. Somatostatyna
 - III-3. Melanostatyna
 - III-4. Neuropeptydy opioidowe
 - III-5. Wazopresyna
- IV. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Neuropeptides in pathogenesis and treatment of schizophrenia
 - II-1. Opioid neuropeptides
 - II-2. Cholecystokinin
 - II-3. Neurotensin
- III. Neuropeptides in pathogenesis and treatment of affective disorders
 - III-1. Thyreoliberin
 - III-2. Somatostatin
 - III-3. Melanostatin
 - III-4. Opioid neuropeptides
 - III-5. Vasopressin
- IV. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: ACTH — adrenokortykotropina, TSH — tyreotropina, TRH — tyreoliberyna, MIF-I — melanostatyna, ADH — wazopresyna, L-DOPA — dwuhydroksyfenyloalanina, DT γ E — des-tyrozylo- γ -endorfina, DDAVP — desamino-d-arginylo-wazapresyna, β -LPH — lipotropina, α -MSH — α -melanotropina.

*) Prof. dr hab., II Klinika Psychiatryczna, Instytut Psychoneurologiczny, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa

I. Wstęp

Neuropeptydy są niejednorodną grupą związków zarówno pod względem budowy chemicznej jak też właściwości farmakologicznych oraz funkcji, które pełnią w organizmie. Znaczenie fizjologiczne części z nich, zwłaszcza na obwodzie, jest stosunkowo dobrze poznane. Dotyczy to m.in. angiotensyny i wazopresyny. Rola fizjologiczna innych neuropeptydów, na przykład cholecystokininy, neurotensyny i peptydów opioidowych wymaga dalszych badań [1]. Budowa chemiczna neuropeptydów wykazuje duże zróżnicowanie. Niektóre, jak na przykład TRH, złożone są z kilku aminokwasów (Glu-His-Pro-NH₂), w skład β-endorfiny wchodzi 31 cząstek aminokwasowych. Liczne neuropeptydy powstają w drodze proteolizy białek lub polipeptydów. Na uwagę zasługuje fakt, że niektóre hormony (np. ACTH, β-LPH, α-MSH) oraz neuropeptydy opioidowe mają wspólnego prekursora (proopiomelanokortynę) [1—5]. Większość wyodrębnionych dotychczas neuropeptydów zidentyfikowano głównie w starych filogenetycznie strukturach mózgu, m.in. w podwzgórzu, układzie limbicznym, jądrach podkorowych [5]. Wykazano, że neuropeptydy występujące w ośrodkowym układzie nerwowym wykazują wpływ na transmisję synaptyczną, głównie typu neuromodulacyjnego, niektóre zaś wydają się grać rolę substancji przekąźnikowych. Dotyczy to głównie części neuropeptydów opioidowych, m.in. β-endorfiny i enkefalin, które wykazują agonistyczny wpływ na receptory opiatowe mózgu [1—4, 6—9].

Odkrycie neuropeptydów stworzyło nową sytuację w badaniach etiologii i patogenezы zaburzeń psychicznych, zwłaszcza grupy psychoz endogennych. Pojawiły się nowe perspektywy badawcze, powstały też nadzieje uzyskania bardziej skutecznych metod terapii. Wykazanie, że oprócz klasycznych mechanizmów transmisji synaptycznej z udziałem znanych substancji neuroprzekąźnikowych, istnieją liczne inne, równie ważne mechanizmy regulujące przekazywanie informacji w ośrodkowym układzie nerwowym, skłania licznych autorów do rewaluacji dotychczasowych ustaleń i hipotez opisujących patogenezę chorób afektywnych i psychoz schizofrenicznych oraz mechanizmów działania leków psychotropowych.

W opracowaniu tym przedstawić pragnę stan badań na kilku podstawowych polach badawczych z zakresu psychiatrii, a mianowicie dotyczących patogenezы psychoz grupy schizofrenii oraz chorób afektywnych. Celem pracy jest udostępnienie zgromadzonych dotychczas faktów, nie zaś dokonanie syntezy wniosków z tych badań. Sądzę, że na taką syntezę jest jeszcze za wcześnie.

II. Neuropeptydy a patogenezа i leczenie psychoz schizofrenicznych

Powszechnie stosowany w psychiatrii termin diagnostyczny „schizofrenia” jest pojęciem niejednoznacznym, często wprowadzającym w błąd,

które ma swoje źródło w poglądach Kraepelina* [10] na etiologię i pozycję nozologiczną** otępienia wczesnego (*dementia praecox*). Już pierwsza rewizja poglądów Kraepelina, której autorem był Bleuler [11], zmierzała do podważenia koncepcji, że otępienie wczesne jest jednostką nozologiczną o przyczynach endogennych. Bleuler przedstawił wiele przekonujących dowodów, które wskazywały, że w grę wchodzi grupa schorzeń mających, co prawda, pewne wspólne cechy, które jednak różnią się przebiegiem, rokowaniem, przyczynami. Dla nazwania tych schorzeń zaproponował termin „grupa schizofrenii”. Prace Bleulera [12] dostarczyły dalszych dowodów na poparcie tezy o heterogenności psychoz schizofrenicznych. Również przedstawiciele różnych współczesnych szkół i kierunków są zgodni, że termin schizofrenia stanowi co prawda użyteczne pojęcie diagnostyczne, które klinicystom ułatwia porozumienie się, jednak jest „workiem diagnostycznym”, do którego trafiają różne przypadki, oraz że termin ten jest często nadużywany do maskowania niewiedzy o przyczynach chorób psychicznych.

Patogeneza psychoz grupy schizofrenii wiązana jest, w sposób hipotetyczny, z nadmierną aktywnością neuronów dopaminergicznego układu mezolimbicznego (por. 13). Podstawowych przesłanek dla tej hipotezy dostarcza psychofarmakologia leków neuroleptycznych i psychofarmakoterapia schizofrenii oraz badania z zastosowaniem neurohormonów. Odkrycie neuropeptydów rzuca nowe światło na patogenezę omawianej grupy psychoz, w tym na znaczenie powiązań innych układów neuroprzekaźnikowych i neuromodulacyjnych z układem dopaminergicznym.

II-1. Neuropeptydy opioidowe

Zainteresowanie udziałem peptydów opioidowych mózgu w patogenezie grupy psychoz schizofrenicznych pojawiło się niemal bezpośrednio po odkryciu enkefalin i endorfin oraz sprecyzowaniu ich hipotetycznej roli w funkcji ośrodkowego układu nerwowego, zwłaszcza neuromodulacyjnego działania w stosunku do układu dopaminergicznego. Koncepcję, w myśl której nadmierna aktywność układu dopaminergicznego w schizofrenii może być następstwem zmienionej funkcji endorfin — pierwsi wysunęli Verebey i Volavka [14] oraz de Wied [15]. Poza przesłankami teoretycznymi, również spostrzeżenia kliniczne dotyczące wpływu agonistów i antagonistów receptora opiatowego na stan psychiczny chorych uzasadniały hipotezę. Wymienić tu należy m.in. od dawna znany kojący wpływ pochodnych opium w stanach podnieceniowych i psychotycznych, kataleptogenne działanie niektórych egzogennych opiatów, psychomimetyczny wpływ ketocyklazocyny (antagonisty receptora opiatowego) i inne.

W okresie minionych 5 lat opublikowano kilkadziesiąt prac badaw-

* Kraepelin sądził, że otępienie wczesne jest samodzielną jednostką chorobową.

** Nozologia jest działem potologii zajmującym się stroną opisową schorzeń.

czych, których celem jest weryfikacja wspomnianej hipotezy. Wyczerpujące podsumowanie zgromadzonych dotychczas sprzecznych informacji przekracza zakres tego opracowania. Niemal wszyscy, którzy podejmują się tego zadania przyznają, że nie sposób jest dokonać tu jakichkolwiek uogólnień, zaś analiza dotychczasowych badań skłania autorów przeglądów do jednoczesnego przedstawiania kilku przeciwstawnych wniosków, które streścić można następująco:

A. Chorych na schizofrenię cechuje podwyższona aktywność układów opiatowych ośrodkowego układu nerwowego, zaś skuteczne postępowanie lecznicze wiąże się ze stosowaniem antagonistów receptorów opiatowych, np. naloksonu.

B. W mózgu chorych na schizofrenię pojawia się hipoaktywność układów opiatowych, na co wskazują m.in. pozytywne wyniki leczenia za pomocą β -endorfiny.

C. W organizmie chorych na schizofrenię ma miejsce synteza nieprawidłowych endogennych agonistów receptorów opiatowych, np. leu-endorfiny.

D. U chorych na schizofrenię nie występują typowe zaburzenia systemu opiatowego mózgu, zaś związki działające agonistycznie lub antagonistycznie wobec receptorów opiatowych nie wykazują większego znaczenia leczniczego.

E. W ośrodkowym układzie nerwowym chorych na schizofrenię nie występują charakterystyczne zaburzenia układów opiatowych, natomiast można wyróżnić podgrupy chorych, u których występuje wariant A, B lub C zaburzeń.

Do chwili obecnej nie zweryfikowano żadnej z tych możliwości i wciąż mamy do czynienia z rozbieżnościami stwierdzanych faktów i ich interpretacji. Dotyczą one wszystkich prowadzonych zakresów badań.

Związki działające agonistycznie na receptor opiatowy w terapii schizofrenii

Większość opublikowanych, a zapoczątkowanych przez de Wieda [16], prac dotyczy stosowania w przewlekłych psychozach schizofrenicznych des-tyrosylo- γ -endorfiny (DT γ E), peptydu nie wykazującego aktywności opiatowej. Preparat podawano w dawce od 2 do 10 mg domięśniowo na dobę, zaś jego działanie oceniano za pomocą próby otwartej i podwójnie ślepej. Niektórzy autorzy obserwowali u części chorych (u ok. 50%) działanie DT γ E zbliżone do neuroleptycznego (w tym wpływ przeciwojeniowy i przeciwoamowy) [16—20]. U dużego odsetka chorych poprawy były przemijające i po przerwaniu leczenia obserwowano pogorszenie stanu klinicznego. Inni [21, 22] obserwowali jedynie przemijające poprawy stanu klinicznego głównie w schizofrenii „ostrej”, zaś wyniki w psychozach przewlekłych okazały się złe [22]. Kilku autorów nie zauważyło godnych uwagi zmian klinicznych u chorych leczonych za pomocą

DT γ E [23—27]. Verhoeven i wsp. [28] zastosowali u chorych na schizofrenię des-enkefalino- γ -endorfinę (DE γ E, lipotropinę 66—77), która jest najkrótszym fragmentem β -endorfiny, wykazującym działanie podobne do neuroleptycznego. Spośród 17 leczonych osób, u 4 wystąpiła znacząca poprawa stanu klinicznego, u 11 częściowa i jedynie u 2 chorych nie obserwowano zmian stanu klinicznego. Zdaniem autorów profil działania psychotropowego DT γ E i DE γ E jest zbliżony. Mechanizm działania des-tyrosylo- γ -endorfiny nie jest jasny. De Wied [16] porównywał go do działania neuroleptyków. Wpływ omawianego związku na układ dopaminergiczny wymaga jednak dalszych badań. Wyjaśnienia wymaga obserwowany przez niektórych autorów spadek poziomu prolaktyny w czasie stosowania DT γ E w celach terapeutycznych, co może sugerować dopaminergiczne działanie neuropeptydu [19, 28, 29].

Dostępne nieliczne prace zawierające obserwacje kliniczne dotyczące stosowania β -endorfiny w schizofrenii zawierają informacje sprzeczne. Podano opisy „dramatycznej poprawy” stanu klinicznego [30, 31]. Obserwowano istotną statystycznie, lecz nie znamiennej z punktu widzenia klinicznego poprawę stanu psychicznego po zastosowaniu 10—20 mg preparatu, zjawisku temu towarzyszył wzrost poziomu prolaktyny we krwi [32]. Niektórzy autorzy nie zauważyli jednak istotnych zmian stanu klinicznego leczonych chorych [33], przy czym u części z nich obserwowano pogorszenie (narastanie cech depresji) [33, 34].

W badaniach nad rolą receptorów opiatowych w schizofrenii zastosowano również syntetycznego agonistę — metadon. Pierwsze obserwacje dotyczące pojedynczych chorych opublikował Kline i wsp. [30]. Wskazywały one na leczniczy wpływ metadonu. Jednak inni autorzy, po zastosowaniu 10 mg tej substancji domięśniowo, obserwowali pogorszenie stanu psychicznego badanych chorych, wystąpiła u nich senność, narosło zahamowanie sfery ruchowej, pogorszył się kontakt słowny, wystąpiły cechy depresji [35].

W innej grupie badań dotyczącej udziału receptorów opiatowych w schizofrenii zastosowano syntetyczny analog metionino-enkefaliny (FK 33-824, Sandoz). W kilkusobowych grupach chorych, obserwowano przemijającą poprawę objawową oraz działanie euforyzujące [36—38].

Związki działające antagonistycznie na receptor opiatowy w leczeniu schizofrenii

Przeciwstawny do omówionego kierunku poszukiwań, to próby przeciwdziałania zwiększonej aktywności układów opiatowych mózgu chorych na schizofrenię. Historyczne już znaczenie mają próby leczenia schizofrenii za pomocą dializy, której celem było eliminowanie endogennych opiatów z organizmu chorych. Podsumowanie obserwacji dokonanych do 1980 roku opublikował Fogelson i wsp. [39]. Do 1981 roku leczono tym sposobem 103 chorych, wśród których u 43 uzyskano różny stopień po-

prawy stanu klinicznego (w tym u 22 osób znaczną). Brak jest jednak dostatecznych podstaw by sądzić, że zmniejszenie ilości substancji opiatowych odegrało znaczenie lecznicze, bowiem większość autorów nie oznaczała poziomu β -endorfiny we krwi. Po zabiegu dializacyjnym obserwowano, wbrew oczekiwaniom, zwiększenie poziomu β -endorfiny we krwi (badano immunoreaktywność β -endorfinopodobną) [40]. Omówiony kierunek badań wniósł niewiele do poznania udziału układu opiatowego ośrodkowego układu nerwowego w patogenezie schizofrenii.

Większe zainteresowanie wzbudzają próby stosowania antagonistów receptora opiatowego u chorych na schizofrenię, które służą weryfikacji tezy, że w tej grupie schorzeń występuje wzmożona aktywność układów opiatowych mózgu. Opublikowano dotychczas 43 doniesienia, których autorzy stosowali najczęściej nalokson (34 prace, łącznie 265 chorych), znacznie rzadziej naltrekson (9 prac, 42 chorych). Wyczerpujące podsumowanie większości dotychczasowych obserwacji przedstawili M u e s e r i D y s k e n [41]. W analizie uwzględniono m.in. obraz kliniczny chorych, metodologię badań, dawki antagonistów. Wnioski tej analizy streścić można następująco. Wyniki stosowania naloksonu są bardzo zróżnicowane i zależą w dużym stopniu od dawki. Przy dawkach mniejszych (do 4 mg na dobę) liczba niepowodzeń terapeutycznych jest bardzo duża, i odwrotnie, stosowanie dużych dawek (10 mg na dobę i większych) często wiąże się z korzystnymi zmianami stanu klinicznego chorych. Zmiany te dotyczyły omamów, zaburzeń myślenia oraz zachowania i utrzymywały się od kilku godzin do kilku dni po podaniu leku. Również w postaci katatonicznej schizofrenii obserwowano przemijający efekt leczniczy. Naltrekson (dawki 50—800 mg na dobę), w porównaniu z naloksonem, okazał się antagonistą znacznie mniej skutecznym.

Należy podkreślić, że wiele prób klinicznych z naloksonem ma charakter kazuistyczny. W większości opublikowanych prac mała liczba osób leczonych wyklucza możliwość dokonania analizy statystycznej. Stosowano przy tym różnorodne kryteria diagnostyczne i różne metody oceny stanu klinicznego. Mimo tych zastrzeżeń autorzy są skłonni przyjąć, że nalokson wywiera przemijający wpływ leczniczy w schizofrenii, nawet u chorych, u których zawiodły podstawowe metody leczenia.

Pozytywne doświadczenia z naloksonem nie rozstrzygają definitywnie spornych zagadnień dotyczących udziału i roli układów opiatowych w patogenezie i w leczeniu schizofrenii. Mechanizm działania tego związku jest prawdopodobnie złożony. Działanie dużych dawek preparatu, które przyniosły pewien efekt leczniczy może być niespecyficzne, tzn. nie związane z antagonistycznym wpływem na receptor opiatowy. Należy również brać pod uwagę możliwość oddziaływania agonistycznego [42]. W rozważaniach nad mechanizmami działania dużych dawek naloksonu należy również uwzględnić możliwość wpływania tego związku na układ GABAergiczn-

ny, którego udział w patogenezie schizofrenii jest również postulowany [43].

Ocena aktywności układów opiatowych w płynach ustrojowych, chorych na schizofrenię

Badania nad aktywnością opiatową płynu mózgowo-rdzeniowego osób chorych na schizofrenię wykazały wzrost tej aktywności (bez sprecyzowania o którą substancję opiatową chodzi) [44—47], brak istotnych różnic w porównaniu z grupą osób zdrowych [48], bądź też obniżenie aktywności opiatowej [49, 50]. Obserwowany spadek aktywności opiatowej jest wiązany z lękiem oraz sytuacją stresową [50]. Wpływ leków psychotropowych na omawianą aktywność jest mało poznany, zaś wzrost aktywności opiatowej płynu mózgowo-rdzeniowego chorych na schizofrenię w czasie leczenia haloperydolem obserwowany przez jedną grupę autorów [47] wymaga potwierdzenia.

Badania ilościowe dotyczące zawartości β -endorfiny w płynie mózgowo-rdzeniowym i we krwi najczęściej wskazują na brak znaczących różnic w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych [48, 49, 51, 52]. Jedynie D o m s c h k e i w s p. [53] obserwowali zwiększoną ilość β -endorfiny w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z ostrą formą schizofrenii i obniżoną w schizofrenii przewlekłej.

Podsumowując dotychczasowy stan badań nad układami opiatowymi w psychozach schizofrenicznych stwierdzić można, że nie dostarczają one przekonujących przesłanek o znaczeniu tych układów w patogenezie omawianych psychoz. Na uwagę zasługuje pogląd V o l a v k a i w s p. [54], którzy dowodzą, że zarówno hipoaktywność, jak również hiperaktywność układów endorfinowych prowadzić może do zmian tego samego typu w układzie dopaminergicznym, mianowicie do nadwrażliwości receptorów tego układu.

II-2. Cholecystokinina

Zainteresowanie cholecystokininą, a ściślej jej fragmentem oktapeptydowym (CCK—8) oraz dekapeptydowym (ceruleina) w patogenezie i terapii schizofrenii wiąże się z wykryciem tego neuropeptydu w korze mózgu, hipokampie, podwzgórzu, prążkowiu oraz wykazaniem, że hamuje on metabolizm dopaminy, wpływa na liczbę i wrażliwość receptorów dopaminy w prążkowi, działa kataleptogennie oraz przeciwdziała stereotypii amfetaminowej, a więc przypomina w pewnym zakresie działanie neuroleptyków. Przypuszcza się, że CCK—8 jest endogennym neuromodulatorem kontrolującym w sposób hamujący układ dopaminergiczny mózgu (przynajmniej w niektórych jego strukturach) [16]. Pierwsze prace zgodnie wskazywały na przeciwpsychotyczne działanie obu peptydów w psycho-

zach schizofrenicznych [55—57]. Majori i wsp. [55] wpływ taki dostrzegali u 20 chorych z przewlekłą schizofrenią, u których zawiodło leczenie neuroleptyczne. Praca ta zasługuje na specjalną uwagę, zawiera bowiem szczegółowe dane o chorych, obrazie klinicznym, dotychczasowym leczeniu oraz o indywidualnych rezultatach stosowania ceruleiny. Środek ten stosowano jednorazowo w dawce 0,3 lub 0,6 mg/kg wagi ciała, w toku leczenia ustabilizowanymi dawkami neuroleptyków. Autorzy obserwowali znamienne poprawę bezpośrednio po wstrzyknięciu preparatu, która narastała w okresie 1—2 tygodni i utrzymywała się przez 3 tygodnie. Majori i wsp. sądzą w związku z tym, że badany decapeptyd wykazuje długotrwałe działanie przeciwpsychotyczne. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w toku leczenia ceruleiną nie obserwowano żadnych objawów ubocznych. Nair i wsp. [56] stosowali CCK—8 w dawce 0,3 mg/kg wagi ciała u 6 chorych z rozpoznaniem schizofrenii. Obserwowali wyraźny efekt przeciwpsychotyczny bezpośrednio po podaniu oktapeptydu, który narastał, osiągał maksymalne nasilenie 3 dnia i utrzymywał się przez 2 tygodnie. Bloom i wsp. [57] za pomocą CCK—8 leczyli 8 chorych z rozpoznaniem schizofrenii, uzyskali u wszystkich natychmiastową poprawę. Po 6 dniach utrzymywała się ona u 5 chorych, u pozostałych była mniej wyraźna. Ostatnio opublikowane badania przeprowadzone u 9 chorych (metodą podwójnie ślepej próby) nie otrzymujących leków neuroleptycznych w czasie doświadczenia, nie potwierdziły przeciwpsychotycznego działania ceruleiny [58].

Pomiary zawartości cholecystokininy w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych na schizofrenię i choroby afektywne dostarczyły informacji sprzecznych, jedna grupa autorów nie obserwowwała różnic w porównaniu z osobami zdrowymi (Gjerris i Fahrenkrug, cyt. za 59), inni zauważyli istotne obniżenie ilości cholecystokininy w płynie mózgowo-rdzeniowym w obu grupach chorych [60].

II-3. Neurotensyna

Zbliżone właściwości farmakologiczne do cholecystokininy wykazuje neurotensyna, endogenny trójdekapeptyd występujący w dużych stężeniach w jądrze półkolumnym, jądrach migdałowatych, podwzgórz. Neurotensyna prawdopodobnie pełni rolę neuromodulacyjną wobec układu dopaminergicznego i wykazuje szereg cech właściwych neuroleptykom [61]. Nemeroff [61] wysunął w związku z tym hipotezę, że omawiany neuropeptyd może odgrywać rolę w schizofrenii (deficyt neurotensyny w układzie mezolimbicznym). Stwierdzono później, że poziom neurotensyny w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na schizofrenię w okresie wolnym od stosowania leków jest obniżony w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych, zaś w toku leczenia neuroleptycznego obserwowano normaliza-

cję zawartości neuropeptydu w płynie mózgowo-rdzeniowym [62]. W badaniach pośmiertnych mózgow chorych na schizofrenię stwierdzono m.in. obniżenie ilości neurotensyny w jądrach migdałowatych [63, 64].

III. Neuropeptydy a patogeneza i leczenie chorób afektywnych

Przez ponad 50 lat ogół chorób afektywnych rozpatrywano jako jedno schorzenie psychiczne znane pod nazwą „psychozy maniakalno-depresyjnej”, zaś jej poszczególne odmiany kliniczne traktowane były za *Kraepelinem* [65] jako różnorodne formy przebiegu jednego i tego samego schorzenia. Badania *Leonharda* [66] oraz *Angsta i Perrisa* [67], kontynuowane przez licznych autorów, poświęcone rodzinnemu występowaniu chorób afektywnych i ich obrazowi klinicznemu, w tym przebiegowi i zejściu, oraz leczeniu doprowadziły do podważenia koncepcji psychozy maniakalno-depresyjnej jako jednostki nozologicznej i stały się podstawą do wyodrębnienia dwóch grup endogennych chorób afektywnych: choroby afektywnej jednobiegunowej (zwanej też depresją okresową, depresją fazową) oraz choroby afektywnej dwubiegunowej (czyli psychozy maniakalno-depresyjnej w sensie ścisłym).

Coraz więcej danych wskazuje też, że obie choroby nie są jednostkami nozologicznymi w ścisłym znaczeniu tego pojęcia i już obecnie zarysowały się tendencje do wydzielania bardziej homogennych podgrup zaburzeń afektywnych.

Patogeneza chorób afektywnych, zwłaszcza występujących w nich depresji typu endogennego, wiązana jest z wadliwą funkcją układu limbicznego, podwzgórza, układu siateczkowego, będącą następstwem zaburzeń (obniżona aktywność) układów monoaminergicznego mózgu, w szczególności układu noradrenergicznego i serotoninergicznego [68]. Mechanizm terapeutycznego działania leków psychotropowych ma wiązać się z normalizacją obu układów. Jest zrozumiałe, że wspomniana hipotetyczna lokalizacja zmian patogenetycznych i postulowane zaburzenia monoamin ośrodkowego układu nerwowego stały się źródłem dużego zainteresowania układem hormonalnym w depresjach endogennych, w szczególności neurohormonami peptydowymi podwzgórza.

III-1. Tyreoliberyna

Pierwszym neuropeptydem, który stał się przedmiotem intensywnych badań na tym polu jest tyreoliberyna (TRH). Badania takie, zapoczątkowane w 1972 roku przez *Prange i w sp.* [69] obejmują obecnie blisko 100 publikacji. Podsumowali je w 1982 roku *Loosen i Prange* [70]. Konkluzje tego źródłowego podsumowania są następujące. W depresjach endogennych istotnie często stwierdza się osłabienie sekrecji tyreotropiny (TSH) po podaniu TRH (autorzy 41 prac spośród 47 opublikowanych do

roku 1980 potwierdzili to zjawisko). Wykazano jednocześnie, że osłabiona reakcja tyreotropiny na TRH nie jest specyficzna dla depresji endogennej, występuje też w zespołach maniakalnych, zespole *anorexia nervosa* (jadłowstręt psychiczny), u osób uzależnionych od alkoholu. Część autorów opisane zjawisko odnosi głównie do choroby afektywnej jednobiegunowej. Zauważono też, że u większości chorych po przemianieniu stanu depresyjnego pojawia się normalizacja reakcji na TRH, przy czym u osób, których stan kliniczny uległ poprawie lecz sekrecja TSH po podaniu TRH jest obniżona, ma istnieć wysokie ryzyko nawrotu stanu depresyjnego.

Mechanizm osłabionej sekrecji TSH na podanie TRH nie jest jasny. Wysłunięto koncepcję, że zjawisko to wiąże się z wyjściową wzmoczoną sekrecją TRH i następczym obniżeniem wrażliwości receptorów na trójpeptyd (ang. *down regulation*) [70]. Rozważana jest też możliwość, że pierwotny defekt dotyczy sekrecji TSH, np. na skutek wzmoczonej aktywności układów hamujących tę sekrecję, zwłaszcza dopaminergicznego i neurotransynowego.

Prange i wsp. [69] jako pierwsi zastosowali TRH w leczeniu chorych z depresją endogenną. W minionym 10-leciu opublikowano kilkanaście prac na ten temat, zakres stosowanych dawek TRH: 20—100 mg per os lub 0,2—1,0 mg dożylnie na dobę. Ocena wyników leczenia jest nader różnicowana, od ocen bardzo dobrych i dobrych [69, 71—73], do negatywnych [74—77].

Wątpliwości wzbudza rodzaj (profil kliniczny) działania psychotropowego TRH. Liczni autorzy dostrzegali głównie wpływ „energizujący”, „psychostymulujący” lub „euforyzujący”, a więc zbliżony do działania amfetaminy, który pojawia się jedynie w okresie działania preparatu (kilka godzin po jego podaniu), a następnie przemija [78]. Działanie amfetaminopodobne TRH obserwowano również u osób zdrowych [79]. Wykazano też, że wpływ TRH na zapis elektroencefalograficzny oceniany metodą komputerową (tzw. komputer-elektroencefalografia, CEEG) przypomina działanie amfetaminy [80]. Niektórzy autorzy sądzą, że TRH działa leczniczo jedynie w pewnej podgrupie depresji endogennych, która nie została dotychczas bliżej scharakteryzowana, że są to głównie chorzy z ośrodkowym deficytem układu noradrenergicznego [78].

Mechanizm domniemanego przeciwdepresyjnego działania TRH nie jest jasny. Trójpeptyd ten wykazuje działanie neuromodulacyjne w neuronach serotonergicznym i noradrenergicznym, w których nasila transmisję synaptyczną. Dotyczyć to ma również neuronów cholinergicznym, co różni działanie TRH w zestawieniu z trójpierscieniowymi lekami przeciwdepresyjnymi. W testach u zwierząt doświadczalnych TRH wykazuje liczne podobieństwa do tych leków, m.in.: przeciwdziała hipotermii rezerpinowej, tetrabenazykowej i po oksotremorynie, nasila efekty L-DOPA, serotoniny, oraz wzmaga działanie toksyczne johimbiny, nie przeciwdziała jednak katalepsji i ptozie powodowanej przez wymienione trzy mo-

delowe środki farmakologiczne [81]. Podjęto również pojedyncze próby stosowania TSH w leczeniu depresji, jako środka wspomagającego działanie trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych. Prange i wsp. [71] obserwowali przy tym zwiększenie działania przeciwdepresyjnego imipraminy, której wpływ leczniczy ujawniał się szybciej. Jest jednak prawdopodobne, że przyspieszenie działania imipraminy mogło wiązać się ze wzmożoną sekrecją hormonów tarczycy spowodowaną przez TSH, których potencjalizujący wpływ na działanie trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych jest udowodniony.

III-2. Somatostatyna

Somatostatyna to następny neuropeptyd, który wzbudza zainteresowanie w ośrodkach zajmujących się patogenezą chorób afektywnych. Wiąże się to ze szczególną lokalizacją neuronów zawierających somatostatynę w mózgu oraz interakcjami tego neurohormonu z układami monoaminergicznymi. Neurony zawierające somatostatynę występują w podwzgórzu, jądrach migdałowatych, zakręcie hipokampa, korze mózgowej, zaś zakończenia nerwowe w układzie komorowym. Somatostatyna wzmaga obrót metaboliczny noradrenaliny, dopaminy, serotoniny oraz acetylocholinę, zaś jej uwalnianie jest kontrolowane przez układ noradrenergiczny i dopaminergiczny. Również efekty behawioralne u zwierząt powodowane przez somatostynę skłaniają do uwzględnienia neurohormonu w rozważaniach dotyczących patogenezy chorób afektywnych. Wykazano m.in. że neuropeptyd ten wywołuje zaburzenia snu, których obraz elektroencefalograficzny przypomina obserwowany w depresji endogennej. Obniżenie zawartości somatostatyny w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono u osób z organicznymi zmianami ośrodkowego układu nerwowego, m.in. w chorobie Alzheimera, płasawicy Huntingtona, stwardnieniu rozsianym, chorobie Parkinsona, co skłania niektórych autorów do przypisywania deficytowi somatostatyny patogenicznego znaczenia w zespołach psychoorganicznych [82, 83]. Pomiar zawartości somatostatyny w płynie mózgowo-rdzeniowym osób z rozpoznaniem chorób afektywnych wykazały znamienne statystycznie obniżenie ilości hormonu w okresie fazy depresyjnej w porównaniu z okresem remisji oraz grupą kontrolną osób zdrowych [82, 83]. Stwierdzono istotną zależność pomiędzy ilością somatostatyny w płynie mózgowo-rdzeniowym i zawartością w płynie kwasu 5-hydroksyindolooctowego i noradrenaliny [82, 83].

III-3. Melanostatyna

Melanostatyna (MIF-1), trójpętyd hamujący uwalnianie melanotropiny, należy do neurohormonów, których rola fizjologiczna jest wciąż mało poznana. Duża zawartość melanostatyny w jądrach podkorowych układu

pozapiramidowego oraz stwierdzona interakcja w układzie dopaminergicznym (nasila efekty L—DOPA) — skłoniły do prób stosowania tego neurohormonu w zespołach parkinsonowskich, przy czym uzyskano na ogół pozytywne efekty terapeutyczne, zwłaszcza gdy preparat stosowano pozajelitowo. W latach 1974—1978 Ehrensing i Kastin [84, 85] opublikowali wyniki leczenia depresji endogennych za pomocą omawianego trójpeptydu. Autorzy obserwowali efekt zależny od dawki, małe dawki melanostatyny (75 mg na dobę) przynosić miały znaczący efekt przeciwdepresyjny, przy dawkach większych (do 750 mg na dobę) takiego wpływu nie obserwowano. Spostrzeżenia Ehrensinga i Kastina nie zostały do tychczas zweryfikowane.

III-4. Neuropeptydy opioidowe

Odkrycie receptorów opioidowych w mózgu i ich endogennych ligandów spotkało się z natychmiastowym oddźwiękiem w badaniach patogenezy chorób afektywnych. Takie szybkie podjęcie badań wiązało się m.in. z dawnymi pozytywnymi doświadczeniami klinicznymi ze stosowaniem opiatów w leczeniu depresji oraz postulowanym obecnie podstawowym znaczeniem układów opiatowych dla takich zjawisk psychicznych, jak nastrój, zjawiska bólowe i inne.

Przypomnieć warto, że *Tinctura Opii* należała, od czasów Kraepelina, do podstawowego zestawu leków używanych w psychiatrii przez ponad pół wieku. Stosowano ją w stanach depresyjnych, zwłaszcza z dużym łękiem i podnieceniem ruchowym (*depressio agitata*). I chociaż w owych latach nie prowadzono badań kontrolowanych, nie ma podstaw by podważać obserwacje lekarzy praktyków, które wskazują, że za pomocą tego leku uzyskiwano zupełnie dobre wyniki leczenia depresji. Część współczesnych badań, prowadzonych zgodnie z nowoczesnymi wymogami metodologicznymi, potwierdza spostrzeżenia sprzed 50 lat co do terapeutycznej wartości pochodnych opium w depresji [86, 87].

Przeprowadzone pod koniec lat 60-tych badania nad cyklazocyną potwierdziły, że ten agonista-antagonista receptora opioidowego, stosowany w dawce 1,—3,0 mg na dobę wywiera wpływ leczniczy w depresji [86]. Na przeszkodzie w szerszym zastosowaniu tego związku w lecznictwie stanęła okoliczność, że wywiera on działanie psychomimetyczne. Również niektóre spostrzeżenia kliniczne mogą wskazywać na udział układów opioidowych w patogenezie chorób afektywnych, zwłaszcza depresji. Wymienić tu należy przede wszystkim zwiększoną wrażliwość na ból chorych z depresją endogenną [88] oraz pospolite występowanie skarg i dolegliwości typu bólowego w depresji, które stanowią jej maskę (bóle głowy, bóle z zakresu nerwów obwodowych, splotów i pni nerwowych) [68]. Zwraca też uwagę stosunkowo częste występowanie zaburzeń psychicznych z kręgu chorób afektywnych po odstawieniu opioidów [27] oraz obserwowane u

osób zdrowych reakcje depresyjne po podaniu antagonistów receptora opioidowego [89].

We współczesnych badaniach nad rolą układów opioidowych w chorobach afektywnych stosowane są różne strategie badawcze. Do najważniejszych należą: próby leczenia depresji za pomocą agonistów receptorów opioidowych, próby terapii zespołów maniakałnych za pomocą antagonistów omawianych układów oraz ocena układów opioidowych u chorych na choroby afektywne oraz w toku terapii depresji i manii.

Związki działające agonistycznie na receptor opioidowy w terapii depresji endogennej

Pierwsze obserwacje kazuistyczne, które wskazywały na przeciwdepresyjny wpływ β -endorfiny (dawki 1,5—6,0 mg) opublikował *Kline* i w sp. [30]. Inni autorzy [33, 90] obserwowali znaczącą, choć przemijającą poprawę stanu klinicznego u 10 chorych z depresją po upływie 2—4 godzin od wstrzyknięcia dożylnego β -endorfiny. W czasie stosowania neuropeptydu obserwowano również zmianę fazy depresyjnej w maniakałną [91]. Z tymi obserwacjami korespondują kazuistyczne spostrzeżenia poczynione w trakcie stosowania β -endorfiny w schizofrenii, które wskazują, że związek ten przynosił efekt leczniczy m.in. u chorych, u których w obrazie klinicznym stwierdzono depresję [31, 32]. Jedynie *Pickar* i w sp. [92] nie zauważyli istotnych zmian stanu klinicznego chorych z depresją, którym podawano β -endorfinę.

Hipotezę, że endogenny zespół depresyjny może w jakimś stopniu wiązać się z obniżoną aktywnością układów opioidowych wspierają badania nad mechanizmem działania elektrowstrząsów, z których wynika, że zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i u ludzi zabieg elektrowstrząsowy powoduje znaczny wzrost aktywności układu β -endorfinowego [93, 94, 51].

W leczeniu stanów depresyjnych zastosowano też buprenorfinę. Spośród 10 osób wykazujących oporność na trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, u połowy dawka 0,2 mg dziennie przyniosła znaczącą poprawę stanu klinicznego [95]. Buprenorfina wykazuje jednak złożony, agonistyczno-antagonistyczny wpływ na receptor opioidowy.

Próby zastosowania antagonistów receptora opioidowego w depresji (stosowano nalokson w dawce do 6 mg na dobę) dały wyniki negatywne [96—98], obserwowano też pogorszenie stanu klinicznego chorych [99].

Podsumowując dotychczasowe badania dotyczące prób stymulacji układów opiatowych ośrodkowego układu nerwowego w depresji endogennej można wstępnie przyjąć, że przyniosły one zachęcające wyniki lecznicze i mogą pośrednio wskazywać na udział deficytu układu endorfinowego w patogenezie depresji.

Związki działające antagonistycznie na receptor opioidowy w terapii zespołów maniakalnych

Autorami koncepcji, że podwyższona aktywność układów opioidowych mózgu może mieć znaczenie w patogenezie endogennej manii jest Byck [100] oraz Beluzzi i Stein [101]. W weryfikacji hipotezy posłużono się głównie naloksonem, antagonistą receptora opioidowego, który stosowano w zespołach maniakalnych występujących w chorobie afektywnej dwubiegunowej. Badania te mają, jak dotychczas, charakter eksperymentalny nie zaś terapeutyczny w sensie ścisłym. Stosowano jednorazowo dużą dawkę naloksonu dożylnie (do 20 mg) i badano wpływ preparatu na objawy i cechy zespołu maniakalnego. Judd i Janowsky [102—105] podają opisy korzystnych zmian stanu klinicznego chorych z manią, które utrzymywały się krótko (1—2 godziny) po dożylnym podaniu 20 mg naloksonu i dotyczyły 1/3 badanych chorych (łącznie leczono 12 osób). Autorzy zauważyli, że taka przemijająca poprawa kliniczna występuje u osób, u których stwierdza się osłabioną sekrecję kortyzolu po podaniu naloksonu [105, 106]. Należy jednocześnie podkreślić, że ta sama grupa autorów obserwowwała korzystne zmiany stanu psychicznego chorych z manią po podaniu im jednorazowo 10 mg metadonu, i wbrew oczekiwaniom nie obserwowano zaostrzenia cech zespołu maniakalnego [107].

Inni autorzy nie stwierdzili, żeby nalokson wywierał jakikolwiek wpływ leczniczy w zespole maniakalnym [108]. Również badania wykonane pod auspicjami Światowej Organizacji Zdrowia nie potwierdziły przeciwmaniakalnego działania naloksonu [109].

Przeprowadzone dotychczas obserwacje działania naloksonu w zespole maniakalnym nie uprawniają do żadnych uogólnień i wydaje się, że niewiele wniosły dla poznania znaczenia układów opioidowych w patogenezie endogennej manii. Liczba chorych, u których prowadzono obserwacje jest bardzo mała, uzyskane wyniki niejednoznaczne, zaś stosowane duże dawki naloksonu nie pozwalają na ocenę czy obserwowane efekty zależne były od wpływu preparatu na receptory opiatowe, czy też związane z działaniem na inne układy neuroprzekaźnikowe, np. na układ GABAergiczny.

Ocena aktywności układów opioidowych w chorobach afektywnych

Ten rodzaj badań wiąże się z pomiarami aktywności opioidowej płynu mózgowo-rdzeniowego lub osocza, lub też ilości β -endorfiny w obu płynach ustrojowych.

Wyniki oznaczeń aktywności opioidowej płynu mózgowo-rdzeniowego w okresie fazy depresyjnej i maniakalnej są na ogół zgodne co do stwierdzenia, że w okresie manii aktywność ta jest większa niż w okresie depresji [45, 49]. Aktywność opioidowa płynu mózgowo-rdzeniowego w okresie

depresji w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych wykazuje mniej znaczące różnice lub ich brak [44, 40]. Terenius i wsp. [44] obserwowali wzrost ilości frakcji I (hydrofilnej, 1000—2000 m.cz.) warunkującej aktywność opioidową. Nowsze badania potwierdzają obserwacje Tereniusa i wsp., wskazując jednocześnie, że wzrost ilości frakcji I dotyczy głównie osób z chorobą afektywną jednobiegunową [110]. Wzrost ilości tej frakcji w płynie mózgowo-rdzeniowym występuje równocześnie z hipersekrecją kortyzolu. Również we krwi stwierdzano zwiększenie aktywności opioidowej w okresie stanu maniakalnego w porównaniu z okresem depresji [111].

Pomiary ilościowe β -endorfiny (metodą radioimmunologiczną) we krwi w okresie depresji nie wykazały istotnych różnic w porównaniu z osobami zdrowymi [49, 94, 112]. Stwierdzono natomiast zwiększenie ilości β -endorfiny po zabiegach elektrowstrząsowych [94, 113]. Zjawisko to utrzymywało się, a nawet narastało po kolejnych zabiegach, zauważono też, że u tych chorych, u których nastąpiła poprawa stanu klinicznego — deksametazon powoduje nie tylko supresję sekrecji kortyzolu, lecz również obniżenie ilości β -endorfiny w osoczu w okresie 24 godzin po podaniu tego syntetycznego hormonu [94]. Zjawiska supresji β -endorfiny przez deksametazon nie obserwowano przed leczeniem elektrowstrząsami [94].

Podsumowując — badania kliniczne i metaboliczne przeprowadzone dotychczas na materiale klinicznym dostarczają danych, które mogą wskazywać na udział układów opiatowych mózgu w patogenezie chorób afektywnych (zwłaszcza w depresji). Dotychczasowe badania nie wyjaśniają genezy stwierdzanych zmian aktywności układów opiatowych, ani też nie pozwalają na interpretację ich znaczenia dla kształtowania obrazu klinicznego zespołów depresyjnych i maniakalnych. Nie jest w szczególności jasne, czy są one pierwotne do stwierdzanych zmian układów monoaminergicznego mózgu, czy też ich skutkiem. Nie jest też wykluczone, że mogą być zjawiskiem niespecyficznym, związanym ze stresem, który nieodłącznie towarzyszy stanowi depresyjnemu i maniakalnemu.

III-5. Wazopresyna

Z zagadnieniem stosowania agonistów i antagonistów receptora opioidowego w chorobach afektywnych wiążą się w pewnym stopniu badania przydatności wazopresyny (ADH) w terapii depresji i jej rolę w patogenezie tego zespołu. Uzasadnienie teoretyczne dla stosowania peptydu w leczeniu endogennego zespołu depresyjnego przedstawili Gold i wsp. [87, 114]. Autorzy przytaczają następujące obserwacje kliniczne i wyniki badań doświadczalnych. Dotychczasowe badania wydają się wskazywać, że wazopresyna wywiera korzystny wpływ na zaburzenia pamięci występujące w zespole depresyjnym. Podstawową cechą obrazu klinicznego depresji endogennej są zaburzenia podstawowych rytmów biologicznych, m.in. rytmu snu i czuwania. Wazopresynie ma przypadać istotne znaczenie

w synchronizacji tych rytmów. W czasie stosowania endorfiny obserwowano poprawę stanu klinicznego chorych z depresją endogenną, zaś stymulacja układów endorfinowych prowadzi do wzmożonej sekrecji wazopresyny. Stwierdzono, że nalokson wywiera u niektórych chorych działanie przeciwmaniakalne, preparat ten poprzez hamujące działanie na receptor opiatowy może obniżać sekrecję wazopresyny. Również sole litu wykazujące wpływ przeciwmaniakalny, osłabiają działanie wazopresyny hamując wrażliwą na ten peptyd cyklazę. Gold i w s.p. dochodzą do wniosku, że istnieją uzasadnione podstawy dla wysunięcia hipotezy, w myśl której u osób z depresją endogenną występuje niedobór wazopresyny w ośrodkowym układzie nerwowym, któremu może przypadać istotne znaczenie patogenetyczne.

W celu weryfikacji tych przypuszczeń autorzy przeprowadzili pomiary ADH w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z depresją endogenną w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej (19 osób) i jednobiegunowej (13 osób) i stwierdzili, że zarówno w fazie depresyjnej (w obu grupach chorób) jak i maniakalnej ma miejsce istotne obniżenie zawartości ADH w płynie mózgowo-rdzeniowym. U 2 chorych z depresją psychotyczną obserwowano wybitne zwiększenie ilości badanego peptydu, zaś w okresie remisji nie stwierdzono istotnych różnic w porównaniu z grupą kontrolną oraz z okresem depresji [114]. Przeprowadzono też próby leczenia zespołu depresyjnego za pomocą desamino-d-arginylo-wazopresyny (DDAVP) [114]. Spośród 4 leczonych, u dwóch chorych dawka 60—80 µg dziennie stosowana przez kilka tygodni przyniosła istotną poprawę stanu klinicznego, przy czym u jednej z nich efekt leczniczy był przemijający. U innych 3 chorych, z mniej nasilonym zespołem depresyjnym, nie uzyskano zmian podstawowych objawów choroby, obserwowano natomiast poprawę w zakresie funkcji pamięciowych.

Tak więc obserwacje poczynione przez autorów koncepcji nie dostarczyły przekonujących danych, które potwierdzałyby ich hipotezę. Również prace innych autorów danych takich nie dostarczają. Nie stwierdzono różnic w wiązaniu wazopresyny z płytkami krwi u osób z rozpoznaniem choroby afektywnej dwubiegunowej (w stadium remisji) w porównaniu z grupą kontrolną [115]. Nie obserwowano również różnic w zawartości arginylowazopresyny we krwi chorych z depresją w porównaniu z osobami zdrowymi, zauważono natomiast, że bezpośrednio po zabiegu elektrowstrząsowym ma miejsce wzrost poziomu peptydu we krwi [116].

IV. Podsumowanie

Przegląd niniejszy dotyczy niemal wyłącznie obserwacji klinicznych, których celem była weryfikacja hipotez postulujących udział zmian niektórych układów neuropeptydowych w patogenezie chorób afektywnych i grupy schizofrenii. Pominięto w nim wyniki licznych badań ekspery-

mentalnych przeprowadzonych u zwierząt, którym również przypada rola w weryfikacji tych hipotez. Wybór tak zawężonego tematu wiązał się zarówno z zainteresowaniami autora tej pracy, jak również faktem, że badania prowadzone u ludzi, zwłaszcza jeżeli dotyczą terapii, stanowią ważny sprawdzian wiarygodności tego rodzaju teoretycznych założeń. Czy badania te przyczyniły się do poznania znaczenia neuropeptydów w patogenezie omawianych grup psychoz? Odpowiedź na tak zredagowane pytanie jest trudna. Można jedynie stwierdzić, że nie dostarczają one podstaw dla odrzucenia takiej możliwości. Nie uprawniają one jednak do wyrobienia poglądu, które neuropeptydy włączone są w proces patogenetyczny i jaki typ zmian występuje. Dotyczy to zwłaszcza układów opioidowych ośrodkowego układu nerwowego. Badania te znajdują się wciąż w fazie wstępnej i dotyczyły małego liczebnie materiału klinicznego, niejednorodnego pod względem nozologicznym. Nie jest wykluczone, że duże zróżnicowanie uzyskanych wyników wiąże się głównie z tą okolicznością. Analiza piśmiennictwa uprawnia jednocześnie do wniosku, że dotychczasowe badania nad przydatnością neuropeptydów w terapii schizofrenii i chorób afektywnych wskazują, że żaden z badanych związków nie wykazał większej wartości leczniczej niż neuroleptyki (stosowane w zespołach paranoidalnych i maniakalnych) lub trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (przydatne w leczeniu depresji endogennych). Być może wynika to z faktu, że zmiany w układach neuropeptydowych są jedną ze składowych procesów patogenezy, nie zaś zaburzeniem podstawowym. Do wyjaśnienia tego problemu mogą przyczynić się m.in. badania wpływu leków neuroleptycznych i przeciwdepresyjnych na układy neuropeptydowe ośrodkowego układu nerwowego.

Zaakceptowano do druku 3 marca 1985 r.

PISMIENNICTWO

1. Frederickson R. C. A., Geary L. E. (1982), *Progress in Neurobiology*, **19**, 19—69.
2. Płaźnik A., Puciłowski O., Kostowski W., (1982), *Pol. Tyg. Lek.*, **37**, 1149—1153.
3. Iversen L. L. (1983), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 1—27.
4. Herman Z. S. (1983), *Post. Med. Dośw.*, **37**, 233—270.
5. Swaab D. F. (1982) w: *Chemical Transmission in the Brain, Progress in Brain Research*, red. Buijs R. M., Pevet P., Swaab D. F., t. 55, str. 97—122, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
6. Krowicki Z., Sadowska-Krowicka H. (1983), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **37**, 75—85.
7. Płaźnik A., Puciłowski O., Kostowski W. (1983), *Pol. Tyg. Lek.*, **38**, 811—815.
8. Lowry P. J. (1984), *Biosc. Rep.*, **4**, 467—482.
9. Martin W. R. (1984), *Pharmacol. Rev.*, **35**, 283—323.

10. Kraepelin E. (1916), *Psychiatrie*, t. 3, Verlag von Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
11. Bleuler E. (1920), *Lehrbuch der Psychiatrie*, Berlin.
12. Bleuler E. (1978), *The schizophrenic disorders: long-term patients and family studies*, Yale University Press, New Haven.
13. Pużyński S. (1980) w: *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna*, red. Kostowski W., Pużyński S., str. 166—178, PZWL, Warszawa.
14. Verebey K., Volavka J., Clouet D. (1978), *Arch. Gen. Psychiat.*, **35**, 877—888.
15. Wied D. de (1979), *Trends Neurosci.*, **2**, 79—82.
16. Wied D. de, Kovacs G. L., Bohus B. (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **49**, 427—436.
17. Verhoeven W. M. A., Praag H. M., van, Botter P. A., Gunier A., Ree J. M. van, Wied D. de (1978), *Lancet*, **I**, 1046—1047.
18. Verhoeven W. M. A., Praag H. M. van, Ree J. M. van, Wied D. de (1979), *Arch. Gen. Psychiat.*, **36**, 294—298.
19. Verhoeven W. M. A., Westenberg H. G. M., Gerritsen T. W., Praag H. M. van, Thijssen J. H. H., Schwarz F., Ree J. M. van, Wied D. de (1981), *Psychiat. Res.*, **5**, 293—309.
20. Praag H. M. van, Verhoeven W. M. A., Ree J. M. van, Wied D. de (1982) w: *Pituitary Hormones and related peptides*, red. Motta M., Zanusi M., Piva F., str. 337—351, Academic Press, London—N. York.
21. Emrich H. M., Zaudig M., Zerssen D. von, Herz A., Kissling W. (1980), *Lancet*, **II**, 1364—1365.
22. Emrich H. M., Zaudig M., Kissling W., Dirlich G., Zerssen D. von, Herz A. (1980), *Pharmacopsychiatry*, **13**, 290—298.
23. Casey D. E., Korsgaard S., Gerlach J., Jørgensen A., Simmelgaard H. (1981), *Arch. Gen. Psychiat.*, **38**, 158—160.
24. Tamminga C. A., Tighe P. J., Chase T. N., Fraites E. G. de, Schaffer M. H. (1981), *Arch. Gen. Psychiat.*, **38**, 167—168.
25. Meltzer H. Y., Busch D. A., Lee J., Papacostas Y. (1982), *Psychopharmacol. Bull.*, **18**, 44—49.
26. Metz J., Busch D. A., Meltzer H. Y. (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 496—508.
27. Bourgeois M., Laforge E., Mayard J., Blayac J., Lemoine J. (1980), *Ann. Med. Psychol.*, **138**, 1112—1119.
28. Verhoeven W. M. A., Ree J. M. van, Bentum A. M., van, Wied D. de, Praag H. M. van (1982), *Arch. Gen. Psychiat.*, **39**, 647—654.
29. Verhoeven W. M. A., Ree J. M. van, Westenberg H. G. M., Krul J. M., Brouwer G. J., Thijssen J. H. H., Wied D. de, Praag H. M. van, Ceulemans D.L.S., Kahn R. S. (1984), *Psychiat. Res.*, **11**, 329—346.
30. Kline N. S., Li Ch. H., Lehmann H. E., Lajtha A., Laski E., Cooper T. (1977), *Arch. Gen. Psychiat.*, **34**, 1111—1113.
31. Kline N. S., Lehmann H. E. (1979) w: *Endorphins in mental health research*, red. Usdin, Bunney W. E., Kline N. S., str. 500—517, McMillan, London.
32. Berger P. A., Watson S. J., Akil H., Elliott G. R., Rubin R. T., Pfefferbaum A., Davis K. L., Barchas J. D., Li Ch. H. (1980), *Arch. Gen. Psychiat.*, **37**, 635—640.
33. Gerner R. H., Catlin D. H., Gorelick D. A., Hui K. K., Li Ch. H. (1980), *Arch. Gen. Psychiat.*, **37**, 642—647.

34. Gorelick D. A., Catlin D. H., Gerner R. H. (1981) w: The role of Endorphine in Neuropsychiatry, *Mod. Prob. Pharmacopsychiat.* (Karger, Basel), **17**, 236—245.
35. Judd L. L., Janowsky D. S., Segal D. S., Parker D. C., Huey L. Y. (1981), *Am. J. Psychiat.*, **138**, 243—245.
36. Krebs E., Roubicek J. (1979), *Pharmakopsychiatry*, **12**, 85—93.
37. Jorgensen A., Fog R., Veilis B. (1979), *Lancet*, **II**, 935.
38. Jungkunz G., Nedopil N., R  ther E. (1984), *Pharmacopsychiatry*, **17**, 76—78.
39. Fogelson D. L., Marder S. R., Putten T. van (1980), *Am. J. Psychiat.*, **137**, 605—607.
40. Holt V., Hillebrand C., Schmidt B., Gurland H. J. (1979), *Pharmacopsychiatry*, **12**, 399—406.
41. Mueser K. T., Dysken M. W. (1983), *Schizophrenia Bull.*, **9**, 213—225.
42. Sawynok J., Pinsky C., La Bella F. S. (1979), *Life Sci.*, **25**, 1621—1632.
43. Kammen D. P., van (1977), *Am. J. Psychiat.*, **134**, 138—143.
44. Terenius L., Wahlstrom A., Lindstrom L., Widerlov E. (1976), *Neurosc. Letters*, **3**, 157—163.
45. Lindstrom L. H., Widerlov E., Gunne L. M., Wahlstrom A., Terenius L. (1978), *Acta Psychiat. Scand.*, **57**, 153—164.
46. Gunne L. M., Lindstrom L., Widerlov (1979) w: Endorphins in Mental Health Research, red. Usdin E., Bunney W. E. Jr, Kline N. S., str. 547—552, Oxford University Press, New York.
47. Rimon R., Terenius L., Averbuch I., Belmaker R. H. (1983), *Pharmacopsychiatry*, **16**, 9—12.
48. Burbach J. P. H., Loeber J. G., Verhoef J. Kloet E. R. de, Ree J. M. van, Wied D. de (1979), *Lancet*, **II**, 480—481.
49. Naber D., Pickar D., Post R. M., Kammen D. P. van, Waters R. N., Ballenger J. C., Goodwin F. K., Bunney W. E. Jr (1981), *Am. J. Psychiat.*, **138**, 1457—1462.
50. Pickar D., Naber D., Post R. M., Kammen D. P. van, Ballenger J., Rubinow D., Waters R., Kaye, W. H., Ebert M. E., Bunney W. E. Jr (1982) w: Brain Peptides and Hormones, red. Colly R., str. 207—219, Raven Press, New York.
51. Emrich H. M., Holtt V., Kissling W., Fischer M., Laspe H., Heinemann H., Zerssen D. von, Herz A. (1979), *Pharmakopsychiatry*, **12**, 269—276.
52. Ross M., Berger P. A., Goldstein A. (1979), *Science*, **205**, 1163—1164.
53. Domschke W., Dickschas A., Mitznegg P. (1979), *Lancet*, **I**, 1024.
54. Volavka J., Davis L. G., Ehrlich Y. E. (1979), *Psychopharmacol. Bull.*, **5**, 227—249.
55. Majori T., Watanabe N., Aoki N., Itoh S. (1982), *Intern. Pharmacopsychiat.*, **17**, 255—273.
56. Nair N. P. V., Bloom D. M., Nestoros J. N. (1982), *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.*, **6**, 509—512.
57. Bloom D. M., Nair N. P. V., Schwarz G. (1983), *Psychopharmacol. Bull.*, **19**, 361—363
58. Lostra F., Verbanck P., Mendlewicz J., Vanderhaegen J. J. (1984), *Biol. Psychiat.*, **19**, 877—882.

59. Post R. M., Gold P., Rubinow D. R., Ballenger J. C., Bunney W. E. Jr, Goodwin F. K. (1982), *Life Sci.*, **31**, 1—15.
60. Verbanck P. M. P., Lotstra F., Gilles C., Linkowski P., Mendlewicz J., Vanderhaegen J. J. (1984), *Life Sci.*, **34**, 67—72.
61. Nemeroff Ch. B. (1980), *Biol. Psychiat.*, **15**, 283—302.
62. Widerlov E., Lindstrom L. H., Kizer J. S., Prange A. J. Jr (1982), *Am. J. Psychiat.*, **139**, 1122—1126.
63. Nemeroff C. B., Hernandez D., Luttinger D., Kalivas P. W. (1983), *An. N.Y. Acad. Sci.*, 330—344.
64. Nemeroff C. B., Manberg P. J., Widerlov E., Youngblood W. W., Kizer J. S., Prange A. J. (1983), *Psychopharmacol. Bull.*, **19**, 369—374.
65. Kraepelin E. (1913), *Psychiatrie*, t. 3, cz. 2, Verlag von Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
66. Leonhard K., Korff I., Schulz H. (1962), *Psychiat. Neurol. (Basel)*, **143**, 416—431.
67. Angst J., Perris C. (1968), *Arch. Psychiat. u. Ztschr. Neurol.*, **210**, 373—398.
68. Puzyński S. (1979), *Depresje*, PZWL, Warszawa
69. Prange A. J., Jr, Wilson I. C., Lara P. P., Alltop L. B., Breese G. R. (1972), *Lancet*, **II**, 999—1002.
70. Loosen P. T., Prange A. J. (1982), *Am. J. Psychiat.*, **139**, 405—415.
71. Prange A. J., Loosen P. T. (1982), *Mod. Probl. Pharmacopsychiat.*, **18**, 164—177.
72. Kastin A. J., Ehrensing R. H., Schalch D. S., Anderson M. S. (1972), *Lancet*, **II**, 740—742.
73. Furlong F. W., Brown G. M., Beeching M. F. (1976), *Am. J. Psychiat.*, **133**, 1187—1190.
74. Coppen A., Montgomery S., Peet M., Bailey J. (1974), *Lancet*, **II**, 433—435.
75. Vogel H. P., Benkert D., Illing R., Muller-Oerlinghausen B., Poppenberg A. (1977), *Acta Psychiat. Scand.*, **56**, 223—232.
76. Schmidt J. (1977), *Acta Psychiat. Scand.*, **55**, 142—146.
77. Benkert O., Gordon A., Martschke D. (1974), *Psychopharmacologia (Berl.)*, **40**, 191—198.
78. Pecknold J. C., Ban T. A. (1977), *Int. Pharmacopsychiat.*, **12**, 166—173.
79. Wilson I. C., Prange A. J., Lara P. P., Altop L. B., Stikeleather R. A., Lipton M. A. (1973), *Arch. Gen. Psychiat.*, **29**, 15—21.
80. Itil T. M., Patterson C. D., Polvan N., Bigelow A., Bergey B. (1975), *Dis. Nerv. Syst.*, **36**, 529—531.
81. Kruse H. (1977) w: *Depressive disorders*, red. Garatini S., str. 237—244, Schattauer Verlag, Stuttgart—New York.
82. Rubinow D. R., Gold P. W., Post R. M., Ballenger J. C., Reichlin S. (1983), *Psychopharmacol. Bull.*, **19**, 422—425.
83. Rubinow D. R., Gold P. W., Post R. M., Ballenger J. C., Cowdry R., Bollinger J., Reichlin S. (1983), *Arch. Gen. Psychiat.*, **40**, 409—412.
84. Ehrensing R. H., Kastin A. J. (1974). *Arch. Gen. Psychiat.*, **30**, 63—65.
85. Ehrensing R. H., Kastin A. J. (1978), *Am. J. Psychiat.*, **135**, 562—566.
86. Fink M., Simeon J., Itil T. M., Freedman A. H. (1970), *Clin. Pharmacol. Therap.*, **11**, 41—48.

87. Gold M. S., Pottash A. C., Sweeney D., Martin D., Extein I. (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1982**, 140—150.
88. Davis G. C., Buchsbaum M. S., (1981), *Mod. Probl. Pharmacopsychiat.*, (Karger, Basel), **17**, 97—108.
89. Hollister L. E., Johnson K., Boukhabza D., Gillespie H. K. (1981), *Drug and Alcohol Dependence*, **7**, 1—5.
90. Catlin D. H., Gorelick D., Gerner R. H., Gui K. K., Li Ch. H. (1980) w: *Advances in Biochemical Pharmacology, Regulation and Function of Neuropeptides*, red. Costa E., Trabucchi E. M., str. 465—472, Raven, New York.
91. Angst J., Autenrieth V., Brem F., Koukkou M., Meyer H., Stassen H. H., Storck U. (1979) w: *Endorphins in Mental Health Research*, red. Usdin E., Bunney W. E. Jr, Kline N. S., str. 518—528, Oxford University Press, New York.
92. Pickar D., Davis G. C., Schulz S. C., Extein I., Wagner R., Naber D., Gold O. W., Kammen D. P. van, Goodwin F. K., Wyatt R. J., Li Ch. H., Bunney W. E. Jr (1981), *Am. J. Psychiat.*, **138**, 160—166.
93. Belenky G. L., Holaday J. W. (1979), *Brain Res.*, **177**, 414—417.
94. Inturrisi Ch. E., Alexopoulos G., Lipman R., Foley K., Rosier J. (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1982**, 413—422.
95. Emrich H. M., Vogt R., Herz A. (1982), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 108—112.
96. Emrich H. M., Cording C., Piree A., Koelling A., Moeller D., Zerssen D. von, Herz A. (1979) w: *Endorphins in Mental Health Research*, red. Usdin E., Bunney W. E. Jr, Kline N. S., str. 452—460, Oxford University Press, New York.
97. Davis G. C., Bunney W. E., De Fraites E. G., Kleinman J. E., Kammen D. P. van, Post R. M., Wyatt R. J. (1977), *Science*, **197**, 74—77.
98. Terenius L., Wahlstrom A., Agres H. (1977), *Psychopharmacology*, **54**, 31—33.
99. Gohen M. R., Cohen R. M., Pickar D., Sunderland T., Mueller E. A. III, Murphy D. L., (1984), *Biol. Psychiatry*, **19**, 825—832.
100. Byck R. (1976), *Lancet*, **II**, 72—73.
101. Beluzzi J. D., Stein L. (1977), *Nature (London)*, **266**, 556—568.
102. Janowsky D., Judd L., Huey L. Y., Roitman N., Parker D. (1978), *Lancet*, **II**, 220.
103. Janowsky D. S., Judd L. Y., Huey L. (1979), w: *Endorphins in Mental Health Research*, red. Usdin E., Bunney W. E. Jr, Kline N. S., str. 435—447, Oxford University Press, New York.
104. Judd L. L., Janowsky D. S., Segal D. S. (1980), *Arch. Gen. Psychiat.*, **37**, 583—586.
105. Judd L. L., Janowsky D. S. (1981), *Mod. Probl. Pharmacopsychiat.* (Karger, Basel), **17**, 213—225.
106. Judd L. L., Janowsky D. S., Zettner A., Huey L.Y., Takahashi K. I. (1981), *Psychiat. Res.*, **4**, 277—283.
107. Judd L. L., Parker D. C., Janowsky D. S., Segal D. S., Risch S. C., Huey L. Y. (1982), *Psychiat. Res.*, **7**, 163—170.
108. Davis G. C., Extein I., Reus V., Hamilton W., Post R. M., Goodwin F. K., Bunney W. E. Jr (1980), *Am. J. Psychiat.*, **137**, 583—585.
109. Pickar D., Vartanian F., Bunney E. E. Jr, Meier H. P., Gastpar M. T., Prakash R., Sethi B. B., Lideman R., Belyaew B. S.,

- Tsutsulkovskaja M. V. A., Junkunz G., Nedopil N., Verhoeven W., Praag H. M. van (1982), *Arch. Gen. Psychiat.*, **39**, 313—319.
110. Agren H., Terenius L., Wahlström A. (1982), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **388**—398.
111. Pickar D., Cutter N. R., Naber D., Post R. M., Pert C. B., Bunney W. E. Jr (1980), *Lancet*, **I**, 937.
112. Alexopoulos G. S., Inturrisi Ch. E., Lipman R., Frances R., Haycox J., Dougherty J. H. Jr, Rossier J. (1983), *Arch. Gen. Psychiat.*, **40**, 181—183.
113. Misiaszek J., Cork R. C., Hameroff S. R., Finley J., Weiss J. L. (1984), *Biol. Psychiat.*, **19**, 451—455.
114. Gold P. W., Post R. M., Weingartner H., Goodwin F. K. (1981), *Adv. Biol. Psychiat.* (Karger, Basel), **42**, 41—70.
115. Berrettini W. H., Nurnberg J. I. Jr, Worthington E. K., Simmons-Alling S., Gershon E. S. (1982), *Psychiat. Res.*, **7**, 83—86.
116. Raskind M., Orenstein H., Weitzman R. E. (1979), *Lancet*, **I**, 164.

Pamięci Pani Profesor
Marii Sarneckiej-Keller
poświęcają autorzy

JAN POTEPA *, ADAM DUBIN **

Ewolucja struktury i funkcji serynowych enzymów proteolitycznych

Structure and function evolution of serine proteolytic enzymes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Dywergencja funkcjonalna proteinaz serynowych
- III. Podobieństwa strukturalne różnych proteinaz serynowych
- IV. Duplikacja pierwotnego genu w ewolucji proteinaz serynowych
- V. Powstawanie zymogenów
- VI. Hipotetyczny schemat ewolucji proteinaz serynowych
- VII. Ewolucyjna konwergencja subtylizyn

Contents

- I. Introduction
- II. Functional divergence of serine proteinases
- III. Structural homology of different serine proteinases
- IV. Duplication of the primary gene in evolution of serine proteinases
- V. Formation of zymogens
- VI. Hypothetical scheme of evolution of serine proteinases
- VII. Evolution convergence of subtilisin

Wykaz skrótów stosowanych w pracy: Gamma-NGF — gamma komponenta czynnika wzrostowego nerwu, EGF-BP — białko wiążące epidermalny czynnik wzrostu, t-PA — tkankowy aktywator plazminogenu, beta-NGF endopeptydaza — endopeptydaza beta komponenty czynnika wzrostowego nerwu, SGPA — proteinaza A *Streptomyces griseus*, SGPB — proteinaza B *Streptomyces griseus*, I_t — tripsyna raka *Astacus fluviatilis*, VOP II — proteinaza larwy szerszenia *Vespa orientalis*, Chym — alfa-chymotrypsyna wołowa, PPKK — kalikreina trzustki wieprzowej, EGFP — prekursor epidermalnego czynnika wzrostu.

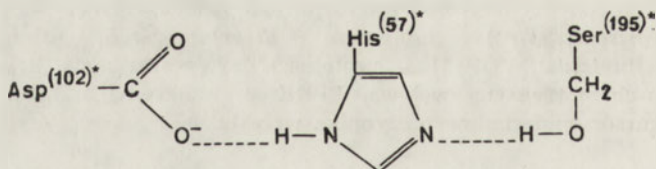
I. Wstęp

Enzymy rozszczepiające wiązania peptydowe w białkach z przyłączeniem cząsteczki wody należą do klasy hydrolaz, podklasy hydrolaz wią-

*) Dr, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków 31-120, Al. Mickiewicza 3; **) Dr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków 31-120, Al. Mickiewicza 3.

zań peptydowych (E.C. 3.4.—.—). W oparciu o układ aminokwasów funkcyjnych w centrum aktywnym, jak i o przypuszczalne ewolucyjne pochodzenie wyróżnia się sześć grup enzymów proteolitycznych: proteiny serynowe I np. trypsyna (Asp,Ser,His); proteiny serynowe II np. subtylizyna (Asp,Ser,His); proteiny cysteinowe np. papaina (Cys,His,Asp); proteiny aspartylowe np. pepsyna (Cys,His,Asp); metaloproteiny I np. karboksypeptydazy A,B; typowe kolagenazy kręgowców [1] (Zn,Glu,Tyr) oraz metaloproteiny II np. termolizyna (Zn,Glu,His). Proteiny serynowe stanowią grupę najlepiej przebadanych białek enzymatycznych. W wyniku blisko pięćdziesięcioletnich badań, skoncentrowanych głównie na chymotrypsynie i innych trzustkowych trawiennych proteinach serynowych, poznano szczegółowo strukturę III-rzędową tych białek aż do przestrzennego ułożenia poszczególnych atomów w cząsteczce. Obecnie znana jest dokładnie struktura krystalograficzna ośmiu serynowych enzymów proteolitycznych: alfa-chymotrypsyny wołowej [2—5], gamma-chymotrypsyny wołowej [6, 7], trypsyny wołowej [8—13], elastazy z trzustki wieprzowej [14—16], kalikreiny A z trzustki wieprzowej [17], proteazy A [18] oraz proteazy B [19, 20] z bakterii *Streptomyces griseus*, alfa-litycznej proteiny z *Mycobacter 495* [21, 22], subtylizyny BPN' [23, 24], subtylizyny Novo [25] oraz dwóch zymogenów: chymotrypsynogenu [26] i trypsynogenu [27, 28].

Na podstawie badań strukturalnych i kinetycznych poznano szczegółowo mechanizm działania tych enzymów. Cechują się one wyjątkowo reaktywną resztą seryny w centrum aktywnym, gdzie stanowi ona część tzw. łańcucha przeniesienia ładunku złożonego z kwasu asparaginowego, histydyny i seryny połączonych między sobą wiązaniami wodorowymi [29, 30]. Obecnie uważa się, że również seryna 214 ma udział w systemie przeniesienia ładunku, a jej grupa —OH jest połączona wiązaniem wodorowym z atomem tlenu grupy —COOH reszty kwasu asparaginowego 102 [18].



Ryc. 1. Schemat oddziaływań trzech aminokwasów w centrum aktywnym chymotrypsyny (numeracja aminokwasów wg Hartley'a [31]).

Dotychczas na podstawie homologii struktury I i III rzędowej wyróżniono dwie rodziny proteinaz serynowych: rodzinę trypsyny i subtylizyny, wywodzące się prawdopodobnie z dwóch różnych pni ewolucyjnych. Bardzo możliwe jest, że dalsze badania pozwolą na wyróżnienie innych jeszcze rodzin proteinaz serynowych [32].

II. Dwywergencja funkcjonalna proteinaz serynowych

W przeciwieństwie do subtylizyn występujących wyłącznie u mikroorganizmów, proteinazy serynowe typu trypsyny są u zwierząt najbardziej rozpowszechnioną grupą enzymów degradujących białka. Oprócz funkcji trawiennych spełnianych przez enzymy trzustkowe, proteinazy serynowe biorą udział w pozalizosomalnym trawieniu białek komórkowych [33], zwłaszcza w tkance mięśniowej [33—35]. Znaczne ilości proteinaz serynowych o aktywności elastolitycznej i chymotrypsyno-podobnej występują w ziarnistościach granulocytów ssaków [36—40]. Fizjologiczne znaczenie proteinaz ziarnistości leukocytów jest słabo poznane i polega prawdopodobnie na degradacji białek komórkowych i materiału fagocytowanego przez granulocyty. Znacznie lepiej udokumentowana jest patologiczna funkcja tych proteinaz w rozwoju stanów chorobowych takich jak rozedma płuc czy stany zapalne [41, 42].

W Tabeli 1 zebrano dane dotyczące funkcji i pochodzenia niektórych serynowych enzymów proteolitycznych. Zdumiewająca jest rozpiętość funkcji: od trawienia i degradacji białek, poprzez udział w zapłodnieniu u ssaków i procesach metamorfozy w stanach rozwojowych bezkręgowców, aż do precyzyjnie regulowanych procesów krzepnięcia krwi i lizy powstałych skrzepów, aktywacji dopełniacza i uwalniania aktywnie biologicznych peptydów oraz specyficznej obróbki hormonów peptydowych [64]. Z wąską specjalizacją funkcjonalną danego enzymu związana jest z reguły ogromna specyficzność działania, ograniczona często do jednego białka, w obrębie którego dokonują ograniczonej proteolizy. Należą do tej grupy enzymy kaskady krzepnięcia (trombina oraz czynniki VIIa, IXa, Xa, XIa i XIIa), białko C, urokinaza, tkankowy aktywator plazminy (t-PA), komponent gamma czynnika wzrostowego nerwu (gamma-NGF), endopeptydaza beta komponenty czynnika wzrostowego nerwu (beta-NGF endopeptydaza), białko wiążące epidermalny czynnik wzrostu (EGF-BP) oraz składniki dopełniacza: C1r, C1s a zwłaszcza Bb, D i C2a. Wysoka specyficzność tych proteinaz była powodem, że przez wiele lat z braku białkowych substratów mówiło się tylko o esterolitycznej aktywności niektórych z nich, klasyfikując je jako esterazy.

Godny uwagi jest fakt, że z wyjątkiem enzymów bakteryjnych wszystkie pozostałe enzymy wymienione w Tabeli 1 posiadają formy zymogenowe. Peptyd regulatorowy zlokalizowany na N-końcu łańcucha polipeptydowego enzymu liczy od kilku do kilkuset aminokwasów (porównaj z Tabelą 3). W enzymach biorących udział w procesach wymagających subtelnej kontroli, peptyd regulatorowy liczy z reguły ponad kilkadziesiąt aminokwasów.

Serynowe enzymy proteolityczne i ich funkcje biologiczne

Tabela 1

Enzym	Funkcja	Pochodzenie	Zymogen
Trypsyna Chymotrypsyna Elastaza Akrozyzna Kokonaza Kolagenaza	trawienie białek /43/ wikanie plemnika do jaja /44, 45/ rozpuszczanie kokonu w metamorfozie /43, 46/ metabolizm kolagenu /47—50/ specyficzna obróbka biologicznie aktywnych peptydów — uwalnianie kinin, procesy dojrzewania czynnika wzrostu nerwu (NGF) i epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) /51—54/	trzustka kręgowców akrosomy spermy larwy ciem trzustka kraba (<i>Uca pugilator</i>), larwa <i>Hypoderma lineatum</i> tkanki i gruczoły	kilka do kilkunastu aminokwasów od N-końca łańcucha polipeptydowego enzymu
Kalikreiny tkankowe gamma-NGF EGF-BP			
Trombina (IIa) i inne czynniki krzepnięcia: VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa Białko C Kalikreina osocza	krzepnięcie krwi (55, 56/ regulacja kaskady krzepnięcia krwi /57/ uwalnianie kinin, krzepnięcie krwi /54, 55/ aktywacja reniny /58/ liza skrzepów /43, 55/, aktywacja reniny /58/ aktywacja plazminogenu przyspieszana przez fibrynę /59, 60/ aktywacja plazminogenu niezależna od fibryny /61/ reakcje aktywacji dopełniacza — liza komórek w odpowiedzi immunologicznej /62, 63/ i inne efekty biologiczne	osocze osocze osocze osocze różne tkanki mocz osocze	z reguły kilkadziesiąt aminokwasów od N-końca łańcucha polipeptydowego enzymu
Plazmina Tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) Urokinaza C1r (składniki komplementu)			
Proteiny bakteryjne	funkcja nieznaną — prawdopodobnie pozakomórkowe trawienie białek /43/	<i>Streptomyces griseus</i> , <i>Mycobacter 495</i>	brak

gamma-NGF: gamma komponenta czynnika wzrostowego nerwu; EGF-BP: białko wiążące epidermalny czynnik wzrostu



Ryc. 2. Porównanie struktury I-rzędowej serynowych enzymów proteolitycznych bakterii, bezkręgowców i kręgowców. SGPA — proteinaza A *Streptomyces griseus*, alfa-lit — alfa-lityczna proteinaza *Myxobacter 495*, I_f — trypsyna raka *Astacus fluviatilis*, [66]; VOP II — proteinaza larwy szerszenia *Vespa orientalis* [65]; chym — alfa-chymotrypsyna wołowa, PPKK — kalikreina trzustki wieprzowej [68];

Przerwy w ciągłości sekwencji (dla zwiększenia homologii zaznaczone przez - - -) określano w przypadku: kalikreiny wg Bode i wsp. [17], proteinaz bakteryjnych i chymotrypsyny wg Brayer i wsp. [18] i James i wsp. [69], pozostałych enzymów wg oryginalnych prac cytowanych powyżej. Liczby oznaczają kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym od N-końca wg chymotrypsynowego systemu numeracji aminokwasów [31]. Reszty aminokwasowe katalitycznej triady: His-57, Asp-102, Ser-195 a także Ser-214 zaznaczono gwiazdką. Identyczne aminokwasowe występujące w tej samej pozycji w dwóch lub więcej białkach obrysowano linią ciągłą. Do oznaczenia aminokwasów użyto jednoliterowy kod: A (Ala), B (Asx), C (Cys), D (Asp), E (Glu), F (Phe), G (Gly), H (His), I (Ile), K (Lys), L (Leu), M (Met), N (Asn), P (Pro), R (Arg), Q (Gln), S (Ser), T (Thr), V (Val), W (Trp), Y (Tyr), Z (Glx).

III. Podobieństwa struktury różnych proteinaz serynowych

Poznanie struktury pierwszorzędowej serynowych enzymów proteolitycznych typu trypsyny wskazało na dużą homologię sekwencji aminokwasów pomiędzy poszczególnymi proteinazami izolowanymi nawet z tak odległych ewolucyjnie organizmów jak bezkręgowce i ssaki; identyczność sekwencji aminokwasowych może wynosić ponad 30% [65—67], co świadczy o wspólnym ewolucyjnym pochodzeniu od pierwotnego praenzymu. Porównanie sekwencji aminokwasów proteinaz serynowych typu trypsyny (Ryc. 2) wskazuje, że szczególnie zachowane w rozwoju ewolucyjnym są: aminokwasy w sąsiedztwie dwóch spośród trzech reszt aminokwasowych katalitycznej triady (His-57 i Ser-195), N-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego, aminokwasy uczestniczące w strukturze miejsca wiązania substratu (Ser-214, Trp-215 i Gly-216) oraz mostki dwusiarczkowe w pozycjach: Cys-42-Cys-57, Cys-168-Cys-182 i Cys-191-Cys-220 mające znaczenie w utrzymaniu prawidłowej konformacji centrum aktywnego enzymu.

W porównaniu z serynowymi proteinazami eukariontów, enzymy pochodzenia bakteryjnego produkowane przez *Streptomyces griseus* (SGPA, SGPB) oraz *Myxobacter 495* (alfa-lityczna proteinaza) wykazują niższy stopień homologii struktury pierwszorzędowej nie przekraczający 21% [20] (Tab. 2).

Tabela 2

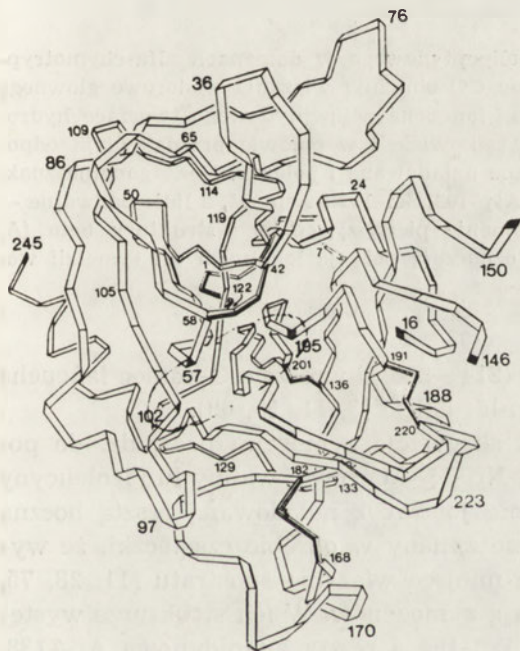
Stopień identyczności sekwencji aminokwasów (struktury pierwszorzędowej) pomiędzy elastazą (wieprzową) i alfa-chymotrypsyną (wołową) [70] a serynowymi proteinazami A i B *Streptomyces griseus* (SGPA, SGPB) i alfa-lityczną proteinazą *Myxobacter 495* [20, 69].

W nawiasach podano procent homologii struktury III-rzędowej [16, 21, 22, 69].

Elastaza				
Chymotrypsyna	39% (85%)	Chymotrypsyna		
SGPA	17%	21% (64%)	SGPA	
SGPB	20.4%	18%	59%	SGPB
alfa-lityczna proteinaza	18% (55%)	17.7%	35.3% (82%)	36%

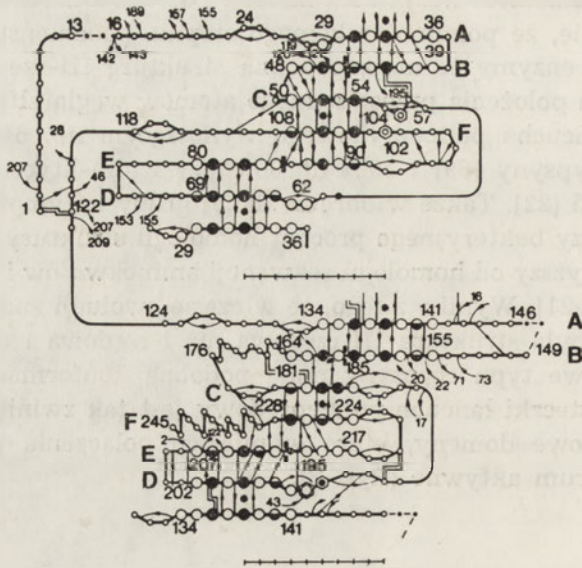
Z uwagi na znacznie krótszy łańcuch polipeptydowy enzymów bakteryjnych (około 180 aminokwasów) w porównaniu z około 240 aminokwasami w proteinazach trzustkowych, wynikły poważne kłopoty z wzajemnym dopasowaniem ich sekwencji ponieważ wykazują one homologie prawie wyłącznie w obrębie wymienionych uprzednio regionów łańcucha polipeptydowego (Ryc. 2). Dopiero poznanie struktury III-rzędowej, poprzez wzajemne porównanie przestrzennych modeli, pozwoliło prawidłowo uszeregować sekwencje aminokwasów proteinaz bakteryjnych i trzustko-

wych z uwzględnieniem wszystkich insercji i delecji aminokwasów (Ryc. 2) [69]. Okazało się, że pomimo znikomego stopnia podobieństwa sekwencji aminokwasów, enzymy te mają podobną strukturę III-rzędową ze stopniem homologii położenia przestrzennego atomów węgla alfa reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego wynoszącym np. 64⁰/o dla SGPA i alfa-chymotrypsyny [69] i 55⁰/o dla elastazy i alfa-litycznej proteinyazy *Mycobacter* 495 [22]. Także w obrębie danej grupy enzymów pochodzenia trzuskowego czy bakteryjnego procent homologii struktury przestrzennej jest znacznie wyższy od homologii sekwencji aminokwasów i wynosi ponad 80⁰/o [7, 16, 17, 21]. Wynika z tego, że w czasie ewolucji znacznie bardziej zachowywana była struktura III-rzędowa niż I-rzędowa i wszystkie proteinyazy serynowe typu trypsyny mają podobną konformację cząsteczki. W obrębie cząsteczki łańcuch polipeptydowy jest tak zwinięty, że tworzy dwie hydrofobowe domeny, które w miejscu połączenia w zagłębieniu zawierają centrum aktywne (Ryc. 3).



Ryc. 3. Schemat struktury III-rzędowej cząsteczki alfa-chymotrypsyny [3]. Łańcuch polipeptydowy przedstawiono jako wstążkę pozaginaną przy każdym atomie węgla alfa. Mostki dwusiarczkowe zaznaczono zakreskowanymi słupkami. Aminokwasy katalitycznej triady: His-57, Asp-102 i Ser-195 leżące w zagłębieniu pomiędzy domeną N-końcową (górna od lewej) i C-końcową (dolna od prawej) zakreślono owalną linią.

W skład każdej domeny wchodzi cztery równoległe pętle struktury beta i sześć odcinków łańcucha polipeptydowego (Ryc. 4). W obrębie domeny N-końcowej wyróżnia się pętle: 1. N-terminalną (aminokwasy od 16—41); 2. histydyny (42—58); 3. uranylową (68—86); 4. kwasu asparaginowego (87—108), a w obrębie domeny C-końcowej cztery pętle zostały nazwane kolejno: 1. autolizy (aminokwasy 131—162); 2. metioniny (164—182); 3. se-



Ryc. 4. Schemat ułożenia łańcucha polipeptydowego w domenach alfa-chymotrypsyny. Strzałki biegnące od grup NH do CO obrazują wiązania wodorowe głównego łańcucha. Duże kółka oznaczają odcinki łańcucha polipeptydowego tworzące hydrofobowy rdzeń cząsteczki, zaczerńnione całkowicie i w połowie przedstawiają odpowiednio aminokwasowe łańcuchy boczne naładowane i polarne. Heksagonalne znaki oznaczają reszty katalityczne: His-57, Asp-102, Ser-195 i Asp-194, a linie podwójne — mostki dwusiarczkowe. W każdej domenie pierwszy odcinek struktury beta (A) jest pokazany dwukrotnie. Gwiazdki oznaczają pozycje lokalnych osi symetrii wewnątrz każdej z domen [71].

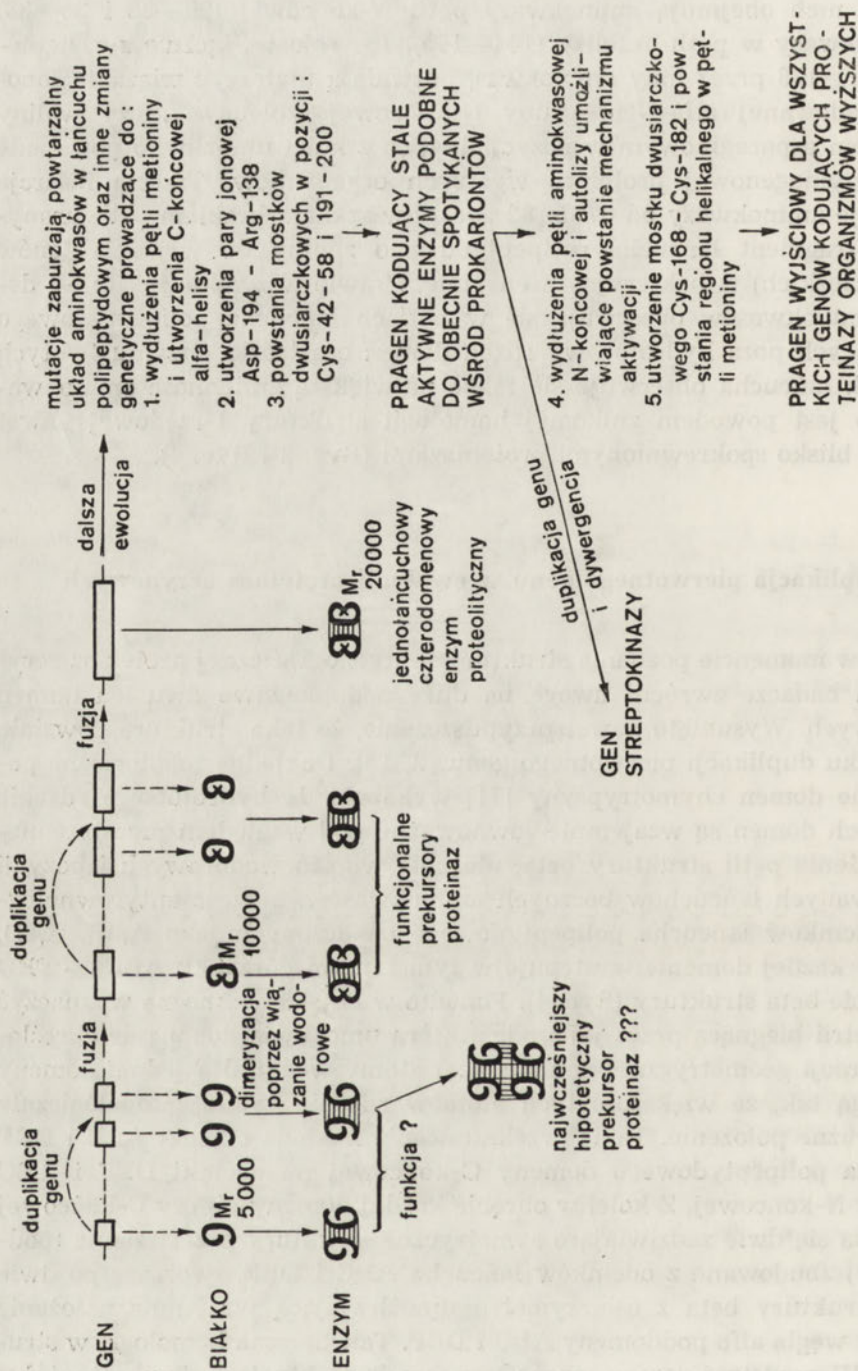
ryny (195—213); 4. specyficzności (214—228), i wreszcie C-koniec łańcucha polipeptydowego zwinięty jest w alfa-helisę [3, 11, 15, 69].

W proteinazach trzustkowych aktywacja zymogenu prowadzi do powstania zdysocjowanej grupy $\alpha\text{-NH}^{\ddagger}$ N-końcowej waliny lub izoleucyny [72, 73, 74], która tworzy wiązanie jonowe z naładowaną resztą boczną Asp-195, co z kolei powoduje takie zmiany w obrębie cząsteczki, że wykształca się funkcjonalnie czynne miejsce wiązania substratu [11, 28, 75, 76]. Proteinazy bakteryjne nie mają zymogenów. W ich strukturze występuje wiązanie jonowe pomiędzy Asp-194 a resztą guanidynową Arg-138, spełniające te same funkcje co wiązanie alfa-aminowej grupy N-końcowego aminokwasu (izoleucyna po usunięciu peptydu aktywacyjnego) z Asp-194 w proteinazach trzustkowych [69]. Fakt, że takie wiązanie jonowe występuje w enzymach od bakterii aż do ssaków podkreśla jego istotną rolę w utrzymaniu aktywnej enzymatycznie konformacji enzymu, a stała obecność jego w proteinazach bakteryjnych tłumaczy brak ich form zymogenowych. Porównując sekwencje aminokwasów bakteryjnej proteiny SGPA i alfa-chymotrypsyny na podstawie znanych struktur III-rzędo-

wych [18], łatwo można zauważyć (Ryc. 2) trzy duże insercje aminokwasów w sekwencji chymotrypsyny i innych proteinaz eukariontów. Dwie spośród nich obejmują aminokwasy pętli N-końcowej (20—28 i 35—38) i aminokwasy w pętli autolizy (144—145). Insercje te, łącznie z zastąpieniem Arg-138 przez inny aminokwas, pozwalają utworzyć wiązanie jonowe naładowanej alfa-NH₃⁺ grupy N-końcowej izoleucyny, czy waliny z kwasem asparaginowym w pozycji 194, co z kolei umożliwiło powstanie formy zymogenowej proteinaz wyższych organizmów. Trzecia insercja obejmuje aminokwasy od 67 do 83 i jest związana z brakiem pętli uranylowej (fragment łańcucha polipeptydowego zdolny do wiązania jonów metali ciężkich) w bakteryjnym enzymie. Prawie wszystkie insercje i delecje aminokwasów obserwuje się w pętlach łańcucha polipeptydowego wystających poza hydrofobowy rdzeń domen cząsteczki enzymu. W tych rejonach łańcucha obserwuje się także największą zmienność aminokwasów, co jest powodem znikomej homologii struktury I-rzędowej nawet między blisko spokrewnionymi proteinazami (Ryc. 2 i Ryc. 4).

IV. Duplikacja pierwotnego genu w ewolucji proteinaz serynowych

Już w momencie poznania struktury rentgenograficznej proteinaz serynowych badacze zwrócili uwagę na duże podobieństwo dwu ich domen składowych. Wysłunięto nawet przypuszczenie, że taka struktura powstała w wyniku duplikacji pierwotnego genu [3, 15]. Dokładne topologiczne porównanie domen chymotrypsyny [71] wykazało, że hydrofobowe rdzenie obydwóch domen są wzajemnie równoważne pod względem przestrzennego położenia pętli struktury beta, ułożenia wiązań wodorowych i pozycji naładowanych łańcuchów bocznych aminokwasów, a sześć antyrównoległych odcinków łańcucha polipeptydowego oznaczonych jako A, B, C, D, E i F w każdej domenie występuje w tym samym porządku ABC — FED w obrębie beta struktury (Ryc. 4). Ponadto w cząsteczce można wyznaczyć oś symetrii biegnącą przez jej środek, która umożliwiła dokonanie określonej operacji geometrycznej nakładającej atomy węgla alfa jednej domeny na drugą tak, że większość tych atomów rdzenia zajmuje topologicznie równoważne położenie. Takie przekształcenie nakłada odcinki ABC i DEF łańcucha polipeptydowego domeny C-końcowej na odcinki DEF i ABC domeny N-końcowej. Z kolei w obrębie każdej domeny N- czy C-końcowej wyróżnia się dwie zadziwiająco symetryczne struktury przestrzenne (poddomeny) zbudowane z odcinków łańcucha ABC i DEF, tworzące po dwie pętle struktury beta z osią symetrii umożliwiającą wzajemne nałożenie atomów węgla alfa poddomeny ABC i DEF. Tak znaczna homologia w strukturze III-rzędowej domen mocno przemawia za hipotezą dwukrotnej duplikacji genu, pomimo braku jakichkolwiek powtarzających się sekwencji

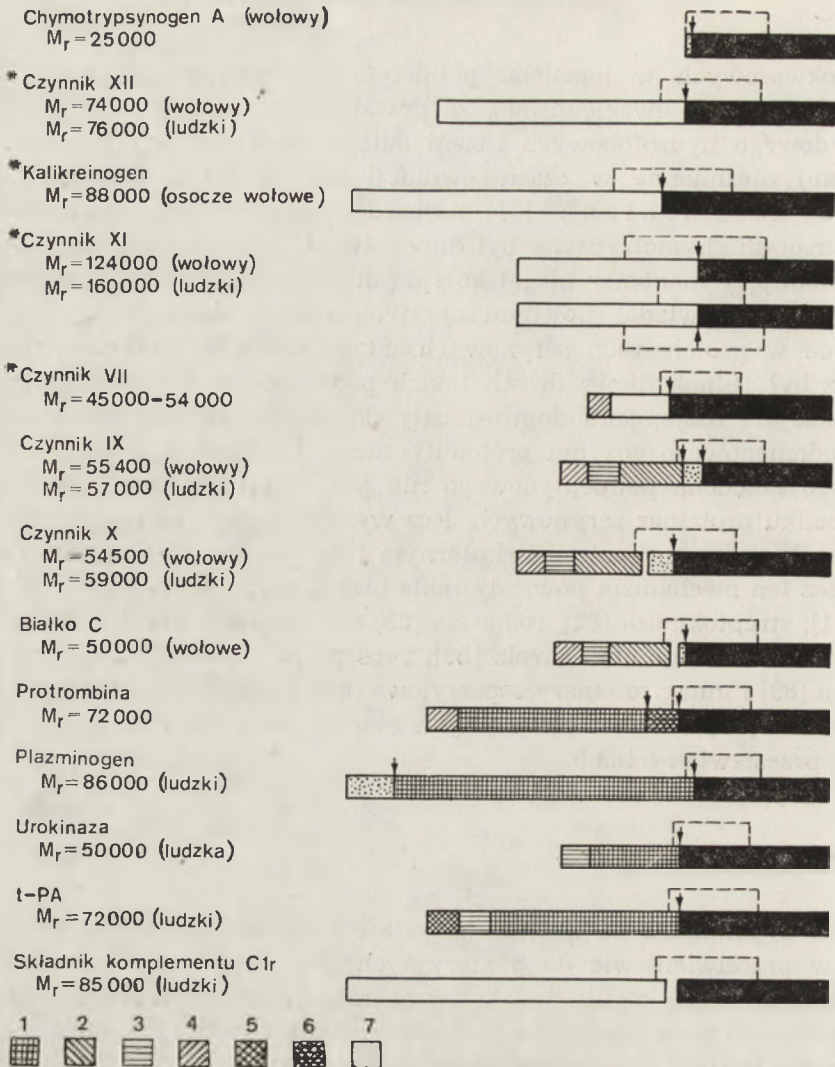


Ryc. 5. Schemat genetycznych wydarzeń w ewolucji serynowych enzymów proteolitycznych (dokładne objaśnienia w tekście).

aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym chymotrypsyny [77] — zwłaszcza, jeżeli uwzględni się, że przestrzenne ułożenie łańcucha polipeptydowego hydrofobowych rdzeni odległe spokrewnionych białek jest bardziej niezmiennie w czasie ewolucji niż struktura I-rzędowa [78]. Według McLachlana [71] najbardziej pierwotnym strukturalnym prekursorem chymotrypsyny był dimer dwóch identycznych monomerów. Gen kodujący monomer ulegał kolejno duplikacji i fuzji, a jego produkt translacji odpowiadał pojedynczej strukturalnej domenie wyróżnianej obecnie w proteinazach serynowych. Funkcjonalnym prekursorem proteinaz był jednak dimer dwóch takich podjednostek i dopiero powtórna duplikacja i fuzja genu doprowadziły do powstania jednołańcuchowego czterodomenowego enzymu proteolitycznego. Duplikacja genu w obrębie jednego łańcucha polipeptydowego nie jest wyjątkiem stwierdzonym w przypadku proteinaz serynowych, lecz wydaje się być powszechną strategią ewolucji na poziomie molekularnym [79, 80]. Można przypuszczać, że poprzez ten mechanizm powstały takie białka jak: bakteryjna ferrodoksyna [81], streptokinaza [82], rodanaza [83, 84], białko A *Staphylococcus aureus* [85], parwalbumina karpia [86], pepsyna [87], pencylinopepsyna [88], renina [89] i inne proteinazy aspartylowe [90]. Zgodnie z sugestią McLachlana [71] schemat pierwotnych etapów ewolucji proteinaz serynowych przedstawia rycina 5.

V. Powstanie zymogenów

Jak wspomniano na wstępie wszystkie proteinazy serynowe eukariontów w przeciwieństwie do bakteryjnych posiadają formy zymogenowe. Wyjątkiem od tej reguły jest trypsyna raka (*Astacus fluviatulis*) I_t [91], która stanowi prawdopodobnie pośrednie ogniwo ewolucyjne pomiędzy proteinazami bakterii a proteinazami organizmów wyższych [66]. Peptyd regulatorowy znajdujący się na N-końcu cząsteczki poszczególnych enzymów jest bardzo zróżnicowany pod względem wielkości jak i sekwencji aminokwasów. Wyróżnia się co najmniej cztery grupy peptydów regulatorowych [104], pozornie w ogóle nie spokrewnionych ze sobą (Tab. 3), co potwierdza tezę McLachlana [71], że najpierw powstał pragen wspólny dla wszystkich genów kodujących proteinazy organizmów wyższych (Ryc. 7 gen A), a dopiero później w toku ewolucji pojawiły się formy zymogenowe. Na rycinie 6 przedstawiono schematycznie strukturę zymogenów zakwalifikowanych do czwartej grupy (Tab. 3) różnych serynowych enzymów proteolitycznych, zaznaczając homologiczne sekwencje aminokwasów. Ogólnie wyróżnia się cztery typy homologicznych sekwencji: 1. tzw. struktury „kringlowe” (pętle łańcucha polipeptydowego utworzone przez wiązania dwusiarczkowe kształtem przypominające precle) protrombiny [105, 106], plazminogenu [107], t-PA [99] i wysokocząsteczkowej urokinazy [94];



Ryc. 6. Schemat struktury zymogenów niektórych proteinaz serynowych w porównaniu z chymotrypsyną. Strzałki oznaczają miejsca rozcięcia łańcucha polipeptydowego zymogenów w czasie aktywacji. Enzymatyczne części zymogenów (łańcuchy B) — zacernione, pozostała część połączona mostkiem dwusiarczkowym (przerwana linia).

Część zakropkowana obrazuje peptydy które ulegają odłączeniu w procesie aktywacji zymogenów. Części zymogenów o wzajemnej homologicznej sekwencji aminokwasów zakreskowano w identyczny sposób: 1 — homologiczne sekwencje aminokwasów w obrębie tzw. struktur „kringlowych” (5 w plazminogenie [107], po 2 w protrombinie [105, 106] i t-PA [99] i 1 w urokinazie [94]; 2 — sekwencje powtarzające się w białku C i czynnikach krzepnięcia IX oraz X [55]; 3 — sekwencje aminokwasów homologiczne z mysim i ludzkim epidermalnym czynnikiem wzrostu [94, 110]; 4 — w dużym stopniu homologiczne sekwencje aminokwasów zawierające reszty kwasu gamma-karboksyglutaminowego białek, których synteza zależy od witaminy K [55]; 5 — sekwencja homologiczna ze strukturami „fingerowymi!” (ang. *finger structure*) fibronektyny [110]; 6 — łańcuch A trombiny; 7 — łańcuchy polipeptydowe o niezupełnie poznanej jeszcze strukturze I-rzędowej. Gwiazdka oznacza nieznaną sekwencję aminokwasów części enzymatycznej zymogenu.

Tabela 3

Porównanie aktywacyjnych miejsc przecięcia łańcuchów polipeptydowych zymogenów serynowych enzymów proteolitycznych.

Hydrolizowane wiązanie zaznaczono strzałką. Górna liczba oznacza numer aminokwasu od początku zymogenu (porównaj z Ryc. 4). Sekwencję hydrolizowanego miejsca ludzkiej haptoglobiny — homologicznego białka proteinaz serynowych podano na końcu tabeli [92]. Dolna liczba oznacza numer aminokwasu od początku odszczepianego peptydu. Jednoliterowe oznaczenia aminokwasów jak na rycinie 2.

Grupa I — Krótki peptyd regulatorowy odłączany po hydrolizie wiązania Liz-Ile	
Trypsynogen A (ryba dwudyszna)	E D D K ₇ ↑ I V G G
Trypsynogen (wieprzowy)	D D D K ₈ ↑ I V G G
Prokokonaza oraz trypsynogeny kręgowców /93/	D G G K ₁₃ ↑ I V G G
Grupa II — Krótki peptyd regulatorowy odłączany po hydrolizie wiązania Arg-Ile lub Arg-Val	
Proelastaza B (ryba dwudyszna) /93/	E M E R ₁₀ ↑ V V G G
Kalikreina tkankowa (mysia) /55/	V Q S R ₆ ↑ I V G G
Grupa III — Krótki peptyd regulatorowy połączony mostkiem dwusiarczkowym z enzymem po hydrolizie wiązania Arg-Ile lub Arg-Val	
Proelastaza A (ryba dwudyszna)	P T A R ₁₁ ↑ V V N G
Chymotrypsynogen A (wołowy) i inne chymotrypsynogeny kręgowców /93/	G L S R ₁₅ ↑ I V N G
Grupa IV — Długi peptyd regulatorowy połączony mostkiem dwusiarczkowym z enzymem po hydrolizie wiązania Arg-Ile lub Arg-Val (całość lub część peptydu)	
* Wysokocząsteczkowa urokinaza (ludzka) /94, 95/	L R P R ₁₅₇ ↑ I I G G
Plazminogen (ludzki) /96/	C P G R ₅₆₀ ↑ V V G G
Protrombina (wołowa) /96/	I E G R ₃₂₃ ↑ I V E G
Czynnik IX (ludzki) /97/	D F T R ₃₅₇ ↑ V V G G
** Czynnik X (wołowy) /96/	Q V V R ₅₁₇ ↑ I V G G
** Białko C (wołowe) /98/	L D P R ₁₆₉ ↑ I V D G
t-PA (ludzki) /99/	P G F R ₂₇₅ ↑ I K G G
Haptoglobina (ludzka) /100/	P V Q R ₁₄₃ ↑ I L G G

* izoluje się w postaci dwułańcuchowej, aktywnej enzymatycznie, ale są dowody na istnienie jednołańcuchowego prekursora /101/

** zymogeny izoluje się w postaci dwułańcuchowej (czynnik X jest produkowany przez hepatocyty w formie jednołańcuchowej) /102, 103/

2. sekwencje powtarzające się w białku C i czynnikach IX oraz X [55];
3. sekwencje homologiczne z epidermalnymi czynnikami wzrostu [108, 109] w wysokocząsteczkowej urokinazie [94], białku C, t-PA i czynnikach IX i X [110]; 4. N-końcowe w wysokim stopniu homologiczne sekwencje w białkach, których synteza zależy od witaminy K [55, 111]. Pomimo tej różnorodności struktury I-rzędowej zymogenów, wszystkie łańcuchy A enzymów proteolitycznych wykazują znaczną homologię regionu, w którym występuje cysteina tworząca międzyłańcuchowe wiązania dwusiarcz-

Tabela 4

Porównanie sekwencji aminokwasów w rejonie reszt cysteinowych międzyłańcuchowego mostka dwusiarczkowego w łańcuchu A (nieenzymatyczna część) i B (część enzymatyczna) proteina z serynowych oraz haptoglobiny. Liczby oznaczają kolejny numer aminokwasu od początku N-końca danego łańcucha.

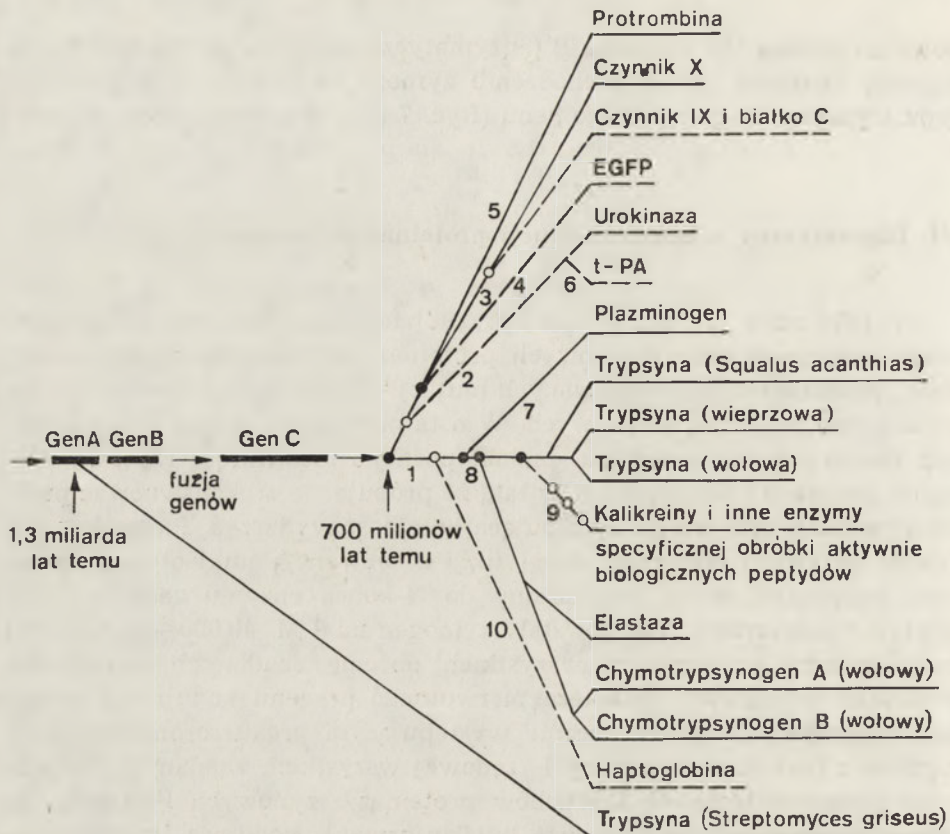
ENZYM	ŁAŃCUCH A	ŁAŃCUCH B
alfa-chymotrypsyna (wołowa) /96/	1 Cys-Gly-Val-Pro-Ala- 1 Cys-Gly-Val-Pro-Ser- 132 -Arg-Phe-Pro-Cys-Gly-Lis-Phe-Thr- 132 -Pro-Phe-Pro-Cys-Gly-Arg-Val-Ser- 141 -Thr-Phe-Pro-Cys-Gly-Arg-Leu-Gly- 148 -Lis-Phe-Gln-Cys-Gly-Gln-Lys-Thr- 547 -Ser-Phe-Asp-Cys-Gly-Lys-Pro-Gln- 296 -Glu-Ala-Asp-Cys-Gly-Leu-Arg-Pro- 264 -Cys-Ser-Thr-Cys-Gly-Leu-Arg-Gln- 72 -Glu-Ala-Val-Cys-Gly-Lys-Pro-Lys-	122 -Ala-Val-Cys-Leu-Pro- sekwencja nieznana 106 -Pro-Ala-Cys-Leu-Pro- 109 -Pro-Ile-Cys-Ile-Ala- 108 -Pro-Ile-Cys-Leu-Pro- 121 -Thr-Ile-Cys-Leu-Pro- 105 -Pro-Ala-Cys-Leu-Pro- 119 -Pro-Val-Cys-Leu-Pro- 120 -Thr-Val-Cys-Leu-Pro- 105 -Pro-Ile-Cys-Leu-Pro- 114 -Pro-Ile-Cys-Leu-Pro- 140 -Pro-Ile-Cys-Leu-Pro-
elastaza A (ryba dwudyszna) /93/		
czynnik Xa (wołowy) /96/		
czynnik IXa (wołowy) /96/		
białko C (wołowe) /57, 98/		
urokinaza (ludzka) /94, 95/		
plazmina (ludzka) /96/		
trombina (ludzka) /96/		
t-PA (ludzki) /99/		
haptoglobina (ludzka) /92/	sekwencja aminokwasów nieznana	
C1r (ludzki) /112, 113/	sekwencja aminokwasów nieznana	
C1s (ludzki) /114/	sekwencja aminokwasów nieznana	

kowe z cysteiną 122 łańcucha B (enzymatycznego) (Tab. 4). Potwierdza to sugestię DeHaena [93] o pochodzeniu zymogenów proteinaz serynowych typu trypsyny od pierwotnego genu (Ryc. 7 gen C) kodującego zymogen.

VI. Hipotetyczny schemat ewolucji proteinaz serynowych

W 1978 roku Young i wsp. [96] na podstawie znanych w tym czasie sekwencji aminokwasowych proteinaz serynowych, używając metodę „punktowych zaakceptowanych mutacji”, [115] zaproponowali drzewo ewolucyjne proteinaz serynowych. W ostatnich latach, dzięki udoskonaleniu metod sekwencjonowania białek, poznano strukturę I-rzędową dalszych proteinaz i ich zymogenów tak, że próbuje się zrekonstruować przebieg ewolucji przyjmując następującą kolejność wydarzeń. Pierwotny gen trwale aktywnej proteinazy uległ fuzji z sekwencją nukleotydów kodującą polipeptyd, który przyłączony do N-końca enzymu zadziałał jako peptyd regulatorowy. Tak powstały zymogen miał M_r 40 000—50 000 i był bezpośrednim prekursorem wszystkich obecnie zbadanych zymogenów proteinaz serynowych. Hipoteza pierwotnego prageny kodującego zymogen wyjściowy (wspólny obecnie występującym prekursorom proteinaz) wynika z homologii struktury I-rzędowej wszystkich zbadanych dotychczas nieenzymatycznych łańcuchów proteinaz serynowych i zakłada, że w wyjściowym pragenie zawarta była informacja kodująca łańcuch polipeptydowych struktur kringlowych, fragment homologiczny z EGF i peptyd zawierający reszty kwasu gamma-karboksyglutaminowego.

Według Younga i wsp. [96] dywergencja proteinaz bakteryjnych (trypsyny *Streptomyces griseus*) i enzymów eukariotycznych nastąpiła około 1.3 miliarda lat temu. Pierwsze kręgowce pojawiły się na ziemi najwcześniej 500 milionów lat temu, i do momentu opisanego struktury I-rzędowej trypsyny raka *Astacus fluviatulis* [66] brakowało ogniwa łączącego proteinazy prekariontów i kręgowców [116]. Ponieważ pierwsze prymitywne stawonogi, do których należą też skorupiaki pojawiły się 700 milionów lat temu (trylobity) można założyć, że hipotetyczny opisany powyżej zymogen proteinaz serynowych eukariotów powstał w początkach ery paleozoicznej. Z tego genu ewoluował gen urokinazy, a w wyniku częściowej duplikacji genu w obrębie części kodującej peptyd regulatorowy powstały prageny wyjściowe protrombiny, t-PA i plazminogenu [99, 117—120]. Duplikacja całego genu i późniejsza dywergencja doprowadziły do powstania haptoglobiny [92], białka nieenzymatycznego o zupełnie innej funkcji niż proteinazy. Z tego też pierwotnego prageny na skutek mutacji w części kodującej nieenzymatyczny fragment zymogenu (translokacja fragmentu DNA) powstał wyjściowy gen genów czynników IX i X oraz białka C, a obszerne delecje w tej części materiału genetycznego do-



Ryc. 7. Schemat ewolucji zymogenów serynowych enzymów proteolitycznych.

Liczbami umieszczonymi pod gałęziami drzewa ewolucyjnego opisano ważniejsze wydarzenia genetyczne będące podstawą do molekularnej ewolucyjnej dywergencji zymogenów proteinaz: 1 — delecja sekwencji homologicznej z EGF i odcinka wiążącego wapń; 2 — delecja odcinka wiążącego wapń; 3 — translokacja fragmentu DNA w wyniku której struktura „kringlowa” zostaje zastąpiona inną sekwencją; 4 — częściowa duplikacja i następnie translokacja w inne miejsce genomu fragmentu DNA kodującego ewolucyjny prekursor EGF; 5 — delecje sekwencji homologicznej z EGF i częściowa duplikacja genu w części kodującej strukturę „kringlową”; 6 — częściowa duplikacja genu w części kodującej strukturę „kringlową” i fuzja z sekwencją kodującą strukturę „fingerowe” fibronektyny; 7 — częściowe zwielokrotnienie genu w obrębie struktur „kringlowych”; 8 — obszerna delecja części nieenzymatycznej genu; 9 — zwielokrotnienie kopii genu i dywergencja poszczególnych genów; 10 — ewolucyjna dywergencja haptoglobiny poprzez mutacje punktowe.

Ogólny kształt drzewa ewolucyjnego i punktów dywergencji proteinaz eukariotycznych przyjęto wg Young i wsp. [96] (linie ciągłe i pełne koła). Proponowane punkty dywergencji i linie ewolucyjne czynnika IX, białka C, urokinazy, t-PA, haptoglobiny i prekursora epidermalnego czynnika wzrostu (EGFP) zaznaczono odpowiednio pustymi kołami i linią przerywaną. Ponieważ nie uwzględniono różnic w homologii sekwencji aminokwasów pomiędzy poszczególnymi zymogenami proponowane miejsca rozgałęzień są czysto hipotetyczne i mogą ulec weryfikacji po zastosowaniu właściwych metod określania ewolucyjnych pokrewieństw białek na podstawie porównania znanych struktur I-rzędowych. Gen A — gen stale aktywnej proteiny; Gen B — gen białka o nieznannej funkcji; Gen C — gen pierwotnego zymogenu serynowych enzymów proteolitycznych.

prowadziły do powstania genów kodujących zymogeny o krótkim peptydzie regulatorowym (Ryc. 7).

Do tej grupy enzymów z krótkim peptydem regulatorowym oprócz zymogenów proteinaz trawiennych zaliczamy enzymy biorące udział w specyficznej obróbce biologicznie aktywnych peptydów: kalikreina [53, 68, 121—123], gamma renina [124], tonina [125, 126], gamma-NGF [127, 128], białko wiążące epidermalny czynnik wzrostu (EGF-BP) [129], endopeptydazy beta składnika nerwowego czynnika wzrostu (beta-NGF endopeptydaza) [129, 130]. Charakterystyczną cechą enzymów tej grupy jest wysoka specyficzność działania, oraz tak znaczne wzajemne homologie struktury I-rzędowej (od 75⁰/o) [126, 131], że białka te dają krzyżowe reakcje immunologiczne [129, 132]. U myszy geny tych enzymów znajdują się w pobliżu lokus TAM-1 na chromosomie 7 [133], co łącznie ze wspomnianymi podobieństwami immunologicznymi i znaczną wzajemną homologią sekwencji aminokwasów wskazuje, że ewoluowały one stosunkowo niedawno poprzez zwielokrotnienie kopii pojedynczego genu wyjściowego proteinazy i stanowią obecnie ściśle spokrewnioną grupę białek o podobnej funkcji [134]. Zymogeny serynowych enzymów proteolitycznych, oraz epidermalne czynniki wzrostu cechuje występowanie sekwencji homologicznych (Ryc. 6). Pozwala to przypuszczać, że już w prekursorowym zymogenie, zanim nastąpiła jego dywergencja, występowała taka homologiczna sekwencja. Do momentu poznania sekwencji nukleotydów w cDNA prekursora mysiego epidermalnego czynnika wzrostu [135, 136] (dziesięciokrotne powtarzanie się odcinków homologicznych z fragmentem sekwencji niektórych serynowych enzymów proteolitycznych) przypuszczano, że czynniki te są produktami degradacji zymogenów proteinaz serynowych [96]. Są jednak dane wskazujące, że epidermalne czynniki wzrostowe powstały u kręgowców stosunkowo niedawno w wyniku częściowej duplikacji i następnie translokacji w inne miejsce genomu fragmentu DNA pierwotnego genu kodującego prekursor czynników krzepnięcia IX i X oraz białka C, po oddzieleniu się tego prągu od linii ewolucyjnej prowadzącej do trombiny, ale zanim nastąpiła jego dywergencja w kierunku tych trzech enzymów [137]. Taka lokalizacja miejsca dywergencji czynników wzrostowych znajduje potwierdzenie w występowaniu w białku C i w czynnikach IX i X nietypowego aminokwasu: kwasu beta-hydroksy-asparaginowego w homologicznej sekwencji jak w epidermalnym czynniku wzrostu [138, 139]. W żadnym z homologicznych odcinków sekwencji prekursora nie występuje kwas asparaginowy w równoważnej pozycji. Homologiczne sekwencje łańcuchów polipeptydowych epidermalnych czynników wzrostu i t-PA nie zawierają tego nietypowego aminokwasu. Sugeruje to lokalizację miejsc dywergencji tych enzymów (Ryc. 7).

Szczególną cechą zymogenów proteinaz kaskady krzepnięcia (protrombiny, czynników VII, IX, X oraz białka C) jest występowanie od N-końca homologicznej sekwencji czterdziestu-kilku aminokwasów zawierających

reszty kwasu gamma-karboksyglutaminowego. Za starym ewolucyjnie pochodzeniem takiej sekwencji przemawia jej obecność zarówno w protrombinie jak i w czynnikach IX, X oraz białku C.

Fizjologiczna funkcja tych enzymów spowodowała znaczne zachowanie struktury I-rzędowej tego odcinka łańcucha polipeptydowego. Funkcjonalne znaczenie ma także, homologiczna wobec struktur „palczastych” (ang. *finger structures*) [110, 140], sekwencja aminokwasów w tkankowym aktywatorze plazminogenu odpowiedzialna za powinowactwo jego do fibryny. Jest prawdopodobne, że ten fragment łańcucha polipeptydowego zymogenu pojawił się w rozwoju ewolucyjnym w związku z fizjologiczną funkcją tkankowego aktywatora plazminogenu, świadcząc równocześnie o ewolucyjnym pokrewieństwie obu białek.

Jasny i konsekwentny obraz ewolucji proteinaz serynowych zakłóca czynnik B dopełniacza, występujący w formie zymogenowej w osoczu [141]. W wyniku działania czynnika \bar{D} , czynnik B zostaje zaktywowany [142]. Aktywny enzym liczy 505 aminokwasów [143], a więc dwukrotnie więcej niż inne proteinazy serynowe. Tylko C-końcowa jego połowa (222—505) wykazuje homologie z pozostałymi klasycznymi proteinazami serynowymi. Pomimo, że aminokwasy katalitycznej triady (His, Asp, Ser) występują w homologicznej sekwencji oraz pierwotne i wtórne miejsca wiązania substratu są dobrze zachowane (podobnie, jak niektóre mostki dwusiarczkowe w protrombinie i chymotrypsynogenie [144]), trzeba przyjąć, że czynnik B jest proteinazą serynową z odmiennym mechanizmem aktywacji ze względu na długość odcinanego łańcucha polipeptydowego i braku homologii N-końcowej części czynnika Bb z typowymi proteinazami serynowymi.

Podobne właściwości fizykochemiczne, jak czynnik B, ma składnik C2 dopełniacza spełniający analogiczne funkcje w klasycznej drodze aktywacji dopełniacza (aktywacja składnika C3) [63, 145, 146]. Jest więc prawdopodobne, że składnik C2 należy zakwalifikować do tej samej klasy proteinaz serynowych co czynnik B. Ewolucyjne pochodzenie tych enzymów nie jest jasne choć nie można kwestionować ich powiązań z pozostałymi proteinazami serynowymi.

Dalszych informacji o ewolucji i wzajemnych pokrewieństwach zymogenów serynowych enzymów proteolitycznych dostarczy zapewne poznanie struktury I i III-rzędowej pozostałych niezbadanych jeszcze dokładnie prekursorów proteinaz, a także pełne poznanie funkcji fizjologicznych wyszczególnionych uprzednio sekwencji aminokwasowych nieenzymatycznej części zymogenów.

VII. Ewolucyjna konwergencja subtylizyny

Na zakończenie trzeba wspomnieć o drugim typie serynowych enzymów proteolitycznych. Najlepiej zbadanymi enzymami tej grupy są subtylizyny

produkowane przez *Bacillus subtilis*. Pomimo całkowicie odmiennej struktury I-rzędowej [147, 148] i III-rzędowej [23, 25] subtylizyny mają katalityczną triadę aminokwasów: Asp-35, His-64 i Ser-221, prawie identycznie zorientowaną w przestrzeni jak proteiny typu trypsyny [149]. Także miejsca wiążące substrat na powierzchni cząsteczki enzymu są analogicznie zbudowane jak w trypsynie [30]. Ostatnio została poznana struktura III-rzędowa proteiny K z grzyba *Tritirachium album* wykazująca znaczną homologię przestrzennej budowy jej cząsteczki i cząsteczki subtylizyny [150], wskazując, że oba te enzymy ewoluowały od wspólnego prabiałka. Potwierdza to ostatecznie występowanie dwóch odrębnych linii ewolucyjnych serynowych enzymów proteolitycznych — typu trypsyny i subtylizyny rozpowszechnionych zarówno wśród eukariontów jak i prokariontów. Jest to też piękny przykład ewolucyjnej konwergencji na poziomie molekularnym, gdy ta sama funkcja spowodowała wykształcenie identycznego mechanizmu reakcji w oparciu o te same fragmenty struktury III-rzędowej.

Zaakceptowano do druku 12 kwietnia 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Harper E., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 1063—1078.
2. Matthews B. S., Sigler P. B., Henderson R., Blow D. M., (1967), *Nature*, **214**, 652—656.
3. Birkoft J. J., Blow D. M. J., (1972), *J. Mol. Biol.*, **68**, 187—240.
4. Tulinsky A., Vandlen R. L., Morimoto C. N., Mani N. V., Wright L. H., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4185—4192.
5. Vandlen R. L., Tulinsky A., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4193—4200.
6. Cohen G. H., Silverton E. W., Matthews B. W., Braxton H., Davies D. R., (1969), *J. Mol. Biol.*, **44**, 129—141.
7. Cohen G. H., Silverton E. W., Davies D. R., (1981), *J. Mol. Biol.*, **148**, 449—479.
8. Stroud R. M., Kay L. M., Dickerson R. E., (1974), *J. Mol. Biol.*, **83**, 185—208.
9. Krieger M., Kay L. M., Stroud R. M., (1974), *J. Mol. Biol.*, **83**, 209—230.
10. Fehhammer H., Bode W., (1975), *J. Mol. Biol.*, **98**, 683—692.
11. Bode W., Schwager P., (1975), *J. Mol. Biol.*, **98**, 693—717.
12. Bode W., Fehhammer H., Huber R., (1976), *J. Mol. Biol.*, **106**, 325—335.
13. Greer J., (1981), *J. Mol. Biol.*, **153**, 1027—1042.
14. Watson H. C., Shotton D. M., Cox J. M., Mierhead H., (1970), *Nature*, **225**, 806—811.
15. Shotton D. M., Watson H. C., (1970), *Nature*, **225**, 811—816.
16. Sawyer L., Shotton D. M., Campbell J. W., Wendell P. L., Muirhead H., Watson H. C., Diamond R., Lander R. C., (1978), *J. Mol. Biol.*, **118**, 137—208.
17. Bode W., Chen Z., Bartels K., Kutzbach C., Schmidt-Kastner G., Bartunik H., (1983), *J. Mol. Biol.*, **164**, 237—282.

18. Brayer G. D., Delbaere L. T. J., James M. N. G., (1978), *J. Mol. Biol.*, **124**, 261—283.
19. Coddington P. W., Delbaere L. T. J., Hayakawa K., Hutcheon W. L. B., James M. N. G., Jarášec L., (1974), *Can. J. Biochem.*, **52**, 208—220.
20. Delbaere L. T. J., Hutcheon W. L. B., James M. N. G., Thiesen G. R., (1975), *Nature*, **257**, 758—763.
21. Brayer G. D., Delbaere L. T. J., James M. N. G., (1979), *J. Mol. Biol.*, **131**, 743—776.
22. Delbaere L. T. J., Brayer G. D., James M. N. G., (1979), *Nature*, **279**, 165—168.
23. Wright C. S., Alden R. A., Kraut J., (1969), *Nature*, **221**, 235—242.
24. Alden R. A., Wright C. S., Kraut J., (1970), *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, **B257**, 119—124.
25. Drenth J., Hol W. G. J., Jansonius J. N., Koehoek R., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 177—181.
26. Freer S. T., Kraut J., Robertus J. D., Wright H. T., Xuong Ng. H., (1970), *Biochemistry*, **9**, 1997—2009.
27. Kossiakov A. A., Chambers J. L., Kay L. M., Stroud R., (1977), *Biochemistry*, **16**, 654—664.
28. Fehlhammer H., Bode W., Huber R., (1977), *J. Mol. Biol.*, **111**, 415—438.
29. Blow D. M., (1976), *Acc. Chem. Res.*, **9**, 145.
30. Kraut J., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 331—358.
31. Hartley B. S., (1964), *Nature*, **201**, 1284—1287.
32. Zwilling R., Dörsam H., Torff H.-J., Rödl J., (1981), *FEBS Lett.*, **127**, 75—78.
33. Kay J., (1978), *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 789—797.
34. Kay J., Siemankowski R. F., Siemankowski L. M., Goll D. E., (1982), *Biochem. J.*, **201**, 267—278.
35. Kay J., Siemankowski L. M., Siemankowski R. F., Greweling J. A., Goll D. E., (1982), *Biochem. J.*, **201**, 279—285.
36. Dewald B., Rindler-Ludwig R., Bretz U., Baggioni M., (1975), *J. Exp. Med.*, **141**, 709—723.
37. Marossy K., Hauck M., Elödi P., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **615**, 237—245.
38. Delshammer M., Ohlsson K., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **69**, 125—131.
39. Dubin A., Koj A., Chudzik J., (1976), *Biochem. J.*, **153**, 389—396.
40. Potempa J., (1982), *Acta Histochem. Cytochem.*, **20**, 41—52.
41. Gadek J. E., Hunninghake G. W., Fells G. A., Zimmerman R. L., Keogh B. A., Crystall R. G., (1980), *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, **16** (suppl.), 27—40.
42. Takeuchi A., Kobayashi K., Yukiya Y., Chihara T., Matsumoto K., Hashimoto A., (1984), *Int. J. Tissue React.*, **6**, 1—8.
43. Stroud R. M., (1974), *Sci. Amer.*, **231**, 74—88.
44. Meizel S., Mukerji S. K., (1975), *Biol. Reprod.*, **13**, 83—93.
45. Parrish R. F., Polakowski K. L., (1979), *Int. J. Biochem.*, **10**, 391—395.
46. Felsted R. L., Kramer K. J., Law J. H., Berger E., Kafatos F. C., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3012—3020.
47. Eisen A. Z., Henderson K. O., Jeffrey J. J., Bradshaw R. A., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1814—1822.
48. Eisen A. Z., Jeffrey J. J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 517—526.
49. Lecroisey A., Boulard C., Keil B., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **101**, 385—393.

50. Lecroisey A., DeWolf A., Keil B., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 1261—1265.
51. Berger E. A., Shooter E. M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3647—3651.
52. Frey P., Forand R., Maciąg T., Shooter E. M., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6294—6298.
53. Mason A. J., Evans B. A., Cox D. R., Shine J., Richards R. J., (1983), *Nature*, **303**, 300—307.
54. Schachter M., (1980), *Pharmacol. Rev.*, **31**, 1—17.
55. Jackson C. M., Nemerson Y., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 765—811.
56. Cierniewski C., Krajewski T., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 81—105.
57. Fernlund P., Stenflo J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12170—12179.
58. Schalekamp M. A. D. H., Derkx F. H. M., (1981), *Clin. Sci.*, **61**, 15—21.
59. Hoylaerts M., Rijken D. C., Lijnen H. R., Collen D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2912—2919.
60. Wiman B., Collen D., (1978), *Nature*, **272**, 549—550.
61. Rijken D. C., Collen D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7035—7041.
62. Reid K. B. M., Porter R. R., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 433—464.
63. Brown E. J., Frank M. M., (1981), *Immunol. Today*, **2**, 129—134.
64. Habener J. F., Chang H. T., Potts J. T., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3910—3917.
65. Jany K. D., Bekeler K., Pflleiderer G., Ishay J., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 1—7.
66. Titani K., Sasagawa T., Woodbury R. G., Ericsson L. H., Dörsam H., Kraemer M., Neurath H., Zwilling R., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1459—1465.
67. Grant G. A., Henderson K. O., Eisen A. Z., Bradshaw R. A., (1980), *Biochemistry*, **19**, 4653—4659.
68. Tschesche H., Mair G., Godec G., Fiedler F., Ehret W., Hirschauer C., Lemon M., Fritz H., Schmidt-Kastner G., Kutzbach K., (1979) w: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, red. Fujii S., Moriya H., Suzuki T., t. 120A, str. 245—260; Plenum Press, New York, London.
69. James M. N. G., Delbaere L. T. J., Brayer G. D., (1978), *Can. J. Biochem.*, **56**, 396—402.
70. Shotton D. M., Hartley B. S., (1970), *Nature*, **225**, 802—806.
71. McLachlan A. D., (1979), *J. Mol. Biol.*, **128**, 48—79.
72. Zwilling R., Neurath H., Ericsson L. H., Enfield D. L., (1975), *FEBS Lett.*, **60**, 247—249.
73. Neurath H., (1975) w: *Proteases and Biological Control*, red. Reich E., Rifkin D. B., Shaw E., str. 51—64; Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
74. Neurath H., Walsh K. A., (1976) w: *Proteases and Biological Control*, red. Reich E., Rifkin D. B., Shaw E., t. 11, str. 29—42; Academic Press, New York.
75. Birktoft J. J., Kraut J., Freer S. T., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4481—4485.
76. Robertus J. D., Kraut J., Alden R. A., Birktoft J. J., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4293—4303.
77. McLachlan A. D., (1972), *J. Mol. Biol.*, **64**, 417—437.
78. Matthews B. W., (1976), *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **27**, 493—523.
79. Alexander F., Young P. R., Tilghman S. M., (1984), *J. Mol. Biol.*, **173**, 159—173.
80. McLachlan A. D., Walker J. E., (1977), *J. Mol. Biol.*, **112**, 543—558.

81. Adman E. T., Sieker L. C., Jensen L. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3987—3996.
82. Jackson K. W., Tang J., (1982), *Biochemistry*, **21**, 6619—7048.
83. Bergsma J., Hol W. G. J., Jansonius J. N., Kalk K. H., Ploegman J. H., Smith J. D. G., (1975), *J. Mol. Biol.*, **98**, 637—643.
84. Ploegman J. H., Drent G., Kalk K. H., Hol W. G. J., Heinriksen R. L., Keim P., Weng L., Russell J., (1978), *Nature*, **273**, 124—129.
85. Uhlen M., Guss B., Nilsson B., Gatenbeck S., Philipson L., Lindberg M., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 1695—1702.
86. Kretsinger R. H., Nockolds C. E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313—3326.
87. Sepulveda P., Marciniyszyn J., Liu D. Jr., Tang J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5082—5088.
88. Tang J., James M. N. G., Hsu I. N., Jenkins J. A., Blundell T. L., (1978), *Nature*, **271**, 618—621.
89. Holm I., Ollo R., Panthier J.-J., Rougeon F., (1984), *EMBO J.*, **3**, 557—562.
90. Tang J., (1979), *Mol. Cell. Biochem.*, **26**, 93—109.
91. Zwilling R., Pfleiderer G., Sonneborn H. H., Kraft V., Stucky J., (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**, 1275—1287.
92. Kurosky A., Barnett D. R., Lee T.-H., Touchstone B., Hay R. E., Arnott M. S., Bowman B. H., Fitch W. M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3398—3392.
93. DeHaen C., Neurath H., Teller D. C., (1975), *J. Mol. Biol.*, **92**, 225—259.
94. Günzler W. A., Steffens G. J., Ötting F., Kim S.-M. A., Frankus E., Flohe L., (1982), *Z. Physiol. Chem.*, **363**, 1155—1165.
95. Steffens G. J., Günzler W. A., Ötting F., Frankus E., Flohe L., (1982), *Z. Physiol. Chem.*, **363**, 1043—1058.
96. Young C. L., Barker W. C., Tomaselli C. M., Dayhoff M. O., (1978) w: Atlas of Protein Sequence and Structure, red. Dayhoff M. O., t. 5, Suppl. 3, str. 73—93; National Biomedical Research Fundation, Washington D. C.
97. Kurachi K., Davie E. W., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6461—6464.
98. Stenflo J., Fernlund P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12180—12190.
99. Pennica D., Holmes W. E., Kohr W. J., Harkins R. N., Vehar G. A., Ward C. A., Bennett W. F., Yelverton E., Seeburg P. H., Heyneker H. L., Goeddel D. V., Collen D., (1983), *Nature*, **301**, 214—221.
100. Raugei G., Bensi G., Colantuoni V., Romano V., Santoro C., Costanzo F., Cortese R., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 5811—5819.
101. Salerno G., Verde P., Nolli M. L., Corti A., Szöts H., Meo T., Johnson J., Bullock S., Cassani G., Blasi F., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 110—114.
102. Graves C. B., Munns T. W., Willingham A. K., Strauss A. W., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13108—13113.
103. Fair D. S., Edgington T. S., (1982), *Circulation*, **66**, Abst. II—173.
104. Neurath H., Walsh K. A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3825—3832.
105. Magnusson S., Sottrup-Jensen L., Petersen T. E., Clays H., (1975) w: Prothrombin and Related Coagulation Factors, red. Hemker H. C., Velkamp J. J., str. 25—46, Leiden University Press, Boerhaave.
106. Magnusson S., Petersen T. E., Sottrup-Jensen L., Clays H., (1975) w: Proteases and Biological Control, red. Reich E., Rifkin D. B., Show E., t. 1, str. 123—149, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

107. Magnusson S., Petersen T. E., Sottrup-Jensen L., Dudek-Wojciechowska G., Cleys H., (1976) w: *Proteolysis and Physiological Regulation*, red. Riblons D. W., Brew K., str. 203—238, Academic Press, New York.
108. Gregory H., Preston B. M., (1977), *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **9**, 107—118.
109. Savage C. R., Inagami T. Jr., Cohen S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7612—7621.
110. Bányai L., Váradi A., Patthy L., (1983), *FEBS Lett.*, **163**, 37—41.
111. Kopeć M., (1980), *Post. Bioch.*, **26**, 3—28.
112. Arlaud G. J., Gagnon J., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1758—1764.
113. Arlaud G. J., Gagnon J., Porter R. R., (1982), *Biochem. J.*, **201**, 49—59.
114. Carter P. E., Dunbar B., Fothergill J. E., (1983), *Biochem. J.*, **215**, 565—571.
115. Dayhoff M. O., (1972) w: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, red. Dayhoff M. O., t. 5, National Biomedical Research Fundation, Washington D. C.
116. Zwillig R., Neurath H., Woodbury R. G., (1980), w: *Protides of the Biological Fluids*, red. Peeters H., str. 115—118, Pergamon Press, Oxford.
117. Sottrup-Jensen L., Zajdel M., Claeys H., Petersen T. E., Magnusson S., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2577—2581.
118. Claeys H., Sottrup-Jensen L., Zajdel M., Petersen T. E., Magnusson S., (1976), *FEBS Lett.*, **61**, 20—24.
119. Laursen R. A., Lee H.-M., (1975), *FEBS Lett.*, **56**, 70—72.
120. Hewett-Emmett D., McCoy L. E., Hassouna H. J., Reuterby J., Walz D. A., Seegers W. H., (1974), *Thromb. Res.*, **5**, 421—430.
121. Richards R. I., Catanzaro D. F., Mason A. J., Morris G. J., Baxter J. D., Shine J. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2758—2761.
122. Lazure C., Seidah N. G., Thibault G., Genest J., Chrétien J., (1981) w: *Proceedings of the seventh American Peptide Symposium*, red. Rich D. H., Gross E., str. 517—519, Pierce Chemical, New York.
123. Swift G. H., Dagorn J. C., Ashley P. L., Cummings S. W., MacDonald R. J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7263—7268.
124. Poe M., Wu J. K., Florance J. R., Rodkey J. A., Bennett C. D., Hoogsteen K., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2209—2216.
125. Seidah N. G., Chan J. S. D., Mardini G., Benjannet S., Chretien M., Boucher R., Genest J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 1002—1013.
126. Lazure C., Leduc R., Seidah N. G., Thibault G., Genest J., Chretien M., (1984), *Nature*, **307**, 555—558.
127. Thomas K. A., Baglan N. C., Bradshaw R. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9156—9166.
128. Berger E. A., Shooter E. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **353**, 804—810.
129. Bothwell M. A., Wilson W. H., Shooter E. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7287—7294.
130. Mobley W. C., Schenker A., Shooter E. M., (1976), *Biochemistry*, **15**, 5543—5552.
131. Fiedler F., Fritz H., (1981), *Z. Physiol. Chem.*, **362**, 1171—1175.
132. Fritz H., Fiedler F., Dietl T., Warwas M., Truscheit E., Kolb G., Mair G., Tschesche H., (1977) w: *Kininogenases 4*, red. Haberland G. L., Rohen J. W., Suzuki T., str. 15—28, Schattauer, New York, Stuttgart.
133. Howles P. N., Dickinson D. P., DiCaprio L. L., Woodworth-Gutai M., Gross K. W., (1984), *Nucl. Acid Res.*, **12**, 2791—2806.
134. Mason A. J., Richards R. I., Shine J., (1983) w: *Nucleic Acid Research*—

- Future Development, red. Mizubuchi K., Watanabe I., Watson J. D., str. 279—290, Academic Press, Tokyo.
135. Gray A., Dull T. J., Ullrich A., (1983), *Nature*, **303**, 722—725.
 136. Scott J., Urdea M., Quiroga N., Sanchez-Pescador R., Fong N., Selby M., Rutter W. J., Bell G. I., (1983), *Science*, **221**, 236—240.
 137. Doolittle R. F., Feng D. F., Johnson M. S., (1984), *Nature*, **307**, 558—560.
 138. Drakenberg T., Fernlund P., Roepstorff P., Stenflo J., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1802—1806.
 139. McMullen B. A., Fujikawa K., Kisiel W., Sasagawa T., Howald W. N., Kwa E. Y., Weinstein B., (1983), *Biochemistry*, **22**, 2875—2884.
 140. Peterson T. E., Thogersen H. C., Skorstengaard K., Vibe-Pedersen K., Sahl P., Sottrup-Jensen L., Magnusson S., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 137—141.
 141. Mole J. E., Anderson J. A., Davison E. A., Woods D. E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3407—3412.
 142. Johnson D. M. A., Gagnon J., Reid K. B. M., (1984), *FEBS Lett.*, **166**, 347—351.
 143. Christie D. L., Gagnon J., (1982), *Biochem. J.*, **201**, 555—567.
 144. Christie D. L., Gagnon J., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 61—70.
 145. Kerr M. A., Porter R. R., (1978), *Biochem. J.*, **171**, 99—107.
 146. Kerr M. A., (1979), *Biochem. J.*, **183**, 615—622.
 147. Smith E. L., DeLange R. J., Evans H. W., Landon M., Markland F. S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2184—2191.
 148. Olaitan S. A., DeLange R. J., Smith E. L., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5296—5301.
 149. Matthews D. A., Alden R. A., Birktroft J. J., Freer S. T., Kraut J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8875—8883.
 150. Pähler A., Banerjee A., Dattagupta J. K., Fujiwara T., Linder K., Pal G. P., Suck D., Weber G., Saenger W., (1984), *EMBO J.*, **3**, 1311—1314.

Pamięci Pani Profesor
Marii Sarneckiej-Keller
poświęcają autorzy

BOHDAN TURZYNA ^{*)}, AMALIA GUZDEK ^{**)}

Nieenzymatyczna glikozylacja białek

Nonenzymatic glycosylation of proteins

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Mechanizm glikozylacji nieenzymatycznej
- III. Metody oznaczania produktów glikozylacji nieenzymatycznej
- IV. Białka glikozylowane *in vivo* i *in vitro*
 - IV-1. Hemoglobina
 - IV-2. Białka surowicy
 - IV-3. Inne białka glikozylowane
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Mechanism of nonenzymatic glycosylation
- III. Methods for quantitation of the products of nonenzymatic glycosylation
- IV. Proteins glycosylated *in vivo* and *in vitro*
 - IV-1. Hemoglobins
 - IV-2. Plasma proteins
 - IV-3. Other glucosylated proteins
- V. Concluding remarks

I. Wprowadzenie

Synteza części cukrowej glikoprotein jest procesem enzymatycznym, katalizowanym przez grupę transferaz o wysokiej selektywności. Pierwsze etapy glikozylacji zachodzą w siateczce śródplazmatycznej, w czasie gdy nowo syntetyzowany łańcuch białkowy jest jeszcze związany z rybosomami, a zakończenie glikozylacji ma miejsce w aparacie Golgiego [1]. Glikozylacja nieenzymatyczna natomiast jest całkowicie odmiennym procesem, przebiegającym bez udziału enzymów i polega na chemicznym do-

^{*)} Dr, ^{**)} Dr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

łączeniu cukrów redukujących do białek już wydzielonych. W warunkach *in vitro* wiele cukrów redukujących wiąże się nieenzymatycznie z białkami. *In vivo* najczęściej bierze udział w tym procesie glukoza ponieważ zawartość jej w surowicy jest znaczna. Termin glikozylacja nieenzymatyczna stosuje się do procesu powstawania glikozylowanych nieenzymatycznie białek przy udziale różnych cukrów redukujących. W przypadku, kiedy cukrem redukującym jest glukoza wprowadzono nazwę glikozylacja nieenzymatyczna.

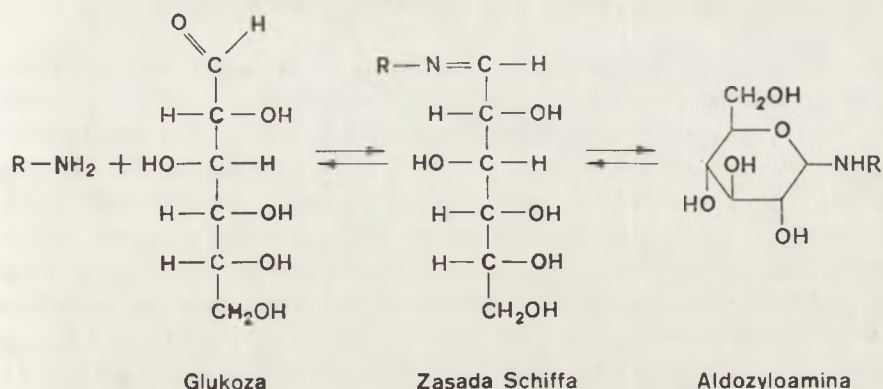
Oddziaływania pomiędzy cukrami redukującymi i aminokwasami oraz dalsze przekształcenia powstałych połączeń prowadzące do brązowych produktów degradacji, były przedmiotem zainteresowań Maillarda, już w latach dwudziestych [2]. Reakcja Maillarda jest znana zwłaszcza w przemyśle mleczarskim. Podczas dłuższego przechowywania mleka i jego przetworów tworzy się brązowy, trudno rozpuszczalny produkt, który obniża jakość pożywienia. Powstaje on w wyniku szeregu reakcji dehydratacji, kondensacji i polimeryzacji. Reakcją inicjującą w tym procesie jest oddziaływanie grupy karbonylowej cukru redukującego (np. laktozy) z grupą aminową aminokwasu (np. ϵ -aminową grupą lizyny w kazeinie).

Ogromne zainteresowanie reakcją Maillarda w żywych organizmach datuje się od momentu wykazania obecności glikozylowanej hemoglobiny w erytrocytach człowieka, a zwłaszcza stwierdzenia 2—3 krotnego wzrostu poziomu tak zmodyfikowanej hemoglobiny u chorych na cukrzycę [3].

W warunkach fizjologicznych glikozylacja nieenzymatyczna zachodzi wolniej w porównaniu z reakcjami enzymatycznymi, ulegają jej więc głównie białka o długim okresie półtrwania. Wykazano, że *in vivo* glikozylacji ulegać może wiele różnych białek, między innymi hemoglobina [4], albumina [5], krystalina oka [6] oraz białka błon erytrocytów [7]. Przede wszystkim białka glikozylowane stwierdzono w organizmach chorych na cukrzycę. Oznaczenia ilościowe glikozylowanych białek są użyteczne jako wskaźnik metabolizmu cukrów u chorych na cukrzycę. Wysuwa się ostatnio pewne przypuszczenia odnośnie udziału glikozylowanych białek w powstawaniu komplikacji cukrzycowych oraz pewnych zmian obserwowanych w procesie starzenia się.

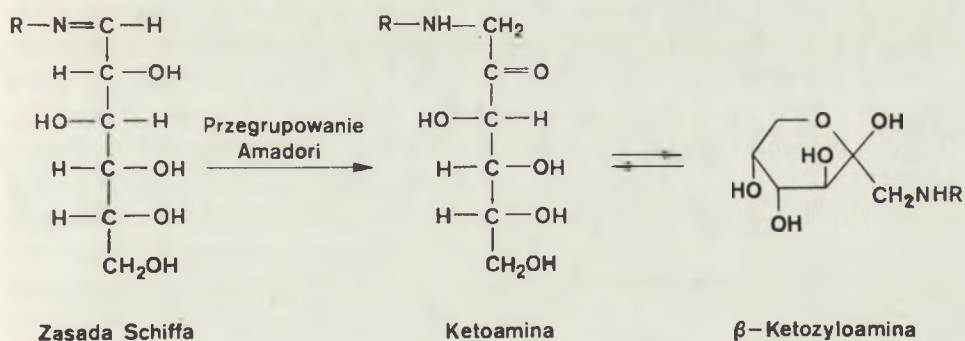
II. Mechanizm glikozylacji nieenzymatycznej

Glikozylacja nieenzymatyczna białek polega na bezpośredniej reakcji pomiędzy cukrem redukującym a białkiem. W pierwszym (szybkim i odwracalnym) etapie bierze udział wolna grupa aminowa białka i grupa karbonylowa cukru redukującego w formie łańcuchowej. Powstaje związek typu zasady Schiffa (aldoimina), który pozostaje w równowadze z N-podstawioną pochodną aldozyloaminową (Ryc. 1). Przebieg reakcji zależy od lokalnego pH wokół grup aminowych białka stanowiących aktywny



Ryc. 1. Pierwszy etap glikozylacji nieenzymatycznej.

czynnik nukleofilowy reagujący z węglowodanem. Im niższa wartość pK grup aminowych tym większe prawdopodobieństwo przyłączenia cząsteczki cukru redukującego. Tak więc, końcowe grupy aminowe białek i wewnętrzłańcuchowe reszty lizyny, ze względu na niską wartość pK tych grup i ich efektywną nukleofilowość łatwiej ulegają glikozylacji nieenzymatycznej. W reakcję tę mogą wchodzić również inne grupy aminowe, występujące w otoczeniu silnie zasadowych ugrupowań w białku. Trwały produkt końcowy powstaje w drugim (powolnym) etapie reakcji, w którym aldoinina ulega przegrupowaniu *Amadori* do bardziej stabilnej formy ketoaminowej. Formę tę można wyizolować z glikozylowanych nieenzymatycznie białek. Ketoaminowa pochodna białka występuje prawdopodobnie głównie w formie cyklicznej ketozyloaminy (Ryc. 2). Modelowe badania

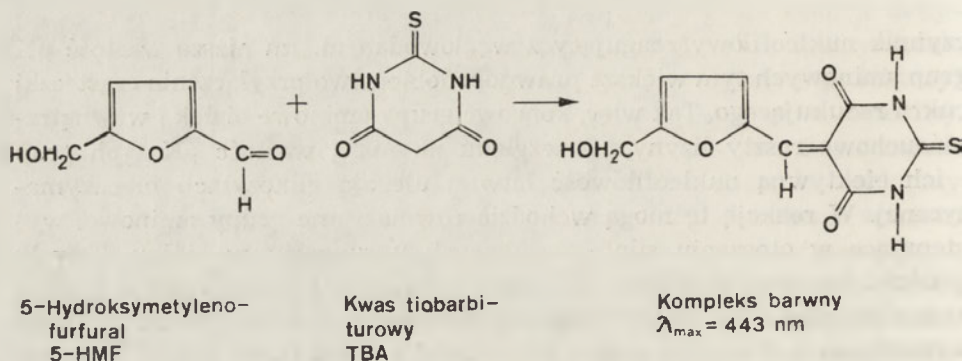


Ryc. 2. Przegrupowanie Amadori do ketoaminowej pochodnej białka.

reakcji heksoz z aminokwasami wykazały, że ketozyloaminy krystalizują w formie piranozowej [8], jakkolwiek sugeruje się również możliwość struktur furanozowych [9].

III. Metody oznaczania produktów glikozylacji nieenzymatycznej

Jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod wykrywania i ilościowego oznaczania produktów glikozylacji nieenzymatycznej jest metoda kolorymetryczna z kwasem tiobarbiturowym. Podczas łagodnej hydrolizy kwaśnej uwalniany jest z białka cukier w formie 5-hydroksymetylenofurfuralu. Ponieważ reszta białkowa interferuje z oznaczeniem kolorymetrycznym, musi być usunięta na przykład przez wytrącenie kwasem trójchlorooctowym. Powstały 5-hydroksymetylenofurfural reaguje z kwasem tiobarbiturowym tworząc kompleks barwny, którego maksimum absorbancji przypada przy 443 nm. Wyniki podaje się zwykle jako A_{443} , nanomole 5-hydroksymetylenofurfuralu lub równoważniki fruktozy [10]. Schemat tej reakcji przedstawia rycina 3.

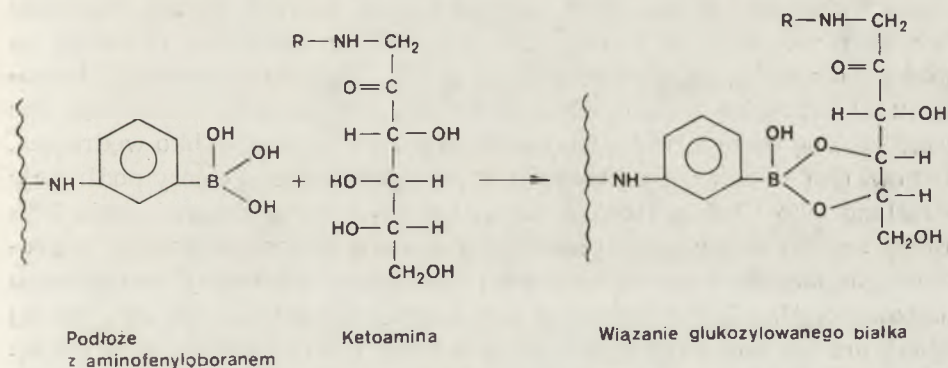


Ryc. 3. Tworzenie kompleksu barwnego w reakcji z kwasem tiobarbiturowym.

Do hydrolizy stosuje się kwasy organiczne takie jak kwas szczawiowy 0.3—1.0N [11] lub 2.0N kwas octowy [12]. Użycie bowiem mocnych kwasów prowadzi do rozkładu 5-hydroksymetylenofurfuralu. W trakcie przeprowadzania hydrolizy istotne jest utrzymywanie stałej temperatury, gdyż natężenie barwy kompleksu zmienia się w zależności od temperatury [12]. Jakkolwiek wolna glukoza nie reaguje z kwasem tiobarbiturowym, wykazano [13], że glukoza zawarta w surowicy powoduje zawyżenie wartości otrzymanych w drodze oznaczeń kolorymetrycznych glikozylowanych nieenzymatycznie białek. Dlatego przed rozpoczęciem oznaczeń wskazane jest przedializowanie próbek surowicy [14] lub wytrącenie białek kwasem trójchlorooctowym [13] lub etanolem [2]. W trakcie hydrolizy mogą się jednak tworzyć produkty, które podnoszą natężenie barwy w oznaczeniu kolorymetrycznym. Nieswoiste zabarwienie próby doświadczalnej można wyeliminować przez sporządzenie odpowiednich prób kontrolnych. Na przykład próbkę surowicy poddaje się działaniu NaBH_4 w celu zredukowania połączeń ketoaminowych do niereaktywnych heksitoloamin [13]. Można też hydrolizaty surowicy podzielić na połowę i oznaczać A_{443} jako róż-

nicę pomiędzy próbką z dodatkiem kwasu tiobarbiturowego i bez dodania kwasu [2].

Wykrywanie i oznaczanie glikozylowanych białek ma istotne znaczenie diagnostyczne w przypadkach cukrzycy. Szczególnie dobrze rozwinięto różne techniki pozwalające na rozdzielenie i oznaczenie glikozylowanych pochodnych hemoglobiny. Metody chromatograficzne z zastosowaniem żywic jonowymiennych, najczęściej kationitu Bio Rex 70, są czasochłonne. Zastosowanie mikrokolumn wypełnionych tą żywicą skróciło czas analizy [16]. Jednakże przy użyciu żadnej z dotychczasowych metod chromatograficznych nie można oddzielić hemoglobiny F od HbA_{1c}, a ponadto niewielkie zmiany temperatury, pH buforu i siły jonowej wpływają na ilość eluowanej hemoglobiny. Metodą chromatograficzną rokującą duże nadzieje jest wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa z zastosowaniem karboksylowych żywic jonowymiennych [17]. W rutynowych analizach jest jednak mało przydatna z uwagi na kosztowną i skomplikowaną aparaturę. Glikozylowane pochodne hemoglobiny można wyizolować również metodą chromatografii powinowactwa, przy czym najczęściej stosowanym podłożem jest pochodna aminofenyloboranu [18, 19]. Schemat takiego oznaczenia przedstawia rycina 4. Metoda ta jest bardzo dokładna, odznacza się dużą powtarzalnością wyników, szybkością i stanowiła podstawę do opracowania produkowanego przez firmę Pierce, zestawu zwanego Glyco-Gel Test Kit.



Ryc. 4. Zasada oznaczania białek glikozylowanych metodą chromatografii powinowactwa.

Z innych metod należy wspomnieć o metodzie oznaczania glikozylowanej hemoglobiny z zastosowaniem elektroforezy w żelu agarowym [20, 21], nie wrażliwej na zmiany temperatury, pH buforu i jego siły jonowej. Można też przy jej użyciu wydzielić hemoglobiny S i C jak również ich glikozylowane pochodne S₁ i C₁. Wreszcie liczba analizowanych próbek może wynosić kilkadziesiąt w przeciągu około 1 godziny, co umożliwia zastosowanie tej metody w praktyce klinicznej. Znane są też próby roz-

działu hemoglobina metodą radioimmunologiczną oraz ogniskowania izoelektrycznego [22, 23]. Ograniczeniem pierwszej jest konieczność uzyskania przeciwciał, a drugiej kosztowna aparatura, co pozwala jednak na rozdzielanie hemoglobiny F od A_{1c}.

W badaniach *in vitro* powszechnie stosuje się metody pozwalające ocenić stopień glikozylacji białek na podstawie wbudowywania cząsteczek monosacharydów znakowanych C¹⁴ lub H³. Znacznik jednak najczęściej zawiera radioaktywne zanieczyszczenia o nieznannej strukturze, które też mogą reagować z białkami [24]. Wartości uzyskane metodą radioizotopową przeto wymagają sprawdzenia przy użyciu innych metod.

IV. Białka glikozylowane *in vivo* i *in vitro*

IV-1. Hemoglobina

Stosunkowo wiele informacji dotyczących struktury glikozylowanej hemoglobiny, jej biosyntezy i metod oznaczania, zebrano w kilku pracach przeglądowych [2, 4, 25—28]. Hemolizat erytrocytów dorosłego człowieka zawiera hemoglobinę A₀(α₂β₂) stanowiącą ponad 90% całkowitego białka erytrocytów. Oprócz HbA₀ w erytrocytach człowieka stwierdzono dwa inne typy hemoglobiny A₂(α₂β₂) i F(α₂γ₂). Od HbA₀ różnią się tym, że podjednostki wchodzące w ich skład są produktami różnych genów. Pozostałe rodzaje hemoglobin w hemolizacie erytrocytów człowieka powstają na drodze potranslacyjnych modyfikacji HbA₀. W trakcie rozdzielania hemolizatu erytrocytów metodą chromatografii powinowactwa, wędrują one przed główną frakcją HbA₀, nazywane są przeto frakcją szybko wędrującą. Stanowi ona 4—6% hemoglobiny, a w jej skład wchodzi cztery podfrakcje określane jako HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b} i HbA_{1c}. HbA_{1c} stanowi około 75% frakcji szybko wędrującej i powstaje w wyniku dołączenia glukozy w procesie glikozylacji nieenzymatycznej do grupy aminowej aminokwasu końcowego, jakim jest walina w obu łańcuchach βHbA₀ [29, 30]. Na tej samej drodze powstają pozostałe składniki frakcji szybko wędrującej. W przypadku HbA_{1a1} glikozylującym cukrem jest fruktozo-1-6-difosforan, natomiast w HbA_{1a2} glukozo-1-6-difosforan [31]. HbA_{1b} powstaje w wyniku dezaminacji łańcuchów HbA_{1c}. Wszystkie hemoglobiny nie wyłączając HbA₀, zawierają glukozę związaną wiązaniem ketoaminowym z resztami lizyny obu łańcuchów białkowych, jednak ta modyfikacja nie wpływa na właściwości chromatograficzne hemoglobiny [32]. Flückinger i w sp. [33] wykazali metodą chromatografii powinowactwa, że połowa związanej nieenzymatycznie glukozy z hemoglobiną erytrocytów człowieka, jest połączona z resztami lizyny a połowa z resztami waliny. Najwięcej uwagi poświęcono dotąd HbA_{1c}. Powstaje ona wolno i prawie nieodwracalnie w ciągu 120 dni życia erytrocytów [34]. Jej zawartość w erytrocytach

starzejących się jest wyższa niż w młodych i zależy od ilości glukozy we krwi [35]. Istniejący stan hiperglikemii jest przyczyną nasilonej syntezy HbA_{1c} u chorych na cukrzycę [15]. Związek pomiędzy poziomem glikozylowanej hemoglobiny a cukrzycą, wykazany już w latach 60-tych [36] znalazł potwierdzenie w wielu późniejszych pracach [25, 32, 37]. Okazało się, że istnieje zależność pomiędzy ilością glikozylowanej hemoglobiny a średnią zawartością glukozy we krwi [38] i w moczu [39] w okresie około 2 miesięcy poprzedzających pomiar. Krótkotrwałe wahania w poziomie glukozy we krwi nie wpływają na zawartość glikozylowanej hemoglobiny. Stąd poziom szybko wędrującej hemoglobiny lub jej głównego składnika HbA_{1c} może być długoterminowym wskaźnikiem wyrównania metabolizmu w cukrzycy [38, 40].

Nie ma dotychczas jasnej odpowiedzi na pytanie, czy glikozylacja wpływa na funkcję hemoglobiny. Mc Donald i wsp. [41] wykazali, że krzywa nasycenia tlenem glikozylowanej hemoglobiny różni się od analogicznej krzywej sporządzonej dla hemoglobiny niezmodyfikowanej. Glikozylowana hemoglobina charakteryzuje się również obniżoną wrażliwością na efekt allosteryczny organicznych estrów fosforanu. Wynika to z faktu, że aminowe grupy końcowej reszty waliny łańcuchów β mogą wiązać 2,3-difosfoglicerynian będący regulatorem powinowactwa hemoglobiny w stosunku do tlenu [42]. Pomimo to, krzywa nasycenia tlenem krwi chorych na cukrzycę nie różni się od analogicznej krzywej wyznaczonej dla ludzi zdrowych [43].

IV-2. Białka surowicy

Większość białek surowicy człowieka cechuje okres połowicznego trwania w krwiobiegu od kilku do kilkunastu dni, zatem białka te mogą ulegać glikozylacji nieenzymatycznej *in vivo*. Jak wykazano [10, 44, 45] glikozylowane białka są istotnie normalnym składnikiem krwi człowieka a ich poziom wzrasta w cukrzycy proporcjonalnie do stopnia hiperglikemii. Glikozylacji nieenzymatycznej ulegają *in vitro* wszystkie białka surowicy [48] w tym także insulina [49]. Tak zmodyfikowana insulina ma mniejszą aktywność biologiczną (słabiej stymuluje glikolizę, lipogenezę i antylipolizę) w izolowanych adipocytach szczura.

Okres półtrwania białek surowicy w krążeniu jest krótszy niż hemoglobiny i wynosi około 2 tygodni. Jeżeli więc stężenie glukozy we krwi zmienia się to zmiany w stopniu glikozylacji białek surowicy zachodzą znacznie szybciej niż w przypadku hemoglobiny. Dlatego też pomiar poziomu glikozylowanej albuminy lub wszystkich glikozylowanych białek surowicy dostarcza informacji na temat stopnia wyrównania metabolizmu cukrów w znacznie krótszym okresie. Ma to znaczenie w diagnostyce cukrzycy.

Nieenzymatyczna glikozylacja albuminy, która wywiera wpływ na jej konformację i funkcję [50], może też — jak wykazali Williams i wsp. [51] mieć znaczenie w rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej.

Glikozylacji nieenzymatycznej ulegają również u chorych na cukrzycę lipoproteiny o niskiej gęstości [52, 53]. Glikozylacja lipoprotein o niskiej gęstości znacznie obniża ich pobieranie i degradację przez komórki endotelialne ścian naczyń krwionośnych [54], co może się przyczyniać do rozwoju arteriosklerozy u chorych na cukrzycę.

IV-3. Inne białka glikozylowane

Zarówno u chorych na cukrzycę jak i zwierząt z cukrzycą doświadczalną obserwuje się wzrost glikozylacji białek błon podstawnych nerek, aorty i oka [6, 55—58]. Glikozylacji ulegają najprawdopodobniej ϵ -aminowe grupy lizyny i hydroksylizyny kolagenu. Nie jest wykluczone, że wolne grupy aminowe tzw. białek niekolagenowych mogą też ulegać glikozylacji nieenzymatycznej. Istniejące doniesienia wskazują, że stan hiperglikemii cukrzycowej poprzez glikozylację nieenzymatyczną białek błon podstawnych zmienia własności fizykochemiczne tych białek co w konsekwencji może doprowadzić do zmian patologicznych. Glikozylacja ϵ -aminowych grup lizyny i hydroksylizyny zmienia elektrochemiczne własności białek strukturalnych błon podstawnych. Zmiany te mogą zaburzyć molekularną lub elektryczną integralność kapilarnej bariery filtracyjnej, co prowadzi do zwiększonej przepuszczalności mikronaczyniowej. Błony podstawne mają powolny obrót biologiczny i dlatego mogą ulegać postępującej glikozylacji przez kilka tygodni. W wyniku pojawiają się zaburzenia normalnej degradacji składników błon, co prowadzi do nagromadzenia tych związków w błonach podstawnych u chorych na cukrzycę.

Glikozylacja nieenzymatyczna kolagenu skóry i ścięgien [59—62] powoduje wzrost ilości glikozylowanego kolagenu u osobników starszych a także u chorych na cukrzycę lub u zwierząt z cukrzycą doświadczalną. Glikozylowany kolagen staje się bardziej nierozpuszczalny i oporny na trawienie proteolityczne, przypuszczalnie na skutek tworzenia się wiązań krzyżowych pomiędzy produktami powstającymi w procesie glikozylacji nieenzymatycznej. Przypuszcza się, że jest to ogólniejszy mechanizm patofizjologiczny odpowiedzialny za odkładanie się wielu innych białek jak np. białek błon podstawnych [58] i fibryny [46] w tkankach chorych na cukrzycę.

Glikozylacji nieenzymatycznej mogą również ulegać białka błon erytrocytów [63, 64]. Białka te u osób chorych na cukrzycę przyłączają 2—3 razy więcej glukozy niż analogiczne białka osób zdrowych. Po rozdzielach elektroforetycznych białek błon erytrocytów, glikozylowanych *in vitro*, stwierdzono, że radioaktywność pochodząca od znakowanej glukozy roz-

mieszczona jest równomiernie, co wskazuje, że glikozylacja nieenzymatyczna białek błon erytrocytów nie jest selektywna. Nie stwierdzono czy glikozylacja nieenzymatyczna białek błon erytrocytów wywiera wpływ na ich własności fizjologiczne. Wykazano jedynie, że erytrocyty zawierające glikozylowane białka, a więc pochodzące od osób chorych na cukrzycę, są mniej elastyczne i bardziej zdeformowane morfologicznie niż erytrocyty osób zdrowych [7].

Innym białkiem, które może być glikozylowane jest krystalina soczewki oka [6, 65, 66]. Jej modyfikacja polega na przyłączeniu glukozy lub glukozy-6-fosforanu do ϵ -aminowych grup lizyny, co może powodować zmiany konformacyjne ułatwiające tworzenie wiązań dwusiarczkowych w obrębie krystaliny. Zwiększa to pochłanianie światła i tworzenie wielkocząsteczkowych agregatów krystaliny. Najprawdopodobniej powyższy mechanizm doprowadza do wytworzenia katarakty cukrzycowej.

Większość enzymów posiada stosunkowo krótki okres półtrwania, dlatego glikozylacja nieenzymatyczna tych białek zachodzi w słabym stopniu. Jednakże pierwszy etap glikozylacji prowadzący do wytworzenia produktu typu zasady Schiffa przebiega szybko w warunkach fizjologicznych. Wzrost ilości tego produktu może więc zmieniać własności katalityczne niektórych enzymów. Stwierdzono na przykład glikozylację nieenzymatyczną katepsyny B *in vitro* [67]. Katepsyna B uczestniczy w przekształcaniu proinsuliny w insulinę. Proces ten przebiega znacznie wolniej przy udziale glikozylowanego enzymu. Charakter wiązania glukozy w katepsynie B jest niezupełnie poznany, przypuszcza się jednak, że przynajmniej część glukozy związana jest wiązaniem ketoaminowym. Osłabienie funkcji katepsyny B glikozylowanej, może być spowodowane interakcją cząsteczek glukozy z resztami lizyny obok centrum aktywnego, a może polegać na wytworzeniu sterycznej lub elektrostatycznej przeszkody w działaniu tego enzymu. Obniżenie ilości czynnej insuliny u chorych na cukrzycę typu I, może między innymi wynikać ze zmniejszonej aktywności glikozylowanej katepsyny B.

Glikozylacji nieenzymatycznej *in vitro* ulega również ferrytyna [68]. Reakcja ta może tłumaczyć obserwowane różnice w składzie cukrowym ferrytyny oraz występowanie tzw. izoferrytyny. Jak wiadomo skład łańcuchów heterosacharydowych glikoprotein odgrywa zasadniczą rolę w ich katabolizmie. Niemniej w przypadku ferrytyny glikozylacja nie wpływa na okres jej biologicznego półtrwania, ani nie zmienia niektórych jej własności.

Mielinowe osłonki ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego mogą również ulegać glikozylacji nieenzymatycznej [69]. U zwierząt z cukrzycą doświadczalną stwierdzono ponad dwukrotnie wyższy poziom nieenzymatycznie związanej glukozy z mieliną, niż u zwierząt kontrolnych. Głównym składnikiem osłonki mielinowej jest białko nazwane białkiem P₀ i ono też, jak wykazały rozdziały elektroforetyczne jest najintensywniej glikozylowa-

wane. Wydaje się, że glikozylacja białek mieliny może powodować funkcjonalne zmiany w neuronach, a tym samym przyczyniać się do powstawania neuropatii cukrzycowej.

V. Uwagi końcowe

Wiele danych wydaje się świadczyć o tym, że raczej hiperglikemia niż niedobór insuliny jest czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju komplikacji cukrzycowych. Mechanizmy powstawania tych komplikacji są jak dotychczas mało poznane. Badania ostatnich lat przedstawione powyżej wykazały, że wiele białek ulega glikozylacji nieenzymatycznej zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Proces ten może być przyczyną zmian w strukturze i funkcji glikozylowanych białek co w konsekwencji prowadzi do rozwoju komplikacji cukrzycowych. Główne efekty biologiczne nadmiernej glikozylacji białek dotyczą między innymi: inaktywacji enzymów, hamowania wiązania cząsteczek regulatorowych, wytwarzania wiązań krzyżowych pomiędzy glikozylowanymi białkami, obniżonej wrażliwości na proteolizę, zmian w rozróżnianiu i endocytozie białek [47]. Udział reakcji Maillarda w powstawaniu pewnych komplikacji cukrzycowych wydaje się już obecnie bezsporny, jak np. w tworzeniu katarakty u chorych na cukrzycę [6], czy zmian w błonach podstawnych nerek [70]. Ciekawe wydaje się również stwierdzenie podwyższonej glikozylacji błon podstawowych nerek i oka [57], nie tylko u chorych na cukrzycę, ale również w procesie starzenia się organizmu.

Nasilenie rozwoju wtórnych komplikacji u chorych na cukrzycę zależy między innymi od stopnia wyrównania metabolizmu cukrów, dlatego dobór właściwych metod kontroli metabolizmu jest bardzo ważnym problemem w leczeniu cukrzycy. Wydaje się, iż takim dobrym wskaźnikiem odzwierciedlającym średni poziom glukozy w dłuższym okresie jest poziom glikozylowanej hemoglobiny. Ze względu na prostotę i taniść można polecić metodę kolorymetryczną z kwasem tiobarbiturowym do oznaczania glikozylowanej hemoglobiny. Ponieważ jednak okres biologicznego półtrwania hemoglobiny jest stosunkowo długi, nawet po zastosowaniu zadowalającego leczenia, przez okres kilku tygodni utrzymuje się podwyższony poziom HbA_{1c}. Z tego powodu lepszym wskaźnikiem skuteczności wprowadzonej terapii może być poziom glikozylowanych białek osocza lub tylko albuminy. Zastosowanie testu Glyco-Gel umożliwia wykonywanie rutynowych oznaczeń glikozylowanych białek surowicy w laboratoriach klinicznych.

Praca finansowana przez PAN w ramach problemu MR II 1.2.2

Zaakceptowano do druku 10 maja 1985 r.

PISMIENICTWO

1. Sharon N., Lis H., (1982), w: The Proteins, red. Neurath H., Hill R. L., V, str. 1—144, Academic Press, New York.
2. Thorpe S. R., Baynes J. W., (1982), w: The Glycoconjugates, red. Horowitz M. I., III, str. 113—132, Academic Press, New York.
3. Trivelli L. A., Ranney H. M., Lai H. T., (1971), *N. Engl. J. Med.*, **284**, 353—357.
4. Bunn H. F., Gabbay K. H., Gallop P. M., (1978), *Science*, **200**, 21—27.
5. Dolhofer R., Wieland O. H., (1979), *FEBS Lett.*, **103**, 282—286.
6. Kasai K., Nakamura T., Kase N., Hiraoka T., Suzuki R., Kogure F., Shimoda S., (1983), *Diabetologia*, **25**, 36—38.
7. Lugli R., Mambrini A., Codellupi L., Peduzzi M., Salvioli G., (1983), *IRCS Med. Sci.*, **11**, 793—794.
8. Gottschalk A., (1972), w: The Glycoproteins, red. Gottschalk A. A., str. 141—157, Am. Elsevier, New York.
9. Brownlee M., Vlassara H., Cerami A., (1980), *Diabetes*, **29**, 1044—1047.
10. Kennedy L., Mehl T. D., Riley W. J., Merimee T. J., (1981), *Diabetologia*, **21**, 94—98.
11. Fluckinger R., Winterhalter K. H., (1976), *FEBS Lett.*, **71**, 356—360.
12. Dolhofer R., Wieland O. H., (1980), *Diabetes*, **29**, 417—422.
13. Kennedy L., Mehl T. D., Merimee T. J., (1980), *Diabetes*, **29**, 413—415.
14. Dolhofer R., Wieland O. H., (1981), *Clin. Chim. Acta*, **112**, 197—204.
15. Gabbay J. M., Sosenko J. M., Banuchi G. A., Mininsohn M. J., Fluckinger R., (1979), *Diabetes*, **28**, 337—340.
16. Abraham E. C., Huff T. A., Cope N. D., (1978), *Diabetes*, **27**, 931—935.
17. Schifreen R. S., Hickingbotham J. M., Bowers G. N., (1980), *Clin. Chim. Acta*, **26**, 466—472.
18. Hall P. M., Cook J. G. H., Gould B. J., (1983), *Ann. Clin. Biochem.*, **20**, 129—135.
19. Gould B. J., Hall P. M., Cook J. G. H., (1984), *Ann. Clin. Biochem.*, **21**, 16—21.
20. Menard L., Dempsey M. E., Blankstein L. A., Aleyassine H., Wacks M., Soeldner J. S., (1980), *Clin. Chem.*, **26**, 1598—1602.
21. Thornton W. E., Schellekens A. P. M., Sanders G. T. B., (1981), *Ann. Clin. Biochem.*, **18**, 182—184.
22. Laas T., Olsson I., (1981), *Anal. Biochim.*, **114**, 167—172.
23. Welinder B. S., Svendsen P. A., (1980), *Diabetologia*, **19**, 465—467.
24. Trueb B., Holenstein C. G., Fischer R. W., Winterhalter K. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6717—6720.
25. McDonald M. J., Davis J. E., (1979), *Human Pathol.*, **10**, 279—291.
26. Winterhalter K. H., (1979), *Schweiz. med. Wschr.*, **109**, 1105—1106.
27. Rahbar S., (1981), *Texas Reports on Biology and Medicine*, **40**, 373—385.
28. Bunn H. F., (1981), *Diabetes*, **30**, 613—617.
29. Bunn H. F., Hanney D. N., Gabbay K. H., Gallop P. M., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 103—109.
30. Koenig R. J., Blobstein S. H., Cerami A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2992—2997.
31. McDonald M. J., Shapiro R., Bleichman M., Solway J., Bunn H. F., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2327—2332.
32. Bunn H. F., Shapiro R., McManus H., Garrick L., McDonald M. J., Gallop P. M., Gabbay K. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3892—3898.

33. Fluckinger R., Woodtli T., Berger W., (1984), *Diabetes*, **33**, 73—76.
34. Higgins P. J., Bunn H. F., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5204—5208.
35. Bunn H. F., Hanney D. N., Kanin S., Gabbay K. H., Gallop P. M., (1976), *J. Clin. Invest.*, **57**, 1652—1659.
36. Rahbar S., (1968), *Clin. Chim. Acta*, **22**, 296—298.
37. Bolli G., Campagnucci P., Cartechini M. G., De Feo P., Santusano F., Brunetti P., (1981), *Diabetologia*, **21**, 70—72.
38. Inada M., Oishi M., Nishikawa M., Kurata S., Imura H., (1980), *Endocrinol. Japan.*, **27**, 411—415.
39. Gabbay K. H., Hasty K., Breslow J. L., Ellisan R. C., Bunn H. F., Gallop P. M., (1977), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **44**, 859—864.
40. Shin Y. S., Stern C., Vonrucker A., Endres W., (1984), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **22**, 47—53.
41. McDonald M. J., Bleichman M., Bunn H. F., Noble R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 702—707.
42. Bunn H. F., Brichl R. W., (1970), *J. Clin. Invest.*, **49**, 1088—1091.
43. Ditzel J., Standl E., (1975), *Acta Med. Scand. Suppl.* **578**, 59—68.
44. McFarland F., Catalano E. W., Day J. F., Thorpe S. R., Baynes J. W., (1979), *Diabetes*, **28**, 1011—1013.
45. Day J. F., Ingebretsen C. G., Ingebretsen W. R., Baynes J. W., Thorpe S. R., (1980), *Diabetes*, **29**, 524—527.
46. Brownlee M., Vlassara H., Cerami A., (1983), *Diabetes*, **32**, 680—684.
47. Brownlee M., Vlassara H., Cerami A., (1984), *Ann. Int. Med.*, **101**, 527—537.
48. Turyna B., Wenhryniewicz O., (1983), *Acta Biol. Crac.*, **25**, 51—57.
49. Dolhofer R., Wieland O. H., (1979), *FEBS Lett.*, **100**, 133—136.
50. Shaklai N., Garlick M., Bunn H. F., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3812—3814.
51. Williams S. K., Devenny J. J., Bitensky M. W., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2393—2397.
52. Schleicher E., Deufel T., Wieland O. H., (1981), *FEBS Lett.*, **129**, 1—4.
53. Witztum J. L., Mahoney E. M., Branks M. J., Fisher M., Elam R., Steinberg D., (1982), *Diabetes*, **31**, 283—291.
54. Lorenzi M., Cagliero E., Markey B., Henriksen T., Witztum J. L., Sampietro T., (1984), *Diabetologia*, **26**, 218—222.
55. Uitto J., Perejda A., Grant G. A., Rowold E. A., Kilo Ch., Williamson J. R., (1982), *Conn. Tiss. Res.*, **10**, 287—296.
56. Cohen M. P., Uridanivia E., Surma M., Ciborowski J., (1981), *Diabetes*, **30**, 367—371.
57. Cohen M. P., Yu-Wu V., (1983), *Experim. Gerontol.*, **18**, 461—469.
58. Rosenberg W., Modrak J. B., Hassing J. M., Al-Turk W. A., Stoks S. G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 498—501.
59. Kohn R. R., Cerami A., Monnier V. M., (1984), *Diabetes*, **33**, 57—59.
60. Schnider S. L., Kohn R. R., (1981), *J. Clin. Invest.*, **67**, 1630—1635.
61. Schnider S. L., Kohn R. R., (1980), *J. Clin. Invest.*, **66**, 1179—1181.
62. Rogozinski S., Blumenfeld O., Seifert S., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **221**, 428—437.
63. Bailey A. J., Robins S. P., Tanner M. J. A., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **434**, 51—57.
64. Miller J. A., Gravallese E., Bunn H. F., (1980), *J. Clin. Invest.*, **65**, 896—901.

65. Stevens V. J., Rouzer C. A., Monnier V. M., Cerami A., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2918—2922.
66. Monnier V. M., Stevens V. J., Cerami A., (1979), *J. Exp. Med.*, **150**, 1098—1107.
67. Coradello H., Pollack A., Pagano M., Leban J., Lubec G. (1981), *IRCS Med. Sci.*, **9**, 766—767.
68. Zaman Z., Verwilghen R. L., (1981), *Biochem. Biophys. Acta*, **699**, 120—124.
69. Vlassara H., Brownlee M., Cerami A., (1983), *Diabetes*, **32**, 670—674.
70. Cohen M. P., Uridanivia E., Surma M., Yu-Wu V., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 765—769.

- 1. ...
- 2. ...
- 3. ...
- 4. ...
- 5. ...
- 6. ...
- 7. ...
- 8. ...
- 9. ...
- 10. ...
- 11. ...
- 12. ...
- 13. ...
- 14. ...
- 15. ...
- 16. ...
- 17. ...
- 18. ...
- 19. ...
- 20. ...
- 21. ...
- 22. ...
- 23. ...
- 24. ...
- 25. ...
- 26. ...
- 27. ...
- 28. ...
- 29. ...
- 30. ...
- 31. ...
- 32. ...
- 33. ...
- 34. ...
- 35. ...
- 36. ...
- 37. ...
- 38. ...
- 39. ...
- 40. ...
- 41. ...
- 42. ...
- 43. ...
- 44. ...
- 45. ...
- 46. ...
- 47. ...
- 48. ...
- 49. ...
- 50. ...

JANUSZ STECZKO *)

Zastosowanie żelazianu potasu jako analogu ortofosforanu w modyfikacji centrów aktywnych białek

Modification of active centers of proteins by potassium ferrate, an analogue of orthophosphate

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Właściwości fizykochemiczne jonu żelazianowego determinujące jego przydatność do badań struktury białek
- III. Zastosowanie żelazianu potasu do selektywnej modyfikacji miejsc interakcji fosfoligand-białko
 - III-1. Inaktywacja fosforylasy b z mięśni króliczych
 - III-2. Wpływ żelazianu na aktywność fosfataz i innych enzymów
- IV. Ocena przydatności żelazianu potasu do swoistej inaktywacji białek
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Physicochemical properties of ferrate ion which determine its use in examination of protein structure
- III. Application of potassium ferrate for selective modification of phospholigand-protein interaction sites
 - III-1. Inactivation of rat muscle phosphorylase b
 - III-2. Effect of ferrate ion on activity of phosphatases and other enzymes
- IV. Validation of potassium ferrate modification as a tool for site specific inactivation of proteins
- V. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: MVH — zredukowana forma dichlorku 1,1'dimetylo-4,4'bipirydyniowego

*) Dr., PAN, Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni, 30-239 Kraków, ul. Niezapominajek 2

I. Wstęp

Specyficzne modyfikacje białek polegają na dodaniu selektywnie działającego związku do czystego białka, albo do rodzimego materiału bogatego w białko [1—7]. Aby modyfikacja w znaczący sposób zmieniła właściwości białka, powinna ona zajść w centrum aktywnym, które stanowi na ogół niewielki tylko fragment cząsteczki białkowej. Rodzaj aminokwasów znajdujących się w centrum aktywnym oraz budowa przestrzenna białka decydują o powinowactwie enzymu do substratu, a więc o jego aktywności katalitycznej. Zmiany jonizacji grup funkcyjnych prowadzą do ustalenia nowego stanu sił przyciągania i odpychania, które utrzymując molekularną niepodzielność wpływają na aktywność biologiczną. Ponieważ modyfikacja centrum aktywnego jest uwarunkowana z jednej strony ogólną strukturą białkową, a z drugiej podatnością indywidualnych grup funkcyjnych na zmiany pod wpływem wprowadzonego czynnika, modyfikacje są niezwykle czułe na warunki, w których się je przeprowadza.

Odmianą podatność grup na modyfikację chemiczną można interpretować rozważając ich położenie i otoczenie w cząsteczce białkowej. W przypadku, gdy użyty do reakcji z białkiem związek jest naturalnym ligandem (substratem lub inhibitorem), względnie jeśli wykazuje duże podobieństwo do naturalnego ligandu, modyfikacja jest uzależniona głównie od struktury poszczególnych białek. Rodzaj i charakter grup uczestniczących w akcie katalitycznym określa wtedy struktura przestrzenna ligandu i centrum aktywnego, a prawdopodobieństwo wchodzenia w reakcję identycznych grup, które występują daleko od obszaru wiążącego, jest praktycznie bardzo małe.

II. Właściwości fizykochemiczne jonu żelazianowego determinujące jego przydatność do badań struktury białek

Żelazian potasu (K_2FeO_4) syntetyzuje się przez utlenienie azotanu żelazowego w alkalicznym roztworze podchlorynu i oczyszcza przez wytrącenie z roztworów wodorotlenku potasowego. Końcowym etapem oczyszczania jest krystalizacja z roztworu alkoholu etylowego stosownie do metody Thompsona i wsp. [8]. Czystość preparatu określa się metodą chromitową [9] i zwykle przy prawidłowej preparatyce wynosi ona 93—97%. Poniżej pH 10 roztwory K_2FeO_4 są niestabilne na skutek szybkiego utleniania wody przez żelazian [10]; z tego powodu rozpuszcza się go w 0,1 mM NaOH o temp. 0°C. Sporządzony roztwór wiruje się przy 17 000×g, aby usunąć ewentualnie śladowe ilości $Fe(OH)_3$. Tak otrzymany roztwór żelazianu potasu jest stabilny w opisanych warunkach przez wiele godzin.

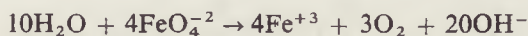
Wiadomo, że dwuujemny anion żelazianowy jest strukturalnie podobny

do jonu fosforanowego. Badania krystalograficzne K_2FeO_4 przeprowadzone przez Audette i wsp. [11] wykazały, że anion żelazianowy ma symetrię czworoscianu o długości wiązań żelazo-tlen 1,65 Å. Jest to wartość zbliżona do długości wiązania fosfor-tlen wynoszącej 1,56 Å [12]. W roztworach obojętnych oba jony są ujemnie naładowane. W przypadku ortofosforanu dominującą formą w obojętnym pH są $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-} . Ponieważ stała równowagi dla reakcji $HFeO_4^- \rightleftharpoons H^+ + FeO_4^{2-}$ nie była publikowana, można tylko przypuszczać, że pK_a $HFeO_4^-$ ma wartość około 7, ponieważ inne pojedynczo naładowane uprotonowane oksyaniony o podobnej wielkości i strukturze przestrzennej posiadają wartości pK_a bliskie 7. Przykładami takich jonów są: $HCrO_4^-$ (6,5), $H_2AsO_4^-$ (6,77), $H_2PO_4^-$ (7,2), $H_2VO_4^-$ (8,2). Goff i Murmann [10] wykazali, że stała szybkości pierwszego rzędu dla reakcji utleniania wody przez żelazian wzrasta z obniżeniem pH. Sugeruje to, że $HFeO_4^-$ może być formą odpowiedzialną za utlenianie wody. Dane te uzupełniają nieopublikowane rezultaty Lee i Beniseka, którzy podają wartość pK_a $HFeO_4^-$ jako równą 6,60. Można więc przypuszczać, że jon żelazianowy przejawia właściwości kwasowo-zasadowe podobne do jonu fosforanowego.

Istotna różnica pomiędzy jonem fosforanowym i żelazianowym polega na tym, że ten ostatni posiada silne właściwości utleniające. Potencjał oksydacyjno-redukcyjny K_2FeO_4 wynosi +2,20 V w kwaśnym środowisku i +0,72 V w środowisku zasadowym [13]. Mellor [14] wymienia wiele związków organicznych utlenianych przez żelazian. Nowsze badania [15–18] wykazały możliwość utlenienia żelazianem alkoholi i amin do odpowiednich aldehydów i ketonów.

Opisane wyżej właściwości żelazianu pozwalają przypuszczać, że może on reagować z resztami aminokwasowymi białek, zawierających w łańcuchach bocznych grupy podatne na utlenienie. Należą do nich reszty tyrozyny, seryny, treoniny, histydyny, tryptofanu, metioniny, lizyny, cysteiny i prawdopodobnie cystyny. Reakcje żelazianu z modelowymi związkami p-krezolem i amidem N-acetylo-tyrozyny [19] oraz reakcje pochodnych lizyny, histydyny i tyrozyny z zablokowanymi grupami karboksylowymi i α -aminowymi potwierdzają taką hipotezę.

Jak wspomniano powyżej, potencjał oksydacyjny K_2FeO_4 wzrasta wraz z obniżeniem pH [13], co w konsekwencji prowadzi do redukcji żelazianu przez wodę w bardziej kwaśnych roztworach z wydzielaniem tlenu cząsteczkowego [10]. Równanie, które opisuje stechiometrię utleniania wody ma postać:



Chociaż mechanizm tej reakcji nie jest znany, nie można wykluczyć tworzenia w tym procesie nietrwałych związków o silnych własnościach utleniających, takich jak rodniki hydroksylowe i nadtlenuk wodoru. Możliwość ich udziału w procesie inaktywacji enzymów była przebadana przez

Lee i Beniseka [19] na przykładzie fosforylasy *b*. W badaniach szybkości procesu inaktywacji używano benzoesu sodu, który jest znanym związkami wiążącym $\cdot\text{OH}$. Zaobserwowano wprawdzie mały efekt hamowania inaktywacji w obecności benzoesu, ale jest to raczej spowodowane zmianą siły jonowej, ponieważ analogiczny efekt obserwowano w przypadku octanu, chociaż stała szybkości reakcji octanu z $\cdot\text{OH}$ wynosi $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [20], a reakcji rodników hydroksylowych z benzoesanem $6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [21]. Adenina, która również usuwa $\cdot\text{OH}$ ($k = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [22] w ogóle nie chroni fosforylasy *b* przed inaktywacją wywołaną żelazianem potasu, co wskazuje na brak udziału $\cdot\text{OH}$ w modyfikacji enzymu. Nadtlenek wodoru jest również niewydajnym inaktywatorem fosforylasy *b*; 10^{-2} M roztwór H_2O_2 powodował tylko 27% obniżenie aktywności enzymatycznej. Ponieważ w większości eksperymentów stężenie żelazianu wynosiło $10 \mu\text{M}$, więc H_2O_2 tworzony w czasie utlenienia wody przez żelazian nie może być odpowiedzialny za obserwowaną inaktywację. Jest to zgodne z wynikami R a j a b a b u i A x e l r o d a [23] dotyczącymi inaktywującego wpływu żelazianu na aktywność kwaśnej fosfatazy z prostaty. Maksimum inaktywacji obserwowano w zakresie pH od 5,0 do 6,0, podczas gdy przy pH 3,5 obserwowano tylko niewielki spadek aktywności enzymu. Brak inaktywacji przy pH 3,5 był przypuszczalnie spowodowany szybką redukcją żelazianu przez solvent, a ewentualnie powstałe pośrednie nietrwałe połączenia nie powodują zmian w cząsteczce enzymu.

Wykazano również, że produkty redukcji żelazianu (koloidalny $\text{Fe}(\text{OH})_3$, Fe^{+++} , Fe^{++}) w stężeniach w jakich występują w roztworach białek po modyfikacji, nie wpływają na ich inaktywację.

III. Zastosowanie żelazianu potasu do selektywnej modyfikacji miejsc interakcji fosfoligand — białko

Strukturalne, elektrostatyczne i kwasowo zasadowe właściwości żelazianu i fosforanu oraz reaktywność żelazianu w stosunku do aktywnych grup obecnych w łańcuchu polipeptydowym, są przyczyną zainteresowania tym związkiem jako reagentem do selektywnego znakowania miejsc wiążących reszty fosforanowe w białkach.

III-1. Inaktywacja fosforylasy *b* z mięśni króliczych

Fosforylaza *b* jest jednym z białek, w którym miejsca wiązania grup fosforanowych odgrywają szczególnie istotną rolę. W cząsteczce enzymu występują trzy takie miejsca o różnych zdolnościach niekowalencyjnego wiązania fosforanu lub monoestrufosforanu: centrum aktywne, które wiąże substraty, tj. ortofosforan i glukozo-1-fosforan, aktywujące miejsce

wiążące 5'AMP i spokrewnione związki, oraz inhibitorowe centrum allosteryczne, gdzie wiąże się glukozo-6-fosforan.

W obecności żelazianu, fosforylaza *b* ulega postępującej inaktywacji wraz ze wzrostem stężenia K_2FeO_4 [19]. Przy stosunku molowym żelazianu do enzymu ~ 14 obserwowano tylko ślady aktywności. Ponieważ K_2FeO_4 może również reagować z wodą lub buforem, nie jest możliwe podanie prawdziwej stechiometrii reakcji w zastosowanych warunkach doświadczalnych. Reakcja żelazianu z białkiem jest niesłychanie szybka, co utrudnia mierzenie kinetyki inaktywacji enzymów przez K_2FeO_4 . Nawet znaczne obniżenie stężenia reagentów i prowadzenie reakcji w $0^\circ C$ nie wydłuża czasu reakcji ponad 10 s. Udało się jednak w doświadczeniach kinetycznych wykazać, że szybkość inaktywacji fosforylasy *b* jest znacznie zmniejszona w obecności pewnych ligandów wiążących się w miejscu przyłączenia 5'AMP. Najlepszą ochronę powodują związki zawierające grupę fosforanową, jak np. 5'AMP, 2'AMP, 5'IMP lub 3'AMP. Adenina zwiększała nieznacznie szybkość inaktywacji, podczas gdy adenozyne wykazywała minimalny efekt ochraniający.

Badania fizykochemiczne fosforylasy *b* wykazały, że inaktywacja żelazianem nie jest spowodowana przez nieodwracalną dysocjację aktywnej formy dimerycznej do nieaktywnej podjednostki monomerycznej, lub agregacją dimeru (pomiaru stałych sedymentacji). Okazało się natomiast, że utrata aktywności enzymatycznej jest wynikiem zmian w składzie aminokwasowym zmodyfikowanego enzymu. Lee i Benisek [19] wykazali utlenienie 1-2 reszt tyrozynowych i 1 reszty cysteiny przypadających na monomeryczną podjednostkę w buforze kakodylowym. W buforze glicerofosforanowym, w którym należało użyć wyższego stężenia żelazianu, aby osiągnąć ten sam stopień inaktywacji, następuje zwiększone utlenienie reszt cysteinowych i zniszczenie reszt tryptofanowych. Może to być wynikiem ubocznych reakcji, które zachodzą przy wyższych stężeniach K_2FeO_4 w tym buforze. Możliwość udziału grup sulfhydrylowych w procesie inaktywacji wykluczono w doświadczeniu, w którym zastosowano 5'AMP jako czynnik ochronny. W obecności 1 mM stężenia tego nukleotydu zaobserwowano brak utlenienia reszt tyrozynowych w obydwu buforach przy niezmiennym tworzeniu cząsteczek kwasu cysteinowego. Dane te wskazują, że modyfikacja reszt(y) tyrozynowych jest przyczyną inaktywacji.

Przedstawione rezultaty wskazują, że żelazian prawdopodobnie inaktywuje fosforylazę *b* nie w centrum aktywnym lecz w miejscu wiązania 5'AMP z następujących powodów:

1. 5'AMP chroni enzym przed inaktywacją. Ponieważ działanie 5'AMP polega na zwiększaniu powinowactwa miejsca katalitycznego do glukozo-1-fosforanu i ortofosforanu [24] należało się spodziewać, że gdyby reakcja zachodziła w pobliżu centrum aktywnego, to inaktywacja powinna być raczej przyspieszona w obecności 5'AMP a nie hamowana. Nie jest prawdo-

podobne, że 5'AMP działa poprzez zmiany konformacyjne przekształcające miejsce katalityczne ze stanu aktywnego na nieaktywny w stosunku do żelazianu, ponieważ równie skuteczna ochrona była możliwa przy użyciu nukleotydów 2'AMP i 3'AMP, które wiążą się w tym samym miejscu co 5'AMP, ale nie indukują zmian konformacyjnych prowadzących do aktywacji enzymu [25-27].

2. Działanie żelazianu znacznie obniża zdolność wiązania 5'AMP przez enzym.

3. Zinaktywowany enzym jest częściowo rekatywowany przez kinazę fosforylasy *b* i ATP.

4. Inaktywacja fosforylasy *b* jest spowodowana utlenianiem reszt(y) tyrozyny. Anderson i wsp. [28] wykazali, że 8-[*m*-*m*-fluorosulfonylobenzamido/-benzylotio]adenina inaktywując częściowo enzym przyłącza się kowalencyjnie do grupy hydroksylowej tyrozyny w pobliżu miejsca 5'AMP. Również Caccace i wsp. [29] obserwowali inaktywację fosforylasy *b* połączoną z acetylacją reszt tyrozynowych przy pomocy *N*-acetyloimidazolu. 5'AMP chronił dwie z tych reszt przed acetylacją i znacznie redukował szybkość inaktywacji. Z kolei Prisco i wsp. [30] przeprowadzili inaktywację enzymu tetranitrometanem nitrując dwie reszty tyrozyny, z których jedna podlegała ochronnemu działaniu 5'AMP.

Aby zidentyfikować modyfikowaną przez żelazian resztę tyrozyny, Lee i Benisek podjęli badania sekwencji aminokwasowej fragmentów łańcuchów fosforylasy *b* [31]. Porównanie mapy peptydów otrzymanych w wyniku karboksylacji i trypsynolizy natywnej fosforylasy *b* i po działaniu żelazianem pozwoliły w tym ostatnim przypadku wykryć dwie dodatkowe plamy. Jeden z „dodatkowych” peptydów zawierał resztę kwasu cysteinowego i nie był dokładniej analizowany z powodu braku ochronnego wpływu 5'AMP na modyfikację cysteiny. Drugi „dodatkowy” peptyd składał się z następujących aminokwasów: Asp₁Thr₁Glu₃Pro₁Tyr₁His₁Lys₂. Analiza sekwencyjna wykazała, że jest to pochodna peptydu-70...80-, a modyfikacja dotyczy tyrozyny 75.

Titani i wsp. [32] wykazali kowalencyjne wiązanie 8-[*m*-*m*-fluorosulfonylobenzamido/benzylotio]adeniny z resztą tyrozyny 155. Być może, więcej niż jedna reszta tyrozyny znajduje się w pobliżu miejsca wiązania 5'AMP. Ponieważ jednak pochodna adeniny nie inaktywuje enzymu nawet w obecności 5'AMP, można przypuszczać, że tyrozyna 155 nie pełni istotnej funkcji w miejscu wiązania aktywatora allosterycznego. Konkluzja, że tyrozyna 75 jest usytuowana w pobliżu miejsca wiązania 5'AMP jest ostatnio potwierdzana przez badania krystalograficzne fosforylasy *a* [33], które wykazują Tyr-75 na długiej helisie (reszty 47-77). Ta część łańcucha tworzy zewnętrzny zrąb „kieszeni”, gdzie AMP i inne aniony, takie jak glukozo-1-fosforan i nieorganiczny fosforan, są wiązane przez resztę argininy.

III-2. Wpływ żelazianu na aktywność fosfataz i innych enzymów

W 1978 roku Rajababu i Axelrod [23] opublikowali wyniki badań inaktywacji fosfataz przez jon żelazianowy. Wszystkie testowane fosfatazy, w tym nieswoiste monoesterazy kwaśne i alkaliczne, jak również swoiste mono- i diesterazy były inaktywowane przez K_2FeO_4 . Jon żelazianowy w zakresie stężeń 1-10 μM powodował szybki nieodwracalny spadek aktywności tych enzymów. Aby zbadać możliwość powinowactwa K_2FeO_4 do centrum aktywnego, przebadano wpływ szeregu kompetycyjnych inhibitorów fosfataz na proces inaktywacji badanych enzymów. Molibdenian, dobrze znany inhibitor wielu kwaśnych fosfataz, w tym kwaśnej fosfatazy z prostaty [34] znacznie obniżał inaktywację tego enzymu w czasie reakcji z żelazianem. K_2FeO_4 o stężeniu 5×10^{-6} M powodował 76% inaktywację, podczas gdy w obecności molibdenianu o tym samym stężeniu osiągnięto zaledwie 28% inaktywację w porównaniu z 17% dla kontrolnej próby zawierającej molibdenian. Podobny wpływ wykazywał L-(+)-winian, stereospecyficzny inhibitor kwaśnej fosfatazy prostatowej [35], jak również wielu innych niespecyficznych kwaśnych fosfataz (Tab. 1). Fosfataza z wątrób króliczych była hamowana w 79% przez $3,8 \times 10^{-6}$ M

Tabela 1

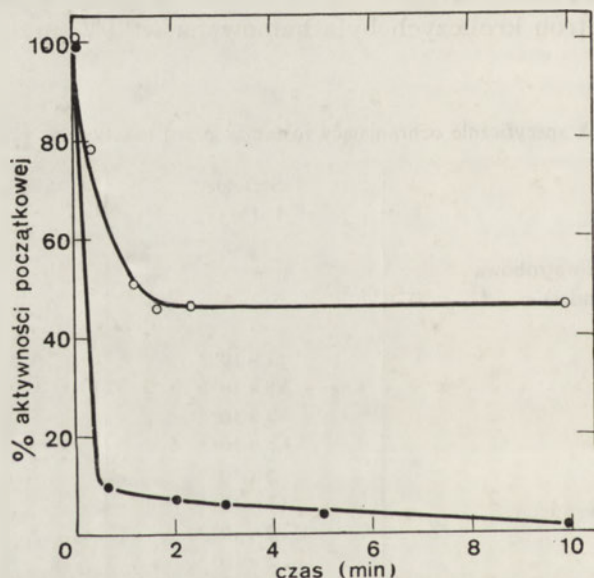
Winian jako czynnik specyficznie ochraniający fosfatazy przed inaktywacją przez żelazian (23)

	Stężenie (M)	Hamowanie %
Królicza fosfataza wątrobowa (Igarashi-Hollander)		
Kontrola		0
L-(+)-winian	1×10^{-4}	4
Żelazian	$3,8 \times 10^{-6}$	79
L-(+)-winian + żelazian	1×10^{-5} $3,8 \times 10^{-6}$	28
L-(+)-winian + żelazian	5×10^{-5} $3,8 \times 10^{-6}$	0
D(-)-winian	2×10^{-4}	0
D(-)-winian + żelazian	2×10^{-4} $3,8 \times 10^{-6}$	71
Fosfataza prostatowa		
Kontrola		0
L-(+)-winian	$4,8 \times 10^{-4}$	27
Żelazian	3×10^{-6}	73
L-(+)-winian + żelazian	4×10^{-4} 3×10^{-6}	29
D(-)-winian	4×10^{-4}	0
D(-)-winian + żelazian	4×10^{-4} 3×10^{-6}	72

Winian był zawsze dodawany przed żelazianem

roztwór żelazianu, a preinkubacja tego enzymu z L-(+)-winianem o tym samym stężeniu powodowała zahamowanie tylko w 28%. Przy wyższych stężeniach inhibitora wpływ ochronny był całkowity. Podobny brak wpływu żelazianu na aktywność obserwowano w przypadku użycia jonów ortofosforanowych. Nie obserwowano żadnego efektu D(-)-winianu na proces hamowania kwaśnej fosfatazy prostatowej i wątrobowej w reakcji z K_2FeO_4 . Powyższe rezultaty wskazują, że w tej grupie enzymów inaktywacja żelazianem powinna dotyczyć miejsca wiązania fosforanu.

Ostrowski i Dziembor-Gryszkiewicz [36] określili wpływ stężenia żelazianu na kinetykę inaktywacji kwaśnej fosfatazy z prostaty (Ryc. 1) oraz na parametry V_{max} i K_m . Wyniki wskazują na nieodwracalne blokowanie centrum aktywnego enzymu przez jon żelazianowy. Autorzy wykazali, że przy pH 7,5 przy stężeniu żelazianu powodującym całkowitą inaktywację enzymu, modyfikacji ulegają 2 reszty histydyny, 4 reszty lizyny i 4 reszty metioniny. Użycie molibdenianu jako czynnika blokującego miejsca aktywne zapobiega utlenieniu reszt histydynowych i częściowo reszt lizyny.



Ryc. 1. Wpływ stężenia K_2FeO_4 na kinetykę inaktywacji kwaśnej fosfatazy z prostaty. Stężenie K_2FeO_4 : (o) 10^{-8} M, (●) 10^{-6} M [36].

W pracy Rajababu i Axelroda [23] omówiono również wpływ K_2FeO_4 na enzymy inne niż fosfatazy. Na przykład katalaza z wątroby wołowej glukozydaza drożdżowa i trypsyna nie traciły aktywności nawet pod wpływem dużych stężeń żelazianu. Lipoksygenaza była nieznacznie inaktywowana. Fosfoglukomutaza i dehydrogenaza alkoholowa wykazywały około 45-cio procentowy spadek aktywności przy stężeniu żelazianu 10^{-5} M. Enzymy te wiążą glukozofosforan i nukleotyd pirymidynowy,

można więc wpływ K_2FeO_4 tłumaczyć reakcją żelazianu w miejscu wiązania ligandów zawierających jon ortofosforanowy [19]. Walker i Axelrod [37] potwierdzili taką możliwość używając K_2FeO_4 do inaktywacji dehydrogenaz, przez modyfikację miejsca wiązania NAD^+ .

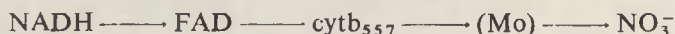
IV. Ocena przydatności żelazianu potasu do swoistej inaktywacji białek

Niedostatkim omówionych powyżej wyników jest ich jakościowy charakter [23, 36, 37]. Nawet w pionierskich, skrupulatnych badaniach Lee i Benisek [19, 31] przyjęcie miejsca wiązania 5'AMP jako punktu geometrycznego ataku żelazianu, zależy od prawdziwości przypuszczenia, że nukleotydy takie jak 2'AMP i 3'AMP nie indukują zmian konformacyjnych w cząsteczce fosforylasy b. Niektóre prace sugerowały brak indukcyjnych przesunięć konformacyjnych pod wpływem wymienionych nukleotydów, w przeciwieństwie do 5'AMP i substratów [25-27]. Pomimo to, bez danych krystalograficznych jest bardzo trudno stanowczo wykluczyć pojawianie się zmian przestrzennych spowodowanych tymi właśnie ligandami. Podobnie w pracy Ostrowskiego i Dziembor-Gryszkiewicz [36] brak informacji o sekwencji i strukturze krystalicznej kwaśnej fosfatazy z prostaty uniemożliwia szerszą interpretację uzyskanych wyników. Znajomość budowy przestrzennej enzymu byłaby tym bardziej wskazana, że reakcje modyfikacji prowadzone były przy dość wysokich wartościach pH, gdy „czas trwania” żelazianu ulega znacznemu wydłużeniu, co może być przyczyną nieswoistych reakcji utleniania.

W dalszych badaniach Steczko i wsp. [38-40] wykazali wysoką selektywność żelazianu w modyfikacjach chemicznych, przeprowadzając reakcje z białkami o dobrze poznanych właściwościach enzymatycznych, sekwencji i strukturze przestrzennej. Porównanie składu aminokwasowego i sekwencji peptydów otrzymanych z badanych białek przed i po utlenieniu żelazianem określiło jednoznacznie pozycję modyfikowanych reszt. Szczegółowo poznana trójwymiarowa struktura tych białek, znajomość sposobu wiązania substratów w centrum aktywnym oraz udziału poszczególnych reszt aminokwasowych w akcie katalitycznym pozwoliły na precyzyjne ustalenie, że miejscem ataku K_2FeO_4 w cząsteczkach badanych łańcuchów polipeptydowych są centra aktywne lub inne funkcyjnie istotne obszary białka.

W przebadanych cząsteczkach białkowych fosfosubstrat spełnia ponadto różną rolę funkcyjno-strukturalną. Działanie rybonukleazy polega na rozrywaniu względnie tworzeniu wiązań diestrowych, co wymaga bliskiego kontaktu reszty fosforanowej z aktywnym centrum enzymu [41]. W przypadku izomerazy triofofosforanowej kataliza polega na odwracalnej izomeryzacji fosfodihydroksyacetonu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Re-

sza fosforanowa w regionie wiążącym ułatwia odpowiednią orientację szkieletu trójwęglowego substratu. Reszta ta jest nieco oddalona od miejsca katalitycznej izomeryzacji węgla karbonylowych [42]. Hemoglobina A w formie nieutlenowanej łączy się odwracalnie z kwasem 2,3-difosfoglicerynowym, co powoduje obniżenie jej powinowactwa do tlenu. Zjawisko to jest użyteczne w regulacji transportu tlenu i jego dystrybucji pomiędzy hemoglobinę matczyną i płodową. Badania modelowe i rentgenowskie [43, 44] wykazały przesunięcia konformacyjne zachodzące w czasie łączenia jednej cząsteczki kwasu 2,3-difosfoglicerynowego z tetramerem hemoglobiny ludzkiej. Stwierdzono oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy ujemnym ładunkiem ligandu i dodatnio naładowanymi resztami dwóch łańcuchów β symetrycznego kompleksu [45]. Reduktaza azotanowa, czwarte przebadane białko enzymatyczne nie ma poznanej sekwencji ani struktury trójwymiarowej. Zainteresowanie tym wieloenzymatycznym układem podjednostkowym, wynikało z łatwości utleniania żelazianem [46], połączonej z kompletną utratą możliwości redukcji jonów azotanowych do azotynowych. Ponieważ przepływ elektronów zachodzi prawdopodobnie według przedstawionego schematu [47]:



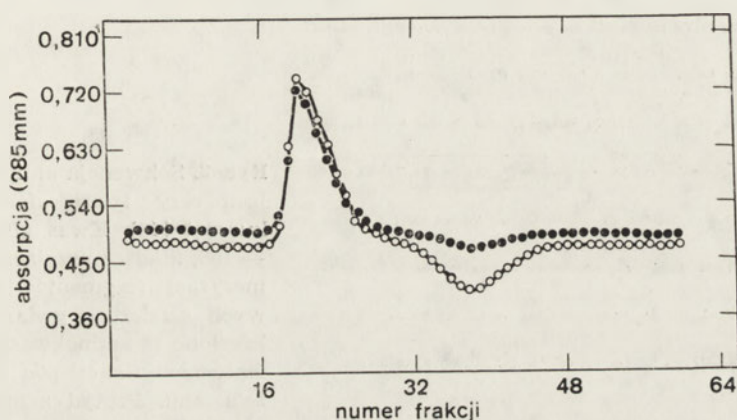
można by podjąć próbę wskazania miejsca przerwania ciągu reakcji oksydoredukcyjnych w wyniku modyfikacji. Jest to możliwe przez badanie aktywności cząsteczkowych reakcji enzymatycznych w kilku miejscach transportu elektronów.

W przypadku badań nad rybonukleazą A analiza sekwencji otrzymanych łańcuchów peptydowych wykazała, że przy pH 5 żelazian modyfikował pojedynczy aminokwas, His-119 [38]. Łącznie z His-12 pełni ona istotną rolę w wiązaniu substratu w centrum katalitycznym. Od dawna dobrze wiadomo, że obydwie reszty histydyny są zlokalizowane blisko siebie w strukturze przestrzennej, ale tylko jedna z nich, His-12 lub His-119, może ulec alkilacji kwasem jodoctowym w cząsteczce enzymu. Ostatnie badania kompleksów rybonukleazy A z analogami substratów przeprowadzone techniką NMR wykazały ścisłe powiązanie pomiędzy uprotonowaną His-119, a fosforanową grupą substratu [48]. His-119 uczestniczy w tworzeniu kowalencyjnych fosforanowych produktów przejściowych podczas procesu katalitycznego. Potwierdzeniem specyficzności reakcji z K_2FeO_4 jest działanie ochronne inhibitorów kompetycyjnych, takich jak orto czy pirofosforan, a zwłaszcza nukleotydu 2'CMP, którego 0,1 mM stężenie chroni całkowicie enzym przed inaktywacją żelazianem (Tab. 2). Efekt działania żelazianu na wiązanie 2'CMP przebadano przy użyciu metody filtracji równowagowej Humela i Dreyera [49]. W zastosowanych warunkach próba kontrolna wiązała 2'CMP, podczas gdy w modyfikowanej żelazianem rybonukleazie A nie wykazano wiązania tego nukleotydu do enzymu (Ryc. 2).

Tabela 2

Ochrona rybonukleazy A przed inaktywacją przez żelazian (38)

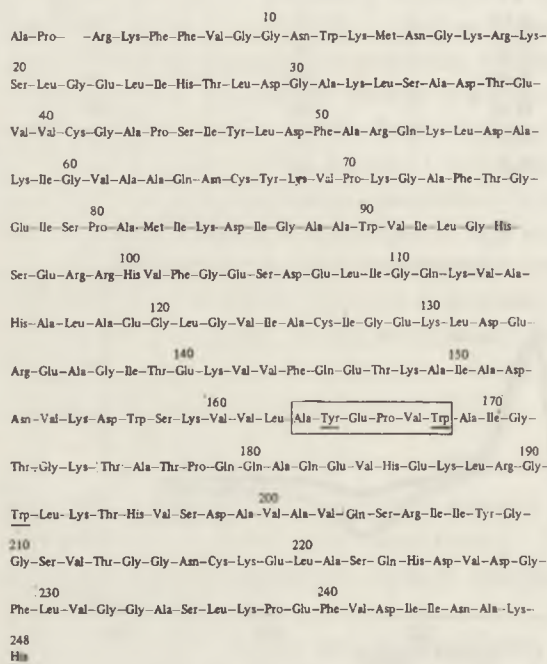
Testowany ligand	Stężenie mM	Ochrona %	Ilość związanego ligandu %
2'CMP	0,10	85	85
2'CMP	0,01	31	35
Pirofosforan	0,40	50	72
Pirofosforan	0,10	28	39
Ortofosforan	40,0	51	83
Ortofosforan	10,0	20	54



Ryc. 2. Wiązanie 2'CMP z rybonukleazą A modyfikowaną żelazianem. Kolumnę z *Sephadex G-25* ($0,5 \times 115$ cm) eluowano 0,1 M buforem octanowym o pH 5,0 zawierającym $90 \mu\text{M}$ 2'CMP aż do stałej wartości absorpcji przy 285 nm. Rybonukleazę A natywną, albo po dodaniu żelazianu (10% aktywności resztkowej) rozpuszczono w $100 \mu\text{l}$ tego samego buforu i nałożono na kolumnę. Natywna rybonukleaza A (○), modyfikowana żelazianem rybonukleaza A (●) [38].

W izomerazie triozofosforanowej utlenieniu pod wpływem żelazianu ulegają cztery aminokwasy [39], z których dwa, Tyr-164 i Trp-168 znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie reszty Glu-165, której nukleofilowa grupa γ -karboksylowa bierze aktywny udział w katalitycznej izomeracji fragmentów trójwęglowych (Ryc. 3). Część łańcucha białkowego 163—168 określana jako peptyd z miejsca aktywnego, ma zachowaną niezmienną w ewolucji sekwencję we wszystkich izomerazach triozofosforanowych otrzymanych z różnych organizmów, takich jak kurczęta, króliki, ryby, drożdże, bakterie i ludzie. Odległość od δ węgla Glu-165 do pierścieni aromatycznych tych dwóch zmodyfikowanych aminokwasów wynosi w badanej izomerazie z kurcząt odpowiednio 8 i $12,4 \text{ \AA}$. Wartości te potwierdzają hipotezę, że jon żelazianowy wykazuje duże powinowactwo do tego

samego miejsca co reszta fosforanowa substratu. Dwa następne modyfikowane aminokwasy Trp-191 i His-248 są zlokalizowane nieco dalej od kwasu glutaminowego — 165. W tym przypadku odległości otrzymane na podstawie analizy komputerowej danych koordynacyjnych dla izomerazy z jonem siarczanowym w miejscu aktywnym, wynoszą odpo-



Ryc. 3. Sekwencja aminokwasowa izomerazy triozofosforanowej z kurczą [42]. Kwas glutaminowy — 165, miejsce przyłączenia i izomerizacji fragmentów trójwęglowych oznaczono gwiazdką. Podkreślone są aminokwasy, które uległy modyfikacji pod działaniem żelazianu. Peptyd z miejsca aktywnego zaznaczono ramką.

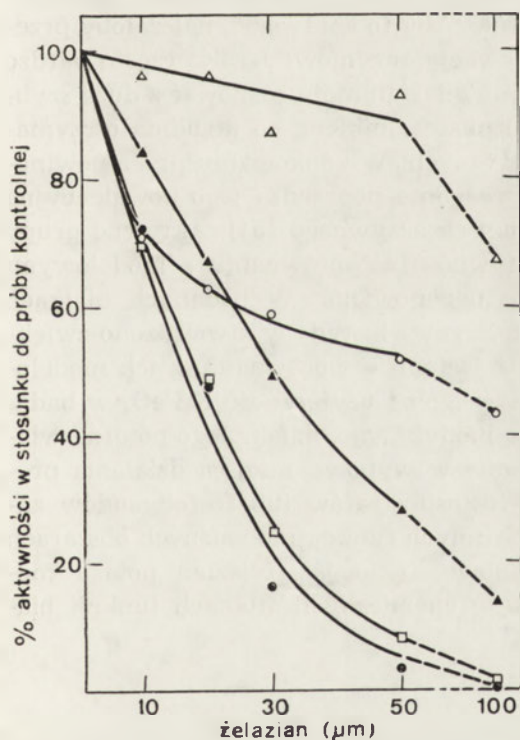
wiednio 18,3 Å i 24,2 Å. Należy zaznaczyć że Trp-191, podobnie jak Tyr-164 i Trp-169, nie jest modyfikowany żelazianem w obecności inhibitorów kompetycyjnych.

W dezoksyhemoglobinie zniszczenie His-2 i His-143 obydwu łańcuchów β zachodzi w miejscu wiązania kwasu 2,3-difosfoglicerynowego [40]. W wiązaniu tego ligandu według Arnone [45] bierze udział dodatkowo Val-1 (β). Trzeba jednak pamiętać, że użyteczność K₂FeO₄, jako sondy miejsc wiązania fosforanu, musi zależeć od obecności reszt podatnych na utlenienie w bezpośrednim otoczeniu wiązania jonu żelazianowego, to znaczy takich jak seryna, treonina, tyrozyna, tryptofan, lizyna, histydyna, metionina, cysteina i cystyna. Z drugiej strony podatne na działanie żelazianu okazały się Tyr-145 (β) i Tyr-42 (α), aminokwasy dezoksyhemoglobiny, które — jak wiadomo na podstawie analizy rentgenowskiej — nie biorą bezpośredniego udziału w wiązaniu reszt fosforanowych estru kwasu glicerynowego. Jest jednak bardzo istotne, że wszystkie modyfikowane grupy są niedostępne dla reakcji z K₂FeO₄ w utlenowanej hemoglobinie lub w dezoksyhemoglobinie w obecności kwasu 2,3-difosfoglicerynowego.

Wydaje się więc, że specyficzne działanie żelazianu mocno zależy od charakterystycznej i wyjątkowej konfiguracji dezoksyhemoglobiny.

Odległość między pierścieniami His-2 (β) i His-143 (β) w leżących naprzeciw siebie łańcuchach β wynosi 9,2 Å. Reszty tyrozyny mogą wiązać grupy fosforanowe poprzez wiązania wodorowe grup fenolowych. Odległość pierścienia Tyr-145 (β_1) od pierścienia His-2 (β_2) wynosi 15,8 Å, ale odległość od pierścienia Tyr-42 (α_2) wynosi tylko 10,8 Å. Przypuszcza się, że obserwowane utlenianie dwóch tyrozyn może być wynikiem tworzenia przez nie wiązań wodorowych z jonem żelazianowym.

Reduktaza azotanowa katalizuje redukcję jonów azotanowych do azotynowych, w dwóch sekwencyjnych procesach cząstkowych. W pierwszym, w którym bierze udział początkowa część łańcucha przenoszenia elektronów, egzogenny cytochrom c lub sześciocyjanożelazian jest redukowany przez NADH. W drugim, azotan jest redukowany do azotynu przez MVH¹ za pośrednictwem końcowej części łańcucha przenośników elektronów, albo też FMNH₂ jest zdolny do redukcji azotanu wykorzystując końcową część łańcucha reakcji [50]. Przeprowadzone eksperymenty wskazują miejsce wiązania NADH jako główny cel ataku żelazianu, ponieważ po modyfikacji żelazianem enzym traci zdolność redukcji cytochromu c przez zredukowaną formę tego nukleotydu (Ryc. 4), jak również redukcji przezeń endogennego cytochromu b [46].



Ryc. 4. Wpływ żelazianu na całkowitą i cząstkową aktywność reduktazy azotanowej z *Chlorella vulgaris* [46]: (●) — reduktazowa aktywność NADH: azotan, (□) — reduktazowa aktywność NADH: cytochrom c, (▲) — reduktazowa aktywność NADH: sześciocyjanożelazian, (○) — reduktazowa aktywność FMNH₂: azotan, (△) — reduktazowa aktywność MVH: azotan.

Rezultaty te zostały potwierdzone przez badanie wpływu nukleotydów pirymidynowych na inaktywację reduktazy azotanowej przez K_2FeO_4 50 μM NADH obniża efektywność działania żelazianu o około 50%. Brak ochronnego wpływu NAD^+ nawet przy wysokich stężeniach wskazuje na specyficzną naturę miejsca wiązania nukleotydu. Nie stwierdzono działania żelazianu wprost na aktywne grupy sulfhydrylowe zlokalizowane blisko obszaru działania NADH.

Przedstawione w tym rozdziale wyniki wskazują na możliwość użycia żelazianu potasu do swoistej modyfikacji białek. Oznacza to, że modyfikacji ulegają enzymy wymagające do swej funkcji jonów fosforanowych lub fosfoligandów wiązanych bądź to w centrum aktywnym, bądź w centrach allosterycznych. Za takim specyficznym charakterem reakcji przemawia wpływ substratów i inhibitorów osłaniających miejsce ataku żelazianu.

V. Uwagi końcowe

Proces inaktywacji można przeprowadzić przy użyciu związku, który ma silne powinowactwo z aktywną przestrzenią białka, chociaż nie jest znacznikiem powinowactwa w dosłownym sensie.

Można sugerować, że żelazian reaguje w sposób podobny do „znakujących przez powinowactwo” reagentów. Aby to sprawdzić, należałoby przebadać efekt jego stężenia na inaktywację enzymów. Jest to często bardzo trudne do przeprowadzenia, ponieważ żelazian może reagować z dużą szybkością zarówno z białkiem jak i rozpuszczalnikiem, co utrudnia otrzymanie miarodajnych rezultatów kinetycznych. W znakowaniu przez powinowactwo niekowalencyjne wiązanie reagenta poprzedza jego kowalencyjną reakcję z grupami funkcyjnymi miejsca aktywnego [51]. Aktywne grupy wykazują wtedy zwiększoną reaktywność w porównaniu z modelowymi związkami zawierającymi te same ugrupowania. W badanych białkach w przypadku tyrozyny, tryptofanu, lizyny i histydyny stwierdzono zwiększoną reaktywność w stosunku do żelazianu w porównaniu z ich modelowymi pochodnymi. Potwierdza to szczególną użyteczność K_2FeO_4 w badaniach, w których stosuje się swoistą modyfikację białek. Jego potężne właściwości utleniające i ukierunkowanie w wyborze miejsca działania predysponują go do badań wiązania fosfosubstratów lub fosfoligandów zarówno w miejscu aktywnym jak i w innych funkcyjnie ważnych obszarach cząsteczki białkowej. Sole żelazianowe, takie jak żelazian potasu mogą mieć szeroki zakres zastosowań w chemicznych studiach funkcji białek.

Zaakceptowano do druku 12 marca 1985 r.

PIŚMIENICTWO

1. Palamarczyk G., Rytka J., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 231—247.
2. Means G. E., Feeney R. E., (1971), *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day Inc., San Francisco, Cambridge, London, Amsterdam.
3. Glazer A. N., DeLange R. J., Sigman D. S., (1975), *Chemical Modification of Proteins. Selected Methods and Analytical Procedures*, red. Work T. S., Burdon R. H., North Holland/American Elsevier Amsterdam.
4. Hirs C. H. W., Timasheff S. N., (1977) w *Methods in Enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N. O., **47**, 407—498, Academic Press, New York.
5. Muszyńska G., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 347—371.
6. Muszyńska G., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 481—493.
7. Feeney R. E., Yamasaki R. B., Geoghegan K. F., (1982), w: *Advances in Chemistry Series*, red. Feeney R. E., Whitaker J. R., **198**, 3—55, American Chemical Society.
8. Thomson G. W., Ockerman L. T., Schreyer J. M., (1951), *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1379—1381.
9. Schreyer J. M., Thompson G. W., Ockerman L. T., (1950), *Anal. Chem.*, **22**, 1426—1427.
10. Goff H., Murmann R. K., (1971), *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 6058—6065.
11. Audette R. J., Quail J. W., Black W. H., Robertson B. E., (1973), *Journal of Solid State Chemistry*, **8**, 43—49.
12. Wells A. F., (1950), *Structural Inorganic Chemistry*, 2 wyd. Oxford Press, London.
13. Wood R. H., (1958), *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2038—2041.
14. Mellor J. W., (1934), w: *A Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry*, **13**, 929—937, Longmans, Green and C., London.
15. Audette R. J., Quail J. W., Smith P. J., (1971), *Tetrahedron Lett.*, 279—282.
16. Audette R. J., Quail J. W., Smith P. J., (1972), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 38—39.
17. BeMiller J. N., Kumari V. G., Darling S. D., (1972), *Tetrahedron Lett.*, 4143—4146.
18. Williams D. H., Riley J. T., (1974), *Inorg. Chim. Acta*, **8**, 177—183.
19. Lee Y. M., Benisek W. F., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1553—1560.
20. Anbar M., Neta P., (1967), *Intern. J. Appl. Rad. Isot.*, **18**, 493—523.
21. Neta P., Dorfman L. M., (1968), w: *Radiation Chemistry*, red. Hart E. J., **81**, 222—230, American Chemical Society, Washington, D. C.
22. Greenstock C. L., Ng M., Hunt J. W., (1968), w: *Radiation Chemistry*, red. Hart E. J., **81**, 397—417, American Chemical Society, Washington, D. C.
23. Rajababu C., Axelrod B., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 31—36.
24. Graves D. J., Wang J. H., (1972), w: *The Enzymes*, red. Boyer P. D., 3 wyd. 435—482, Academic Press, New York.
25. Okazaki T., Nakazawa A., Hayaishi O., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5266—5271.
26. Mott D. M., Bieber A. L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4058—4066.
27. Black W. J., Wang J. H., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 257—268.
28. Anderson R. A., Parrish R. F., Graves D. J., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1901—1906.
29. Cacace M. G., Prisco D. G., Zito R., (1976), *FEBS Lett.*, **62**, 338—341.
30. Prisco D. G., Zito R., Cacace M. G., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 850—854.
31. Lee Y. M., Benisek W. F., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5460—5463.

32. Titani K., Koide A., Hermann J., Ericsson L. H., Kumar S., Wade R. D., Walsh K. A., Neurath H., Fischer E. M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4762—4766.
33. Sygusch J., Madsen N. B., Kasvinsky P. J., Fletterick R. J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**, 4757—4761.
34. Hollander V. P., (1971), w: *The Enzymes*, red. Boyer P. D., **4**, 449—498, Academic Press, New York.
35. Abul-Fadl M. A. M., King E. J., (1949), *Biochem. J.*, **45**, 51—60.
36. Ostrowski W., Dziembor-Gryszkiewicz E., (1980), *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 241—244.
37. Walker D. E., Axelrod B., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 1511.
38. Steczko J., Walker D. E., Hermodson M., Axelrod B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3254—3258.
39. Steczko J., Hermodson M., Axelrod B., Dziembor-Kentzer E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 13148—13154.
40. Steczko J., Axelrod B., Hermodson M., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **232**, 567—601.
41. Richards F. M., Wyckoff H. W., (1971), w: *The Enzymes*, red. Boyer P. D., **4**, 647—806, Academic Press, New York.
42. Banner D. W., Bloomer A. C., Petsko G. A., Phillips D. C., Pogson C. I., Corran P. H., Furth A. J., Milman R. E., Offord R. E., Priddle J. D., Waley S. G., (1975), *Nature (London)*, **255**, 609—614.
43. Perutz M. F., (1970), *Nature (London)*, **228**, 726—734.
44. Perutz M. F., (1970), *Nature (London)*, **228**, 735—739.
45. Arnone A., (1972), *Nature (London)*, **237**, 146—148.
46. Ramadoss C. S., Steczko J., Axelrod B., w przygotowaniu do druku.
47. Howard D. W., Solomonson L. P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 12725—12730.
48. Antonov I. V., Gurevich A. Z., Dudkin S. M., Karpeisky M. Y., Sakharousky V. G., Yakovlev G. I., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 47—54.
49. Hummel J. P., Dreyer W. J., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 530—532.
50. Hewitt E. J., Notton B. A., (1980), w: *Molybdenum and Molybdenum Containing Enzymes*, red. Coughlan M. P., 275—325, Pergamon Press.
51. Singer S. J., *Adv. Prot. Chem.*, (1967), **22**, 1.

NOWE W BIOCHEMII

DANUTA HULANICKA *)

***Anty-sense* RNA, nowy mechanizm regulujący ekspresję genów**

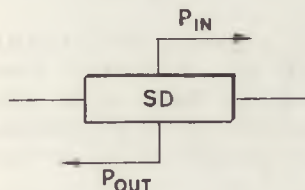
***Anty-sense* RNA, new regulatory mechanism of gene expression**

Znane do tej pory mechanizmy regulujące ekspresję genów sprowadzały się do oddziaływania między białkami a kwasami nukleinowymi. W 1984 roku, ukazały się prace wykazujące, że oddziaływanie między dwiema cząsteczkami RNA może mieć również wpływ na ekspresję genu. Przykładem takiego mechanizmu może być regulacja replikacji plazmidów typu ColE1, gdzie dwie cząsteczki RNA, RNA I i RNA II tworzą hybryd, co uniemożliwia powstanie primera (Tomizawa J., Itoh T., Selzer G., Som T., 1981, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 78, 1421).

Na ogół jednak powstawanie hybrydu z dwu cząsteczek RNA, mRNA, tzw. *anty-sense* RNA o budowie komplementarnej do mRNA, powoduje zahamowanie translacji. *Anty-sense* RNA zwany jest również *mic* RNA; jest to skrót od angielskiego zwrotu *messenger inhibitory complementary RNA*.

Znamy kilka przykładów takiej kontroli ekspresji genów. Jednym z nich jest regulacja ekspresji elementu IS10 kodującego transpozazę, enzymu odpowiedzialnego za transpozycję transpozonu Tn10. Simon R. W., Kleckner N. ([1983] *Cell* 34, 683) stwierdzili, że wprowadzenie plazmidu zawierającego element IS10 do komórki powoduje zmniejszenie częstości przemieszczania się transpozonu w wyniku zahamowania ekspresji elementu IS10.

Autorzy wykazali, że obecność zewnętrznego tylko fragmentu elementu IS10 na plazmidzie wystarczy aby zapobiec transpozycjom Tn10. We fragmencie IS10 bowiem zawarty jest promotor P_{out} , od którego rozpoczyna się transkrypcja w kierunku przeciwnym niż kierunek transkrypcji genu transpozazy (Ryc. 1). Powstające transkrypty z P_{out} i P_{in} mają oczywiście budowę komplementarną i mogą tworzyć hybryd, który zawiera region wiązania rybosomów tzw. sekwencje Shino-Dalgarno. Powstały dupleks utrudnia inicjację translacji.



Ryc. 1. Schemat inicjacji transkrypcji zewnętrznego końca elementu IS10 transpozonu Tn10. IS10 koduje transpozazę. SD — Shino-Dalgarno sekwencje. P_{in} — promotor transpozazy. P_{out} — promotor od którego rozpoczyna się transkrypcja *anty-sense* RNA.

Ten sam mechanizm kontroluje u *E. coli* ekspresję genu *ompF*, kodującego jedno z dwóch głównych białek błon zewnętrznych. (Mizuno T., et al., 1984, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81, 1966). Drugim białkiem jest produkt genu *ompC*. Stężenie

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

tych białek zależy od ciśnienia osmotycznego podłoża, ale ogólna ich ilość jest stała: to znaczy, że kiedy ciśnienie osmotyczne wzrasta, stężenie białka *ompF* spada, a stężenie białka *ompC* rośnie i odwrotnie. Ekspresja białek *ompF* i *ompC* zależy również od operonu *ompB* składającego się z dwóch genów *envZ* i *ompR*. Białko *ompR* pełni rolę aktywatora genów *ompF* i *ompC*. Ostatnio geny te zostały sklonowane, ustalono ich sekwencje. Zauważono, że w DNA przed genem *ompC* występuje region, który ulega transkrypcji w kierunku przeciwnym do kierunku transkrypcji genu *ompC* i tworzy niezależną jednostkę transkrypcyjną. Gen ten nazwano genem *micF*, a jego transkrypt oznaczono jako RNA(*micF*). Transkrypt ten składa się ze 174 par zasad i wykazuje 70% homologii wobec 5' końca mRNA genu *ompF*, który obejmuje sekwencję Shino-Dalgarno. Powstaje hybryd, co uniemożliwia wydajną translację mRNA genu *ompF*.

Ekspresja genu *micF* jest skoordynowana z ekspresją *ompC*. Stwierdzono proporcjonalność transkrypcji genu *micF* i *ompC*, tłumaczy to obserwowaną wcześniej stałość ogólnej sumy ilości białek *ompF* i *ompC*, większa ekspresja genu *ompC* i *micF*, czyli więcej RNA(*micF*) powoduje silniejsze hamowanie ekspresji genu *ompF*.

Należy zaznaczyć, że jak dotąd nie udało się doświadczalnie wykazać hybrydu RNA-RNA. Inouye, pracujący od lat w Stony Brook N.Y. USA, nad białkami błon zewnętrznych *E. coli*, zakłada powstawanie takiego hybrydu na podstawie homologii między 5' końcem mRNA genu *ompF* a RNA(*micF*). Stwierdzono jedynie spadek stężenia białka *ompF*, po wprowadzeniu plazmidu zawierającego gen *micF*. Ponieważ sparowaniu ulegają również zasady w regionie sekwencji Shino-Dalgarno, taki hybryd hamuje prawdopodobnie przyłączanie się rybosomów. Należy również brać pod uwagę możliwość, że powstanie hybrydu może zmniejszyć stabilność mRNA.

Wydaje się, że ten mechanizm może mieć bardziej ogólne znaczenie. Świadczy o tym możliwość regulacji ekspresji genów przy pomocy sztucznych *mic* genów. Wystarczy wyciąć fragment DNA za promotorem dowolnego genu, podłączyć do indukowalnego promotora i wstawić w plazmidowe DNA w odwróconej orientacji. Oczywiście sekwencja zasad wyciętego fragmentu jest komplementarna wobec sekwencji zasad genu z którego został wycięty, a transkrypt może tworzyć dupleks z 5' końcem mRNA. Ilość transkryptu zależeć będzie od stopnia indukcji podłączonego promotora, czyli można będzie dowolnie kontrolować stopień inhibicji ekspresji badanego genu.

Coleman wraz ze wsp. (1984, *Cell* 37, 429) skonstruowali sztuczne geny *mic* blokujące ekspresję genów: *ompA*, *ompC*, *Ipp* i wykazali ich funkcjonowanie, np. wprowadzenie plazmidu zawierającego gen *mic(ompC)* do komórki *E. coli* powodowało obniżenie poziomu białka *ompC* bez wpływu na ilość innych białek błonowych. A zatem powstały *anti-sense* RNA wpływa jedynie na ekspresję komplementarnego mRNA.

Mechanizm ten działa również u eukariontów. Na przykład Weintraun wraz ze wsp. skonstruowali plazmid wytwarzający *anti-sense* RNA komplementarny wobec transkryptu genu kinazy tymidynowej (TK) (1984 *Cell* 36, 1007). Wprowadzenie do komórek mutantu myszy nie wytwarzającej kinazy tymidynowej plazmidu z genem *mic*, wraz z plazmidem produkującym normalną kinazę tymidynową powodowało obniżenie ilości wytwarzanej kinazy.

Konstrukcja takich plazmidów może mieć liczne zastosowania w biologii molekularnej. Jest to bowiem metoda, umożliwiająca wywołanie sztucznej mutacji, a w przypadku genów niezbędnych dla życia (ang. *essential gene*) wywołanie warunkowej letalności. Nasuwa się tu pewna analogia z mutantami temperaturo-wrażliwymi. W przypadku mutantów temperaturo-wrażliwych jednak białko powstaje, ale w restrykcyjnej temperaturze jest nieczynne. W przypadku genu *mic* na plazmidzie

jego indukcja powoduje blokowanie syntezy odpowiedniego białka. Otrzymanie mutacji u eukariontów nieraz stanowi poważny problem, opisana tu metoda umożliwia pokonanie tej bariery. Za wcześnie jest wszakże jeszcze na spekulowanie, czy sztuczne mic geny będą mogły mieć zastosowanie w medycynie np. przez zablokowanie ekspresji genu odpowiedzialnego za transformację.

Zaakceptowano do druku 5 kwietnia 1985 r.

DANUTA HULANICKA *)

Rekombinat RNA i jego replikacja

RNA-recombinant and its replication

Zespół dr Kramera z University Columbia, N.Y., USA ogłosił wyniki (*J. Mol. Biol.* 171, 281, 1983), które mogą mieć zasadnicze znaczenie w dalszych badaniach w zakresie biologii molekularnej. Autorzy opisują metodę syntezy *in vitro* RNA z zastosowaniem replikazy faga Q β . Enzym ten, replikaza Q β , syntetyzuje na matrycy RNA komplementarną nić, która z kolei również może być matrycą. Ponieważ każdy cykl replikacyjny prowadzi do podwojenia matrycy, proces ten określa się jako autokatalityczny.

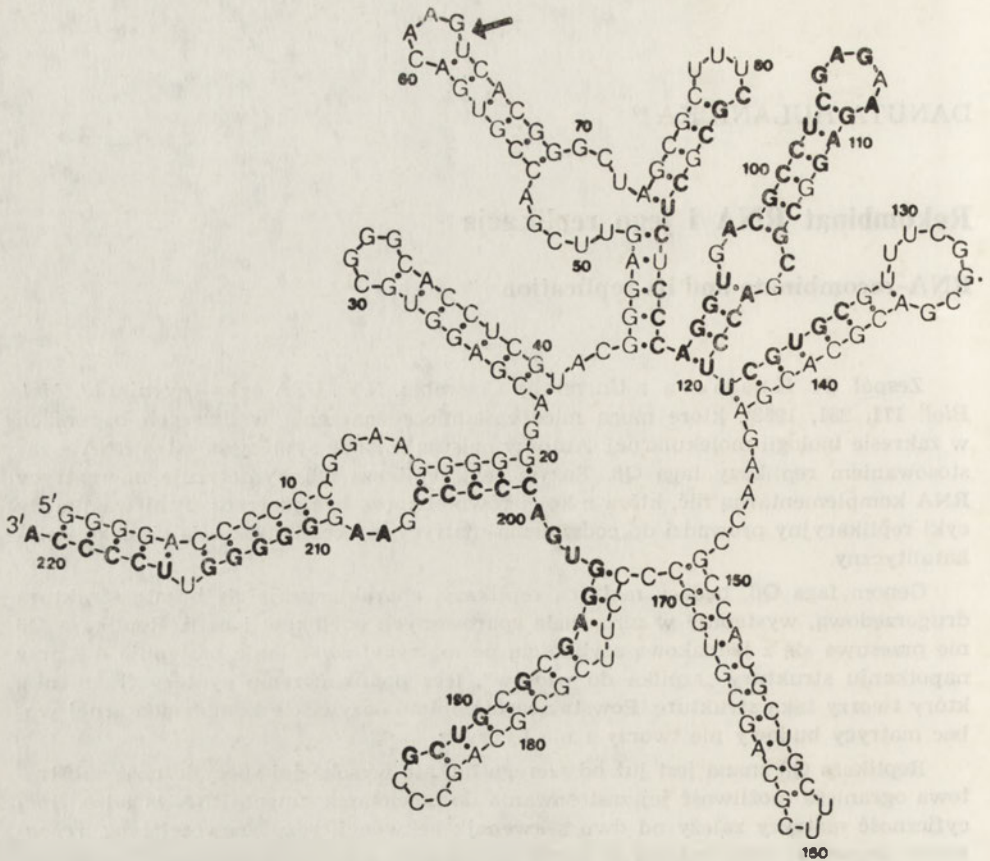
Genom faga Q β , będący matrycą replikazy, charakteryzuje się bogatą strukturą drugorzędową, występuje w nim wiele sparowanych odcinków i pętli. Replikaza Q β nie przesuwa się z jednakową szybkością po matrycy: zwalnianie następuje nie przy napotkaniu struktury „szpilka do włosów”, lecz po ukończeniu syntezy fragmentu, który tworzy taką strukturę. Powstająca nić, mimo oczywiście komplementarnej wobec matrycy budowy nie tworzy z nią hybrydu.

Replikaza Q β znana jest już od szeregu lat, ale wysoka jej specyficzność substratowa ogranicza możliwość jej zastosowania do powielania innych RNA *in vitro*. Specyficzność matrycy zależy od dwu sekwencji: sekwencji rozpoznawczej (ang. *recognition sequence*) oraz bogatej w reszty cytozynowe sekwencji inicjującej (ang. *initiation sequence*). Szereg prób, w których próbowano zmniejszyć specyficzność enzymu, czy to przez dodanie jonu Mn²⁺, czy też przez dodanie fragmentu RNA bogatego w cytozynę, skończyły się niepowodzeniem. Zespół dr Kramera pokonał tę trudność włączając, w syntetyzowane przez replikazę Q β , fragmenty „obce” RNA.

Już wcześniej zauważono, że przechowywanie oczyszczonych preparatów enzymu w warunkach umożliwiających replikazę, ale bez dodania matrycy prowadzi do powstawania mieszaniny krótkich łańcuchów RNA, tzw. wariantów, zawierających od 77 do 222 nukleotydów. Te krótkie łańcuchy powstają prawdopodobnie w wyniku występowania śladowych zanieczyszczeń matrycy replikazy. Właśnie jeden z tych krótkich łańcuchów MDV-1, wybrał zespół dr Kramera do konstrukcji pierwszego rekombinanta RNA. Sekwencje nukleotydów i struktura drugorzędowa MDV-1 była już uprzednio znana. Występują w nim sekwencje wiążące replikazę, a na końcu 3' znajduje się parę reszt cytozynowych, co jest warunkiem inicjowania replikacji (Ryc. 1). Replikacja cząsteczki MDV, podobnie jak genomu faga Q β jest autokatalityczna.

Wybranie odpowiedniego miejsca cięcia i włączenie obcego RNA nie było łatwym zadaniem. Włączenie fragmentu nie powinno być bowiem ani naruszyć sekwencji wiążących ani zmieniać struktury drugorzędowej. Cięcie rybonukleazą T1 wykonano po hybrydyzacji MDV-1 z komplementarnym modyfikowanym cDNA. Modyfikacja

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

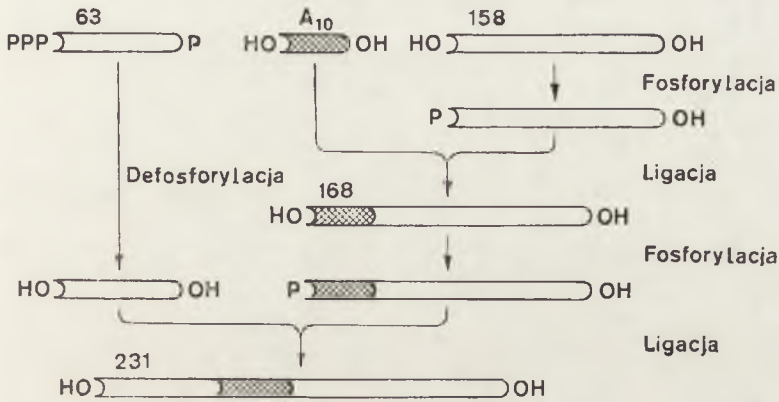


Ryc. 1. Drugorzędowa struktura MDV-1. Strzałka wskazuje miejsca cięcia rybonukleazy T1. Grubszą czcionką zaznaczono homologiczne sekwencje do sekwencji genomu faga Q β , homologia występuje w regionach wiążących replikazę oraz w miejscu inicjacji.

cdNA polegała na usunięciu trzech zasad 62—64 i wstawieniu 8-mio nukleotydowego fragmentu —C—T—C—T—A—G—A—G—. Oczywiście w tym rejonie, z powodu braku homologii nie zachodzi parowanie zasad między cdNA a RNA. Rybonukleaza T1, tnąc tylko pojedynczą nić, rozszczepiała wiązania estrowe między 63 a 64 zasadą, dając dwa fragmenty: 63 i 158 nukleotydowe (Ryc. 2). Otrzymane heterodupleksy DNA—RNA „topiono”, a następnie powstałe fragmenty RNA rozdzielano elektroforetycznie w żelu. Ligaza RNA faga T4 wymaga na końcu 5' grupy PO₄, a fragment 158 nukleotydowy po trawieniu rybonukleazą w tym miejscu posiada OH. Przeprowadzono więc jej fosforylację kinazą, a dopiero następnie ligację z wiązczonym fragmentem.

W pierwszych doświadczeniach dołączono do 158 nukleotydowego fragmentu kwas dodecyloadenyłowy otrzymując fragment 168 nukleotydowy, który po wprowadzeniu grupy fosforanowej na końcu 5', ligowano z fragmentem 63 nukleotydowym. Tak otrzymano pierwszy rekombinat RNA. Warto zaznaczyć, że po każdym etapie sprawdzano sekwencje nukleotydów. Otrzymany rekombinat użyto jako matrycy w procesie replikacji. Replikaza Q β nie zauważyła obecności „obcego” RNA

i kinetyka reakcji była podobna do kinetyki replikacji matrycy MDV-1. Powstałe RNA analizowano elektroforetycznie w żelu i stwierdzono obecność nici (+) i (-), co świadczy o autokatalitycznej replikacji. Liczba cząsteczek RNA wzrastała eksponencjalnie: w ciągu 9 minut następował 300-krotny wzrost.



Ryc. 2. Schemat konstrukcji rekombinanta RNA.

Pomyślnie również zakończyły się próby włączenia do MDV-1 dłuższych fragmentów RNA, jak 210 nukleotydów z adenovirusa czy 120 nukleotydów 5S z *E. coli*.

Autorzy omawiając stosowalność tej metody do syntezy RNA *in vitro*, podkreślają możliwość otrzymania przy jej użyciu pełnej cząsteczki RNA wraz z intronami (ang. *unprocessed gene transcript*). Takie RNA mogłyby być pomocne w badaniach procesu składania RNA (ang. *splicing*). Zastosowanie tej metody może ułatwić także otrzymywanie większych ilości eukariotycznych RNA jako matrycy do syntezy białka.

Fakt natychmiastowego opatentowania metody wskazuje jak wielkie znaczenie autorzy jej przypisują.

Zaakceptowano do druku dnia 5 kwietnia 1985 r.

MINIREVIEW

WANDA SOKÓŁ-MISIAK*

Sekwencje DNA niezbędne dla regulacji transkrypcji przez hormony glukokortykoidowe w komórkach eukariotycznych

DNA sequences involved in the regulation of transcription by glucocorticoid hormones in eukaryotic cells

Hipotetyczny model działania hormonów sterydowych na poziomie transkrypcji — szczegółowo opisany w 1976 r. przez O'Malleya na przykładzie działania progesteronu na transkrypcję genu owalbuminy w komórkach jajowodów kurczęcia — zakłada, że w organizmie eukariontów sygnały hormonalne w komórkach docelowych przekazywane są za pomocą białkowego receptora danego hormonu sterydowego. Receptor ten, po utworzeniu kompleksu z hormonem, wiązany jest w regionie sekwencji promotorowych genu kontrolowanego przez ten hormon, udostępniając je eukariotycznej polimerazie RNA B. To hipotetyczne założenie zostało sformułowane na podstawie modelu Jacoba i Monoda dotyczącego ogólnych zasad regulacji transkrypcji u prokariotów.

Początek lat 80-tych przyniósł niezwykle postęp w badaniach struktury genów eukariotycznych oraz otaczających je sekwencji**. Możliwość wyizolowania i sklonowania genu wraz z otaczającymi go sekwencjami DNA, wycięcia określonych regionów tych sekwencji i sprawdzenie wpływu tej kontrolowanej delecji na transkrypcję badanego genu w układzie bezkomórkowym, a w przypadku niektórych genów (szczególnie retrowirusów) w układzie komórkowym, przyczyniły się do zidentyfikowania niektórych elementów składowych promotorów genów eukariotycznych. Według Chambona i wsp. [1, 2] obecny stan wiedzy pozwala jedynie na zdefiniowanie promotora eukariotycznego jako kompleksu różnych sekwencji DNA, których delecja (lub ściślej mutacja typu *cis*) znosi selektywność inicjacji transkrypcji genu struktury lub obniża wydajność tej transkrypcji. Według Wasyluka i Chambona [1] tak zdefiniowany promotor genów eukariotycznych składa się przynajmniej z czterech elementów, którymi są:

* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-511, Mro-ków

** Zagadnienie to poruszone zostało w *Postęпах Biochemii*: Chorąży M., (1981), 27, 263—266.

Wykaz stosowanych skrótów: A — adenozylna; T — tymidyna; MMTV — wirus guza sutki myszy (ang. *mouse mammary tumor virus*); tk — kinaza tymidynowa; LTR — (ang. *long terminal repeat*) krańcowe odcinki DNA retrowirusów o charakterystycznej dla danego wirusa długości i składzie sekwencji, łączące się z DNA zainfekowanych komórek.

a) sekwencje DNA wokół miejsca startu transkrypcji, które odpowiada pierwszemu nukleotydowi transkryptu (nukleotydy oznaczany liczbą +1, w praktyce odpowiadający pierwszemu nukleotydowi dojrzałego transkryptu z dołączoną czapeczką /ang. *cap*/) delcja tych sekwencji znosi prawidłowy start transkrypcji;

b) sekwencje położone w odległości 26—36 par nukleotydów na lewo od miejsca startu transkrypcji (nukleotydy oznaczane liczbami ujemnymi, poprzedzające miejsce startu), bogate w tymidynę (T) i adeninę (A), zwane *TATA box*, charakterystyczne dla większości genów transkrybowanych przez polimerazę RNA B; delcja tych sekwencji (a niekiedy punktowa mutacja) znosi prawidłowość rozpoznawania miejsca startu transkrypcji przez polimerazę RNA B;

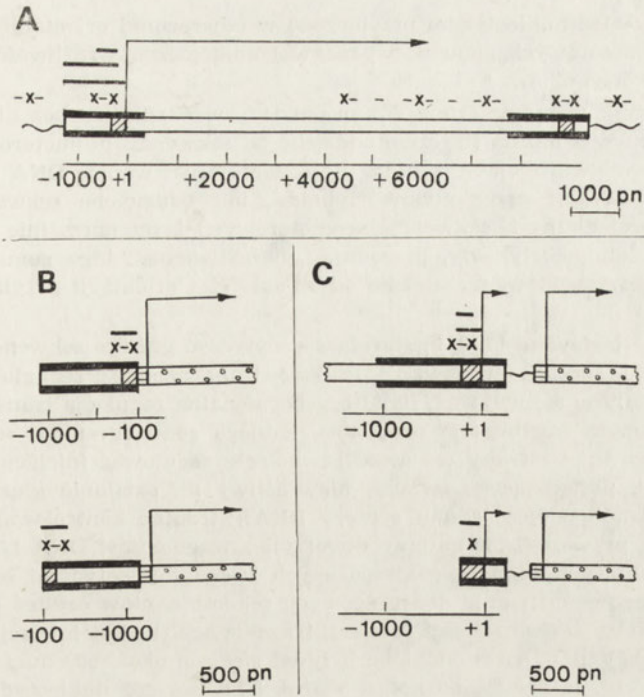
c) sekwencje położone w odległości około 100 par nukleotydów na lewo od miejsca startu transkrypcji; delcje w obrębie tych sekwencji redukują między innymi podstawowy poziom transkrypcji, lecz nie wpływają na prawidłowość rozpoznawania miejsca startu transkrypcji przez polimerazę RNA B;

d) sekwencje położone powyżej 100 par nukleotydów na lewo od miejsca startu transkrypcji; delcje w obrębie tych sekwencji obniżają w warunkach *in vivo* efektywność transkrypcji niektórych genów do poziomu transkrypcji podstawowej; w regionie tym, w przypadku niektórych retrowirusów, występują tak zwane sekwencje wzmacniające (ang. *enhancer sequences*) regulujące wydajność transkrypcji niezależnie od odległości i orientacji tych sekwencji w stosunku do miejsca inicjacji transkrypcji.

Jak wykazano na przykładzie promotora genu konalbuminy [2] proksymalne sekwencje promotorowe (obejmujące *TATA box* i sekwencje wokół miejsca startu transkrypcji) wiążą komórkowe czynniki preinicjacyjne; podkreślić należy, że eukariotyczna polimeraza RNA B nie rozpoznaje prawidłowego miejsca startu transkrypcji bez uprzedniego związania czynników preinicjacyjnych z tym regionem promotora.

W serii świetnych eksperymentów kilka grup badawczych zdołało zlokalizować w genomie wirusa guza sutka myszy (MMTV) regiony DNA wiążące *in vitro* białkowy receptor glukokortykoidów [3, 4, 5, 6] oraz sekwencje DNA w regionie promotora MMTV, których delcja znosi wpływ *in vivo* glukokortykoidów na inicjację transkrypcji DNA MMTV [7, 8, 9, 10]. W badaniach tych zastosowano techniki klonowania i rekombinacji DNA, tworząc z różnych fragmentów DNA MMTV (zawierających lub nie, regiony wiążące *in vitro* receptor) oraz z DNA sekwencji promotorowych i kodujących gen kinazy tymidynowej (*tk*) wirusa opryszczki (genu normalnie nie kontrolowanego przez glukokortykoidy) tak zwane geny-chimery. Te zrekombinowane geny wprowadzano drogą transfekcji do komórek mysich lub szczurzych hodowanych *in vitro* do szczepów nie wytwarzających aktywnej kinazy tymidynowej a posiadających aktywny receptor glukokortykoidów. Transfekowane komórki selekcionowano na odpowiedniej pożywce, w której komórki o nieaktywnej kinazie tymidynowej nie są zdolne do wzrostu; wpływ *in vivo* glukokortykoidów na inicjację transkrypcji genów-chimer określano na podstawie analizy transkryptów izolowanych z transfekowanych komórek hodowanych w obecności lub bez glukokortykoidów.

Sekwencje promotorowe, warunkujące *in vivo* prawidłowość i efektywność inicjacji transkrypcji DNA wirusa MMTV, znajdują się w lewym, końcowym odcinku DNA MMTV, określanym jako LTR (ang. *long terminal repeat*); analogiczne sekwencje znajdują się w prawym LTR [7, 11]; receptor glukokortykoidów wiąże się do lewego [3, 4, 6] i prawego [3, 4, 5] LTR oraz w obrębie [6] i między [4, 6] obydwoma LTR (Ryc. 1 A); delcja sekwencji promotorowych znosi prawidłową inicjację i wpływ glukokortykoidów na transkrypcję DNA MMTV [7].



Ryc. 1. Regiony DNA MMTV wiążące *in vitro* receptor glukokortykoidów oraz warunkujące *in vivo* transkrypcję DNA MMTV (A) lub DNA genów-chimer utworzonych z DNA kinazy tymidynowej (*tk*) i DNA lewego LTR MMTV (B) lub prawego LTR MMTV (C).

DNA komórki gospodarza zaznaczono linią falistą; DNA LTR MMTV zaznaczono podwójną grubą linią, a pozostałe sekwencje DNA MMTV lub *tk* podwójną cienką linią; sekwencje promotorowe MMTV zakreskowano skośnie, a sekwencje promotorowe *tk* poziomo; sekwencje kodujące *tk* zakropkowano. Liczby ujemne oznaczają pozycje nukleotydu na lewo a liczby dodatnie pozycje nukleotydu na prawo od homologicznego miejsca startu transkrypcji DNA MMTV (nukleotyd o liczbie +1); strzałki oznaczają kierunek transkrypcji DNA MMTV lub *tk*. Sekwencje DNA MMTV warunkujące działanie *in vivo* glukokortykoidów zaznaczono linią ciągłą (8, 10), a wiążące *in vitro* receptor glukokortykoidów zaznaczono linią przerywaną z krzyżykami (3, 4, 5, 6).

Grupa badawcza Yamamoto [6, 10] starała się ustalić, czy inicjacja transkrypcji DNA MMTV i stymulacja tej transkrypcji przez glukokortykoidy uwarunkowana jest obecnością jednego elementu promotora czy też obecnością dwóch niezależnych elementów, które można oddzielić fizycznie i funkcjonalnie [10], oraz czy elementy te wiążą *in vitro* receptor glukokortykoidów [6]. Grupa ta wykazała, że delekcja sekwencji DNA lewego LTR, leżących między -109 a -449 nukleotydem na lewo od miejsca startu syntezy RNA MMTV (fragment DNA LTR wiążący *in vitro* receptor glukokortykoidów) znosi działanie *in vivo* glukokortykoidów na transkrypcję; przyłączenie tego fragmentu DNA LTR lub fragmentu leżącego między -109 a -1182 nukleotydem nie zawierających inicjacji transkrypcji do sekwencji promotorowych i kodujących genu kinazy tymidynowej (*tk*) (genu niewrażliwego na działanie glukokortykoidów) powoduje *in vivo* wzrost częstości inicjacji transkrypcji genu *tk* w transfekowanych tym rekombinantem szczurzych komórkach w obecności glukokortykoidów. Co ciekawsze, rekombinat, w którym fragment DNA LTR leżący

między -109 a -1182 nukleotydem przyłączono w odwróconej orientacji (Ryc. 1 B) do sekwencji promotorowych genu *tk* wykazywał analogiczną wrażliwość na działanie *in vivo* glukokortykoidów.

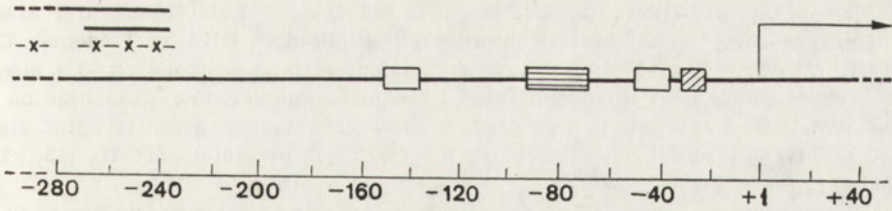
Wyniki uzyskane przez grupę Yamamoto wskazują, że bez utraty funkcjonalnych właściwości można fizycznie oddzielić od sekwencji promotorowych, warunkujących prawidłową inicjację syntezy RNA MMTV, sekwencje DNA niezbędne dla regulacji transkrypcji przez glukokortykoidy; tak oddzielone sekwencje, przyłączone do heterologicznych sekwencji promotorowych genu normalnie nie kontrolowanego przez glukokortykoidy, powodują „uwrażliwienie” tego genu na działanie *in vivo* glukokortykoidów, niezależnie od odległości i orientacji przyłączonych sekwencji.

Inna grupa badawcza [7, 8, 9] starała się wytyczyć granice sekwencji DNA LTR, których delecja znosi kontrolowanie *in vivo* transkrypcji przez glukokortykoidy; jednocześnie starano się wyjaśnić [8, 9] czy hormonalna regulacja transkrypcji związana z określonym fragmentem promotora jednego genu ogranicza się do kontroli jednego miejsca inicjacji, czy też może równolegle regulować inicjację transkrypcji drugiego genu, posiadającego własny, niewrażliwy na działanie glukokortykoidów promotor i własne miejsce startu syntezy RNA. Stosując kontrolowane delecje od końca 5' DNA prawego LTR autorzy utworzyli z fragmentów DNA LTR oraz DNA sekwencji kodujących genu *tk* (poprzedzonych 70-ma nukleotydami sekwencji promotorowych tego genu) szereg mieszańcowych rekombinantów czy też genów-chimer (Ryc. 1 C), w których dwa miejsca inicjacji transkrypcji (to jest inicjacji transkrypcji DNA LTR MMTV i DNA *tk*) oddalone były od siebie o około 500 nukleotydów (Ryc. 1C). Wykazali oni, że delecja od końca 5' DNA LTR do -202 nukleotydu na lewo od miejsca inicjacji transkrypcji DNA LTR nie znosi kontroli hormonalnej inicjacji transkrypcji DNA LTR i DNA *tk* w utworzonych genach-chimerach, natomiast delecja od końca 5' DNA LTR do -137 nukleotydu prawie całkowicie redukuje wpływ *in vivo* glukokortykoidów na regulację transkrypcji DNA LTR. W ten sposób autorzy wykazali, że sekwencje DNA LTR położone w dystalnym regionie promotora LTR MMTV warunkują hormonalną kontrolę inicjacji syntezy dwóch różnych transkryptów, których miejsca inicjacji są oddalone od siebie o około 500 nukleotydów.

Według niepublikowanych danych jednego ze współautorów artykułu przeglądowego tej grupy badawczej [9] delecja od końca 3' DNA LTR do -63 nukleotydu redukuje wpływ *in vivo* glukokortykoidów na efektywność inicjacji transkrypcji DNA *tk* w analogicznie skonstruowanym genie-chimerze. Ostatni wynik nie jest jednak zgodny z wcześniejszymi rezultatami badań grupy Yamamoto [10] oraz z danymi, które dotyczą lokalizacji wiązania receptora glukokortykoidów w regionie promotora MMTV [5, 6].

Dwie grupy badaczy: Yamamoto [6] i Beato [5] — wykorzystując między innymi efekt ochronny białka związanego z DNA — zlokalizowały położenie sekwencji DNA LTR wiążących *in vitro* receptor glukokortykoidów izolowany z wątroby szczura. W obszarze sekwencji promotorowych obie grupy znalazły w lewym [6] i prawym [5] LTR dwa podobnie zlokalizowane odcinki DNA LTR silnie chronione przez receptor glukokortykoidów przed działaniem DNA-zy I: między -84 a -127 nukleotydem [6] lub -72 a -124 nukleotydem [5] oraz między -166 a -189 nukleotydem [6] lub -163 a -192 nukleotydem [5] na lewo od miejsca inicjacji transkrypcji LTR. (Ryc. 2).

Grupa Yamamoto [6] zidentyfikowała też dwa inne odcinki DNA w lewym LTR silnie chronione przez receptor glukokortykoidów przed działaniem DNA-zy I: między -269 a -283 nukleotydem i między -289 a -305 nukleotydem na lewo od miejsca startu syntezy RNA MMTV; oprócz tego znaleziono cztery odcinki DNA



Ryc. 2. Schemat budowy promotora ludzkiego genu metalotioneiny [12]. Prostokąty oznaczają położenia: TATA box (zakreskowane skośnie), sekwencji warunkujących podstawowy poziom transkrypcji (zakreskowane poziomo) i sekwencji warunkujących działanie kadmu (niezakreskowane). Sekwencje warunkujące działanie *in vivo* glukokortykoidów zaznaczono linią ciągłą, a wiążące *in vitro* receptor glukokortykoidów linią przerywaną z krzyżykami. Pozycje nukleotydów zaznaczono jak na rycinie 1.

wiązące receptor, leżące między +4000 a +8000 nukleotydem na prawo od miejsca startu syntezy RNA MMTV. Znaczenie wiązania receptora glukokortykoidów przez te regiony DNA MMTV jest całkowicie niewyjaśnione.

Wszystkie wymienione regiony DNA MMTV wiążące *in vitro* receptor glukokortykoidów oraz sekwencje DNA MMTV, których delecja znosi wpływ *in vivo* glukokortykoidów na inicjację syntezy RNA MMTV leżą poza proksymalnymi sekwencjami promotorowymi, których obecność warunkuje prawidłowe odnajdywanie miejsca inicjacji transkrypcji przez polimerazę RNA B.

Podobną prawidłowość stwierdzono ostatnio [12] w przypadku ludzkiego genu struktury metalotioneiny (białka wiążącego metale ciężkie w komórkach różnych organizmów eukariotycznych). Transkrypcja genu metalotioneiny jest indukowana *in vivo* przez glukokortykoidy i kadm. Po wieloletnich, początkowo nieudanych próbach wprowadzenia różnymi metodami do różnych komórek mysiego lub ludzkiego genu metalotioneiny bez utraty wrażliwości tego genu na działanie glukokortykoidów, wprowadzono ludzki gen metalotioneiny (MT-II_A) wraz z 800 nukleotydami poprzedzającymi miejsce inicjacji transkrypcji drogą transfekcji do szczurzych fibroblastów [12]; okazał się on niezwykle interesującym obiektem w badaniach nad mechanizmem modulacji transkrypcji komórkowych genów eukariotycznych. Stosując delekcje poprzedzające miejsce startu syntezy RNA MT-II_A i tworząc z uzyskanych fragmentów DNA MT-II_A oraz sekwencji promotorowych i kodujących genu kinazy tymidynowej (*tk*) szereg rekombinantów, autorzy ustalili, że sekwencje promotorowe MT-II_A muszą obejmować przynajmniej 270 nukleotydów, które poprzedzają miejsce inicjacji transkrypcji tego genu; w obrębie tych sekwencji zidentyfikowano: sekwencje TATA box leżące między -24 a -29 nukleotydem; sekwencje warunkujące podstawowy poziom transkrypcji przez kadm, leżące między -38 a -50 i między -138 a -150 nukleotydem oraz sekwencje warunkujące indukcje transkrypcji przez glukokortykoidy, leżące między -237 a -268 nukleotydem. Delekcja sekwencji niezbędnych dla regulacji transkrypcji przez glukokortykoidy znosi działanie *in vivo* glukokortykoidów bez wpływu na podstawowy poziom transkrypcji oraz indukcje transkrypcji przez kadm. Autorzy zdołali fizycznie i funkcjonalnie oddzielić sekwencje DNA warunkujące działanie glukokortykoidów i kadmu od sekwencji warunkujących inicjację transkrypcji; sekwencje te przyłączone (w odległości przynajmniej 600 nukleotydów) do heterologicznego promotora genu *tk*, niewrażliwego na działanie glukokortykoidów i kadmu, powoduje uwrażliwienie tego genu na działanie *in vivo* obu tych czynników. Autorzy określili również sekwencje DNA MT-II_A

wiązące *in vitro* receptor glukokortykoidów izolowany z wątroby szczura. Stwierdzili oni, że receptor najbardziej chroni przed działaniem DNA-zy I odcinek DNA MT-II_A między -245 a -265 nukleotydem i względnie słabo w okolicach -324 nukleotydu; określono w tych odcinkach skład i kolejność nukleotydów wskazując na pewne homologie w sekwencji nukleotydów silnie chronionych przez receptor glukokortykoidów* przed działaniem DNA-zy I w regionach promotora MT-II_A [12] i LTR MMTV [5].

W omawianych badaniach po raz pierwszy wykazano eksperymentalnie, że w dystalnych regionach promotora genu komórkowego eukariontów istnieją sekwencje DNA, wiążące *in vitro* receptor glukokortykoidów, których delecja znosi działanie *in vivo* glukokortykoidów na efektywność inicjacji transkrypcji bez wpływu na prawidłowość tej inicjacji i podstawowy poziom transkrypcji oraz indukcje tej transkrypcji przez inne czynniki [12]. Jak wykazano w przypadku retrowirusa MMTV sekwencje te mogą oddziaływać jednocześnie na efektywność inicjacji syntezy dwóch różnych transkryptów [8], niezależnie od odległości [8, 11] i orientacji [11] w stosunku do miejsca inicjacji syntezy kontrolowanego transkryptu; sekwencje te przejawiają więc cechy tak zwanych sekwencji wzmacniających (ang. *enhancer sequences*) uznanych obecnie za nowy element regulujący transkrypcję; w przypadku genów komórkowych działanie sekwencji wzmacniających związane jest z kontrolą transkrypcji specyficzną dla danego rodzaju komórek lub tkanek [13], co jest przypuszczalnie uwarunkowane wiązaniem przez te sekwencje białek, występujących jedynie w określonych komórkach. Receptor glukokortykoidów pretenduje więc do pierwszego zidentyfikowanego białka, które jest wiązane przez ten typ sekwencji.

Zaakceptowano do druku 5 marca 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Wasylyk B., Chambon P., (1982), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biology*, **47**, 921—934.
2. Davison B. L., Egly J.-E., Mulvihill E. R., Chambon P., (1983), *Nature*, **301**, 680—686.
3. Govindan M. V., Spiess E., Majors J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5157—5161.
4. Geisse S., Scheidereit C., Westphal H. M., Hynes N. E., Groner B., Beato M., (1982) *EMBO J.*, **1**, 1613—1619.
5. Scheidereit C., Geisse S., Westphal H. M., Beato M., (1983), *Nature*, **304**, 749—752.
6. Payvar F., De Franco D., Friestone G. L., Edgar B., Wrange Ö., Okret S., Gustafsson J.-Å., Yamamoto K. R., (1983), *Cell*, **35**, 381—392.
7. Groner B., Herrlich P., Kennedy N., Ponta H., Rahmsdorf U., Hynes N. E., (1982), *J. Cell. Biochem.*, **20**, 349—357.
8. Hynes N. Y., Van Ooyen A., Kennedy N., Herrlich P., Ponta H., Groner B., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3637—3641.
9. Groner B., Kennedy N., Skroch P., Hynes N. E., Ponta H., (1984), *Biochem. Biophys. Acta*, **781**, 1—6.

* Zagadnienie to zostanie poruszone szerzej w *Postęпах Biochemii*, w artykule monograficznym.

10. Chandler V. L., Maler B. A., Yamamoto K. R., (1983), *Cell* 33, 489—499.
11. Fasel N., Pearson K., Buetti E., Diggelmann H., (1982), *EMBO J.*, 1, 3—7.
12. Karin M., Haslinger A., Holtgreve H., Richard R. J., Krauter P., Westphal H. M., Beato M., (1984), *Nature*, 308, 513—519.
13. Gillies S. D., Morrison S. L., Oi V. T., Tonegawa S., (1983), *Cell*, 33, 717—728.

-W. Chomsky, J. H. Greenberg, A. Keenan, A. Rizzi, S. Shieber, J. S.
 -All (Year) W. Chomsky, J. H. Greenberg, A. Keenan, A. Rizzi, S. Shieber, J. S.
 -1965-1970
 -1971-1975
 -1976-1980
 -1981-1985
 -1986-1990
 -1991-1995
 -1996-2000
 -2001-2005
 -2006-2010
 -2011-2015
 -2016-2020
 -2021-2025
 -2026-2030
 -2031-2035
 -2036-2040
 -2041-2045
 -2046-2050
 -2051-2055
 -2056-2060
 -2061-2065
 -2066-2070
 -2071-2075
 -2076-2080
 -2081-2085
 -2086-2090
 -2091-2095
 -2096-2100

ARTYKUŁY

BARBARA GOŁOS *)

Translokacje chromosomalne a transformacja nowotworowa

Chromosomal translocations and neoplastic transformation

Spis treści

- I. Protoonkogeny jako potencjalne geny transformujące
- II. Specyficzne translokacje w nowotworach
- III. Translokacje chromosomów w chłoniakach Burkitta i w mysich szpiczakach jako model mechanizmu transformacji nowotworowej
 - III-1. Struktura onkogenu *c-myc*
 - III-2. Struktura i rekombinacje genów immunoglobulin
 - III-3. Struktura genu *c-myc* i genów immunoglobulin po translokacji chromosomalnej
 - III-4. Ekspresja genu *c-myc* w komórkach normalnych i nowotworowych
 - III-5. Model regulacji ekspresji genu *c-myc*
- IV. Uwagi końcowe

Contents

- I. Protooncogenes as potential transforming genes
- II. Specific translocations in neoplasia
- III. Chromosome translocations in Burkitt's lymphomas and murine plasmacytomas as a model for transformation mechanism
 - III-1. Structure of *c-myc* gene
 - III-2. Structure and recombinations of immunoglobulin genes
 - III-3. Structure of translocated *c-myc* and immunoglobulin genes
 - III-4. *c-myc* gene expression in normal and neoplastic cells
 - III-5. A model for regulation of *c-myc* gene expression
- IV. Concluding remarks

I. Protoonkogeny jako potencjalne geny transformujące

Postęp nauki o etiologii powstawania nowotworów przebiega w ostatnich latach niezwykle dynamicznie. Tak burzliwy rozwój stał się możliwy dzięki opanowaniu technik inżynierii genetycznej — w szczególności odkryciu i zastosowaniu licznych enzymów restrykcyjnych oraz udoskonalen-

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

niu metod klonowania i sekwencjonowania DNA. Jednak fundamentem tej wiedzy stały się prace przeprowadzone w latach 60-tych, w których koncentrowano się głównie na ustaleniu roli zewnętrznych, pozaorganizmalnych czynników w powstawaniu nowotworów — wpływ chemicznych kancerogenów, promieniowania jonizującego czy infekcji wirusowych. W wyniku badań ustalono, iż głównym obiektem destruktywnych oddziaływań czynników zewnętrznych jest materiał genetyczny komórek. Na tej podstawie powstała koncepcja, iż rzeczywiste przyczyny i mechanizmy onkogenezy ukryte są w samym DNA. W 1971 roku Temin [1] zaproponował tzw. „hipotezę protowirusa”, według której we wszystkich komórkach organizmów wyższych występują potencjalne onkogeny, pełniące normalne funkcje w komórce. Według Temina potencjalne onkogeny (protoonkogeny) przechodzą w formę właściwych onkogenów, tj. genów o własnościach transformujących komórki, w wyniku mutacji somatycznych lub w wyniku włączenia ich do genomu retrowirusa [2]. W świetle najnowszych badań hipoteza ta staje się coraz bardziej prawdopodobną, w odróżnieniu od wysuniętej pod koniec lat 60-tych przez Huebnera i Todaro tzw. „hipotezy onkogeny” [3]. Ta ostatnia zakłada obecność w normalnych komórkach utajonych onkogenów, których aktywacja czynnikami mutagennymi prowadzić może do onkogenezy [3]. Obecnie uważa się, że nie istnieją geny, których jedyną funkcją jest wywoływanie transformacji nowotworowej [2].

Do tej pory odkryto 20 onkogenów zintegrowanych z genomem retrowirusów wywołujących nowotwory u kręgowców [4]. Współcześnie przeważa pogląd, że wirusowe onkogeny nie są naturalnymi składnikami genomu retrowirusów [2, 5]. Jedną z hipotez mówi, iż zostały one włączone do genomu retrowirusowego w wyniku rekombinacji genetycznej między cDNA prowirusa a cDNA komórkowego protoonkogeny [5]¹. O takiej genezie wirusowych onkogenów świadczy kilka faktów. Po pierwsze, w miejscu integracji onkogeny często występuje delekcja odpowiednich sekwencji wirusowych [2]. Po drugie, w komórkach kręgowców [6—10] i bezkręgowców [11] wykryto geny (protoonkogeny), których sekwencje są w wysokim stopniu homologiczne z sekwencjami niektórych onkogenów spotykanych u retrowirusów (określa się je skrótem *c-onc* — od ang. *cellular oncogen*, w odróżnieniu od wirusowych onkogenów *v-onc* — ang. *vi-*

¹ cDNA jest sekwencją DNA powstałą na matrycy RNA przy udziale odwrotnej transkryptazy — enzymu, którego gen znajduje się w genomie retrowirusów. Po zainfekowaniu komórki genom retrowirusa zbudowany z RNA zostaje przepisany na DNA (cDNA) przy udziale odwrotnej transkryptazy (rewertazy) uwalnianej do komórki z kapsydu wirusa i dopiero w takiej formie zostaje wbudowany do genomu gospodarza. Wbudowany wirus nosi nazwę „prowirusa”. Według Temina [5] odwrotnej transkrypcji mogą ulegać także mRNA gospodarza w tym mRNA komórkowych protoonkogenów.

ral oncogen)². Po trzecie, wirusowe onkogeny różnią się od protoonkogenów tym, że nie posiadają intronów, podczas gdy geny *c-onc* są tzw. genami mozaikowymi składającymi się z intronów i egzonów [2]³. Ponadto geny *v-onc* w porównaniu z ich odpowiednikami komórkowymi są niekompletne — posiadają mutacje i delecje [2].

Komórkowe protoonkogeny cechuje duża konserwatywność ewolucyjna, charakterystyczna dla genów o ważnych funkcjach genetycznych [2]⁴. W przypadku niektórych protoonkogenów wykazano ich aktywność transkrypcyjną w normalnym rozwoju kręgowców [12, 13]. Przypuszcza się, iż komórkowe protoonkogeny biorą udział w kluczowych procesach, odpowiedzialnych za wzrost i różnicowanie się komórek normalnych [5]. Zmiany w funkcjonowaniu genów *proto-onc* prawdopodobnie wpływają na zmianę regulacji procesów komórkowych prowadząc w konsekwencji do powstania fenotypu nowotworowego. Zebrano już wiele dowodów, iż komórkowe onkogeny biorą udział w transformacji nowotworowej wywołanej innymi czynnikami niż transdukcja wirusowa np. przez mutacje [14], indukcję wirusami niezawierającymi w swym genomie onkogenów a integrującymi się w pobliżu lub wewnątrz komórkowych onkogenów [15—16], transfekcję [17—18], amplifikację [19—21] lub translokacje chromosomalne [22—23]. W kilku przypadkach analiza sekwencji onkogenu komórkowego wyizolowanego z nowotworu (powstałego po indukcji jednym z wyżej wymienionych czynników) ujawniła w ich obrębie zmiany w podstawieniu niektórych zasad, delecje lub/i insercje, w porównaniu z analogicznymi sekwencjami pobranymi z komórek nietransformowanych [2, 22, 25]. Podobne zjawisko zaobserwowano w stosunku do onkogenów wirusowych. Wydaje się zatem prawdopodobne, że zmiana sekwencji onkogenu może być istotną przyczyną przejścia formy *proto-onc* w formę *onc*. Stanowi to również silną przesłankę, iż między zmianą formy onkogenu a transformacją nowotworową istnieje związek przyczynowo-skutkowy.

W przypadku niektórych onkogenów wiadomo już, że ich produkty białkowe są enzymami przypominającymi swymi własnościami naturalne enzymy komórkowe. Różnią się jednak od prawidłowych enzymów większą aktywnością⁴. Wydaje się jednak, iż w odniesieniu do innych onkogenów zmiane ulegają własności samego genu, powodujące zaburzenia regulacji

² O ile teoretyczne rozróżnienie między protoonkogenami a onkogenami jest możliwe o tyle w praktyce nie zawsze jest wiadome z jaką formą tego genu mamy do czynienia, w związku z czym w literaturze źródłowej terminy „onkogen” i „*c-onc*” używane są w różnych znaczeniach. Zależnie od kontekstu mogą oznaczać bądź protoonkogeny bądź geny transformujące bądź obie formy jednocześnie.

³ W Postęпах Biochemii ukazała się praca na temat genów mozaikowych: Frank J., (1982) *Post. Biochem.*, 28, 3—24.

⁴ Na temat komórkowych (i częściowo wirusowych) onkogenów ukazała się w Postęпах Biochemii obszerna praca przeglądowa: Chorąży M., Szala S., (1983) *Post. Biochem.*, 29, 261—298 i 421—422.

ekspresji [22, 34, 43]. W pewnych przypadkach nie można wykluczyć, iż przyczyną nienormalnej regulacji onkogenu jest zmiana sekwencji w jego sąsiedztwie. Włączenie sekwencji onkogenu w obszar aktywnej chromatydy może nastąpić na przykład, w wyniku przemieszczeń materiału genetycznego w obrębie chromosomów (translokacje) integracji wirusów w pobliżu onkogenów lub w wyniku transdukcji. Zestawienie sekwencji onkogenu z promotorami lub sekwencjami wzmacniającymi innych genów lub wirusów może być przyczyną nienormalnej, wzmożonej aktywności tych onkogenów [22, 23, 34].

II. Specyficzne translokacje w nowotworach

Fakt, że przegrupowania chromosomalne, takie jak inwersje, translokacje i transpozycje mogą powodować zmianę ekspresji genów, nienormalne różnicowanie komórek a nawet upośledzenie rozwoju całego organizmu, znany jest już dawno badaczom zajmującym się dziedzicznością, rozwojem i zmiennością organizmów [35—37]. Jedno z pierwszych doniesień o specyficznych translokacjach występujących w niezależnie powstałych nowotworach tego samego typu (chłoniaki Burkitta) ukazało się w 1974 roku [38]. Dalsze, systematyczne badania kariotypów w komórkach nowotworowych ujawniły, że w wielu nowotworach występują charakterystyczne aberacje chromosomalne. Najczęściej spotykane są delecje i translokacje obejmujące przeważnie dwa, rzadziej trzy chromosomy niehomologiczne [40, 41].

Głównym celem tych badań było określenie czy aberacje występujące w nowotworach można uznać za pierwotną przyczynę powstawania nowotworów, czy też są one wtórnym zjawiskiem procesu onkogenezy. Wiadomo bowiem, że nie wszystkie aberacje chromosomów stwierdzone w komórkach neoplastycznych mogą być bezpośrednio odpowiedzialne za transformację. Niektóre aberacje chromosomów — zarówno ilościowe (monosomie, polisomie) jak i jakościowe (delecje, translokacje) pojawiają się w komórkach nowotworowych podczas długotrwałych hodowli *in vitro* [39]. Z drugiej zaś strony, nie wszystkie komórki z aberacjami chromosomalnymi przejawiają fenotyp nowotworowy. W jednym przypadku stwierdzono, że translokacja chromosomów 3 i 8, którą pierwotnie ujawniono w komórkach raka nerki okazała się translokacją konstytutywną tzn. występującą we wszystkich komórkach osoby chorej na ten nowotwór [22]. W podobnych przypadkach udało się jedynie ustalić, że członkowie rodzin posiadający dziedziczną translokację chromosomalną określonego rodzaju posiadają wrodzoną skłonność do zapadania na taki sam typ nowotworu. Takie obserwacje pozwalają jedynie na stwierdzenie, że niektóre translokacje zwiększają prawdopodobieństwo zachorowania na raka, zaś sama translokacja nie jest czynnikiem wystarczającym do zainicjowania procesu

onkogenezy. Prawdopodobnie niezbędny jest udział innych, dotąd nieokreślonych czynników [22]. W związku z powyższym materiał pobrany do badań kariotypu w celu określenia czy dana aberacja chromosomalna jest potencjalnie jedyną przyczyną transformacji nowotworowej, musi spełniać pewne warunki. Komórki przeznaczone do badań nie mogą być poddawane uprzedniej hodowli *in vitro* a występowanie aberacji konstytutywnej u dawcy musi być wykluczone. Ostatecznym jednak kryterium jest powtarzanie się takiej samej aberacji w niezależnie powstałych liniach takiego samego typu nowotworu. W wyniku badań w wielu nowotworach stwierdzono występowanie powtarzających się a więc raczej nieprzypadkowych zmian w strukturze chromosomów [40]. Wstępne opracowanie aberacji chromosomalnych zostało ujęte w specjalnie wydanym katalogu [41].

Najczęściej spotykaną aberacją jest translokacja chromosomów. Polega ona na wzajemnej wymianie terminalnych odcinków między dwoma niehomologicznymi chromosomami. Translokacje określane jako specyficzne dla danego rodzaju nowotworu występują w wysokim procencie stwierdzonych przypadków (70—100%). W ludzkich chłoniakach typu Burkitta (*Burkitt's lymphoma*) występują specyficzne wzajemne translokacje chromosomów 8 i 14 (w skrócie: t(8;14) w 90% przypadków oraz translokacje t(2;8) i t(8;22) w pozostałych 10% przypadków; chłoniaki nie-Burkitta (*non-Burkitt's lymphoma*) również charakteryzują translokacje t(8;14), przewlekłą białaczkę szpikową (*chronic myelogenous leukemia*) — t(9;22), zaś jako przykład nowotworów zwierzęcych można przytoczyć mysie szpiczaki (*murine plasmacytoma*) z translokacją t(12;15). Specyficzność tych translokacji wynika nie tylko z udziału tych samych chromosomów — również miejsca pęknięć chromosomów są stałe i dotyczą tych samych prążków [22, 40, 42].

W odniesieniu do niektórych translokacji występujących w nowotworach ustalono, że miejsca pęknięć chromosomów występują w prążkach, w których znajdują się *loci* genowe znanych komórkowych onkogenów. Na przykład u człowieka onkogen *c-myc* znajduje się w prążku 24, na długim ramieniu — q chromosomu 8 (w skrócie 8q24) i bierze udział w translokacjach występujących w chłoniakach Burkitta; mysy gen *c-myc* znajduje się w chromosomie 15, w prążku, którego pęknięcie występuje w translokacji w mysich szpiczakach; w przewlekłej białaczce szpikowej translokacją objęty jest *locus* onkogenu *c-abl* znajdujący się na ludzkim chromosomie 9 w prążku q34; w ludzkiej złośliwej białaczce szpikowej translokacja obejmuje *locus* onkogenu *c-mos* na chromosomie 8q22 [22, 42].

III. Translokacje chromosomów w chłoniakach Burkitta i w mysich szpiczakach jako model mechanizmu transformacji nowotworowej

Rozwój metod klonowania i sekwencjonowania genów umożliwił podjęcie badań nad strukturą sekwencji translokowanych genów. Najbardziej zaawansowane są prace nad translokacjami chromosomalnymi w mysich szpiczakach i w ludzkich chłoniakach Burkitta. Na wybór tych nowotworów jako materiału modelowego złożyło się kilka powodów. Po pierwsze, stwierdzono, że zarówno w mysich szpiczakach jak i w chłoniakach Burkitta w translokacjach zawsze biorą udział *loci* genowe onkogenu *c-myc* (chromosom 8q24 — u człowieka, chr, 15D23 — u myszy) i genów immunoglobulin (u człowieka: gen łańcuchów ciężkich Ig — chr, 14q32, gen łańcuchów lekkich „lambda” — chr, 22q11 i gen łańcuchów lekkich „kappa” — chr. 2p11; u myszy: gen łańcuchów ciężkich — chr. 12F1) co sugeruje, iż mechanizm transformacji w obu przypadkach może być podobny [22, 23]. Poza tym niezależnie prowadzone prace badawcze nad strukturą i funkcją subgenowych sekwencji onkogenu *c-myc* i genów immunoglobulin są na tyle zaawansowane, że umożliwia to wstępną interpretację wzajemnych funkcjonalnych oddziaływań tych genów po zajściu translokacji.

III-1. Struktura onkogenu *c-myc*

Struktura komórkowego genu *myc* jest dość dobrze poznana. Gen *c-myc* zbudowany jest z trzech egzonów oraz dwóch przedzielających je intronów [22, 23]. Egzon I jest odcinkiem DNA o długości ok. 600 par zasad i zawiera na końcu 5' dwa miejsca startu transkrypcji oddalone od siebie o 160 par zasad [22]. Prawdopodobnie jest on nieulegającą translacji sekwencją liderową, ponieważ posiada we wszystkich trzech możliwych ramkach odczytu kodony nonsensowe, umieszczone blisko potencjalnego miejsca inicjacji translacji [44]. Pozostała część genu tj. I i II egzon prawdopodobnie koduje białko o masie cząsteczkowej 48 000 [43—45].

Ostatnio jednak ukazała się praca, w której opisano wyniki niezależnego sekwencjonowania ludzkiego genu *myc* [43]. Rzuca ona nieco odmienne światło na strukturę i funkcję I egzogenu. Autorzy tej pracy stwierdzają, że ustalona przez nich sekwencja I egzonu różni się w kilku istotnych miejscach od wcześniej opublikowanych sekwencji. Zdaniem G a z i n a i w s p. [43], sekwencja I egzonu jest o wiele dłuższa i zawiera co najmniej 1000 par zasad. Ponadto posiada potencjalne miejsce inicjacji transkrypcji i otwartą ramkę odczytu (ang. *open reading frame*), co teoretycznie umożliwiłoby powstawanie białka o m.cz. 20 000. Ponieważ pozostałe dwa egzony zawierają sekwencję dla białka o teoretycznej m.cz. 48 000, kompletne białko *c-myc*, zdaniem G a z i n a i w s p. miałoby w normalnych, nietransformowanych komórkach m.cz. 68 000. Białko o m.cz. 48 000

powstawałoby w przypadku zmian w sekwencji I egzonu (mutacje, delecje, insercje) lub po odcięciu części a nawet całości tego odcinka genu podczas translokacji chromosomalnej. Pojawienie się w komórce białka o niższej masie cząsteczkowej powinno być skorelowane z powstaniem fenotypu nowotworowego komórki [43]. Jednak wcześniejsze badania przy użyciu surowicy zawierającej przeciwciała syntetycznego polipeptydu homologicznego do karboksylowego końca białka c-myc, wykazały obecność białka o m.cz. 48 000 zarówno w komórkach normalnych jak i w komórkach chłoniaka Burkitta [24].

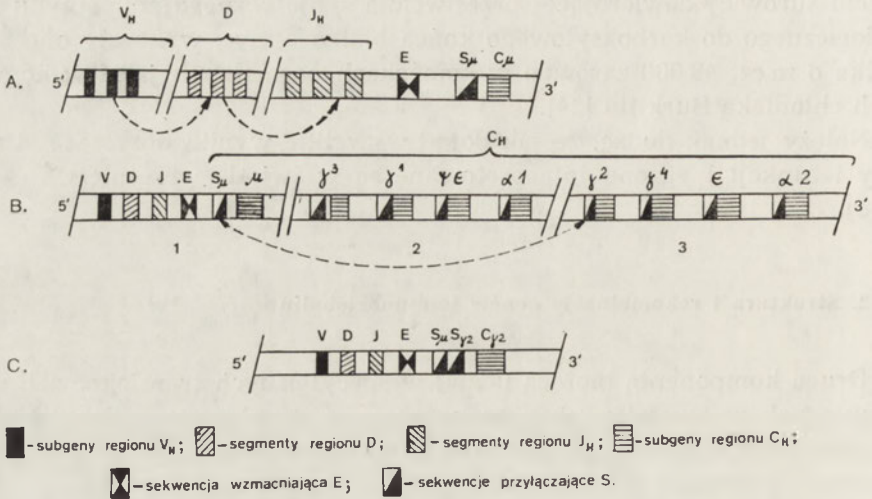
Należy jednak dodać, że jak dotąd wszystkie wyniki dotyczące struktury i funkcji I egzonu interpretowane są w świetle wcześniejszej koncepcji.

III-2. Struktura i rekombinacje genów immunoglobulin

Drugą komponentą biorącą udział w specyficznych translokacjach występujących w omawianych nowotworach są geny immunoglobulin. Cechą charakterystyczną tych genów są specyficzne rekombinacje wewnątrzgenowe zachodzące podczas normalnego dojrzewania limfocytów [22]. Rekombinacje genów immunoglobulin umożliwiają produkowanie przeciwciał o ogromnej różnorodności, gwarantującej skuteczną odpowiedź immunologiczną. Rekombinacje te polegają (w przypadku genów łańcuchów ciężkich) na przyłączeniu jednego z kilku setek subgenów regionu zmiennego V_H (ang. *variable region*) wraz z jego sekwencją promotorową do jednego z segmentów regionu D (ang. *diversity region*), a następnie na przeniesieniu odcinka VD do jednego z sześciu segmentów regionu J (ang. *joining region*) (Rys. 1). Ponieważ region J przylega do subgenu C_μ z regionu stałego (ang. *constant region*), tzw. rekombinacja VDJ (ang. *VDJ recombination*) tworzy kompletny gen immunoglobulin typu IgM. Między regionem J a subgenem C_μ znajdują się jeszcze dwie specyficzne sekwencje — tzw. *switch sequence*). Sekwencja wzmacniająca jest prawdopodobnie niezbędna dla prawidłowego przebiegu transkrypcji genu *Ig* i uaktywniana jest po rekombinacji VDJ. Sekwencja przełączająca S_μ położona jest między wzmacniaczem a subgenem C_μ i wykorzystywana jest tylko w tzw. rekombinacji przełączającej (ang. *switch recombination*) prowadzącej do utworzenia genów innego typu immunoglobulin np. *IgG* lub *IgA*. Rekombinacja przełączająca zachodzi zawsze przy udziale sekwencji przełączającej S_μ i sekwencji przełączającej, przynależnej do innego subgeny z regionu stałego (γ , α , ϵ). Sekwencje S są segmentami o długości 1—2 kpz, składającymi się z pięcionukleotydowych, powtarzających się sekwencji i są charakterystyczne tylko dla genów łańcuchów ciężkich *Ig* (geny łańcuchów lekkich nie posiadają sekwencji typu „switch” i regionów D).

Reasumując powyższy opis — rekombinacja VDJ prowadzi do utwo-

zenia genu immunoglobuliny *IgM*, którego sekwencję można zapisać w skrócie: 5'-V-D-J-E-S_μ-C_μ-3', zaś rekombinacja przełączająca która zachodzi po rekombinacji VDJ, prowadzi do utworzenia jednego z pozostałych genów immunoglobulin np. *IgG* (5'-V-D-J-E-S_μ-S_γ-C_γ-3') lub *IgA* (5'-V-D-J-E-S_μ-S_α-C_α-3') (przytoczone według 22).



Ryc. 1. Budowa ludzkiego genu łańcuchów ciężkich immunoglobulin. a) budowa regionu zmiennego oraz regionów D i J przed rekombinacją oraz przykładowy przebieg rekombinacji VDJ (strzałki); b) odcinek 1 przedstawia gen *IgM*, który powstał w wyniku rekombinacji VDJ, odcinki 2 i 3 przedstawiają budowę regionu stałego, strzałki obrazują przykładowy przebieg rekombinacji przełączającej; c) sekwencja genu *Ig* do rekombinacji VDJ i S. (według 22, uproszczone). V_H — fragment regionu zmiennego; D — fragment regionu D; J_H — fragment regionu J; C_H — region stały.

III-3. Struktura genu *c-myc* i genów immunoglobulin po translokacji chromosomalnej

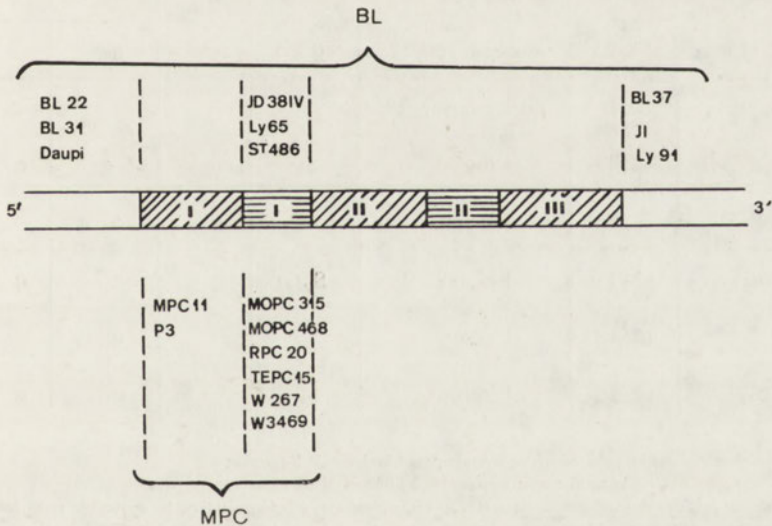
Translokacje występujące w chłoniakach Burkitta i w mysich szpiczakach dotyczą tylko jednego chromosomu z pary chromosomów homologicznych, tak że zawsze zostaje zachowany jeden nienaruszony *allel* genu *c-myc* i genu immunoglobulin [22].

Poza tym są translokacjami wzajemnymi (ang. *reciprocal translocation*) mającymi charakter ogólnie zachowawczy co do ilości materiału genetycznego [22]. Jednak dokładna analiza sekwencji DNA w miejscu pęknięcia chromosomów i ponownego ich złączenia, wykazała, że w szeregu liniach mysiego szpiczaka i w niektórych liniach chłoniaka Burkitta właśnie w tym miejscu występują delecje lub duplikacje krótkich kilkunastozasadowych sekwencji genu *c-myc* i genu immunoglobulin [25–27]. Zdaniem Geronda kisa i w sp. [25] translokacje powstają w wyniku dwóch blisko położonych, jednoniciowych pęknięć DNA. Po rozsunięciu się frag-

mentów chromosomów na ich końcach znajdują się krótkie, jednoniciowe końce DNA; następnie w wyniku współzawodniczego działania polimerazy DNA i egzonukleazy zachodzi z jednej strony dobudowywanie nici komplementarnej do jednoniciowego końca z drugiej zaś strony jego degradacja. Jeśli dobudowywanie zaszło na obydwóch końcach to fragment odpowiadający jednoniciowemu „ogonkowi” zostaje zduplikowany. Analogicznie — działanie egzonukleazy spowoduje delecję [25].

Ze względu na stały udział genów immunoglobulin w specyficznych translokacjach omawianych nowotworów, spodziewano się, że mechanizm powstawania tych translokacji posiada jakiś związek z naturalnymi mechanizmami rekombinacji VDJ i S (np. przy udziale tych samych enzymów przełączających) [25]. Jednak bliższa analiza sekwencji w miejscach pęknięcia genu *c-myc* w różnych liniach nowotworów nie wykazała żadnych większych homologii z analogicznymi miejscami w genach immunoglobulin [27]. Powyższe dane wskazują raczej, iż translokacje są wynikiem niehomologicznej rekombinacji między genami położonymi na dwóch różnych chromosomach [25].

Analiza miejsc pęknięcia chromosomu 8 wykazała, że w różnych liniach chłoniaka Burkitta pęknięcia te mogą występować na bardzo dużym odcinku DNA — do 7 kbp przed końcem 5' genu *c-myc* i ok. 6 kbp za jego końcem 3' (rys. 2) [25—30]. Pęknięcia wewnątrz lokus *c-myc* (w I intronie lub w I egzonie) występują tylko w niewielu liniach chłoniaka Burkitta i we wszystkich zbadanych dotąd liniach mysiego szpiczaka [25, 27, 28].



Ryc. 2. Schemat struktury genu *c-myc* oraz miejsca pęknięcia tego genu w niektórych liniach chłoniaków Burkitta (BL) [22, 26, 28—30], i mysiego szpiczaka (MPC) [25, 27].

Geny immunoglobulin ulegają najczęściej pęknięciu w obrębie sekwencji przełączających [25—29]. Jednak i od tej reguły istnieją wyjątki. W niektórych przypadkach (np. linia Daudi — patrz tabela 1) miejsce pęknięcia występuje w regionie J genu łańcuchów ciężkich immunoglobulin [31]. W analogicznym miejscu występuje pęknięcie lokus Ig łańcuchów lekkich — „lambda” na chromosomie 22 [26].

Tabela 1

Wybór danych o niektórych najlepiej zbadanych liniach chłoniaka Burkitta i mysiego szpiczaka

linia nowotworu	translokacja	miejsce pęknięcia locus		P ₁ :P ₂	zmiany w sekwencji		ref,
		<i>c-myc</i>	<i>Ig</i>		<i>c-myc</i> 1 2 3	<i>Ig</i> 1	
BL	Daudi	8; 14	poza <i>c-myc</i> 5'+	J _H			28, 31
	BL31	8; 14	poza <i>c-myc</i> 5'+	S _μ	0,9		29
	BL22	8; 14	poza <i>c-myc</i> 5'+	S _μ	1, 1	x x	22, 29
	JD38 IV	8; 14	1 intron	(C _μ)§			28
	Ly65	8; 14	1 intron	S _μ		x	29
	Raji	8; 14	poza <i>c-myc</i> 5'+	S _{γ2a}	1, 3	x	29
	Seraphina	8; 14	poza <i>c-myc</i> ?		1,9	x	29
	BL37	8; 22	poza <i>c-myc</i> 3'++	J(C _λ 1)		q	26
	Ly 91	2; 8	poza <i>c-myc</i> 3'++				30
MPC	HOPC-1	12; 15	1 intron	S _α		q q	25
	J558	12; 15	1 ekson	S _α		q q	25
	MPC11	12; 15	1 ekson	S _{γ2a}		q q	25, 27
	P3	12; 15	1 ekson	S _u		q	25
	W267	12; 15	1 intron	S _α		q q	25

+ — miejsce pęknięcia genu *c-myc* występuje przed końcem 5' I egzonu;

+ + — miejsce pęknięcia genu *c-myc* występuje za końcem 3' III egzonu;

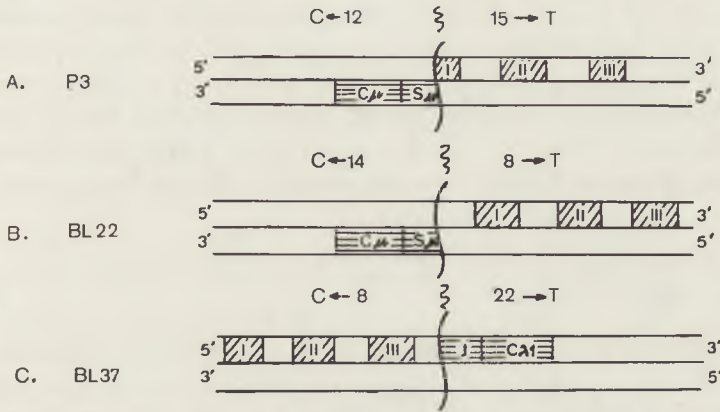
? — miejsce pęknięcia genu *c-myc* nie jest dokładnie ustalone, wiadomo tylko, że występuje poza lokus *c-myc*;

§ — miejsce pęknięcia genu *IgH* nie jest dokładnie ustalone i może obejmować sam gen C_μ lub sekwencję S_μ;

x — delecje (1), duplikacje (2) i insercje (3) stwierdzone w translokowanym lokus genu *c-myc* poza miejscem pęknięcia genu;

q — delecje (1), duplikacje (2), i insercje (3) stwierdzone w translokowanym lokus genu *c-myc* i *Ig* dokładnie w miejscu pęknięcia tych genów.

Cechą charakterystyczną translokacji t(8;14) w chłoniakach Burkitta [26, 28—30] i translokacji t(12;15) w mysich szpiczakach [25] jest odwrotna orientacja (ang. *head-to-head*) genu *c-myc* i genu Ig (chr. 14: centromer-3' Ig 5' — 5' *c-myc* 3'-telomer) tak, że sekwencje sensowne obu genów po translokacji znajdują się na przeciwnych niciach DNA (Ryc. 3). Natomiast po translokacjach t(2;8) i t(8;22) wzajemna orientacja genów jest zgodna (ang. *tail-to-head*) (chr. 8: centromer-5' *c-myc* 3' — 5' Ig 3'-telomer), tzn. sekwencje sensowne obu genów znajdują się na tej samej nici DNA (Ryc. 3c) [30]. W przypadku chłoniaków Burkitta mamy zatem sytuację dwojaką: w translokacji t(8;11) gen *c-myc* najczęściej zostaje przeniesiony do chromosomu 14, zaś w translokacjach t(2;8) i t(8;22) gen *c-myc* zwykle pozostaje związany z macierzystym chromosomem 8 (nie ulega przeniesieniu) a translokowana do tego chromosomu sekwencja genu Ig znajduje się za końcem 3' genu *c-myc* [26, 30].



Ryc. 3. Wzajemne położenie genu *c-myc* i genu immunoglobulin po translokacji: a) w mysiej linii P3 t(12;15); b) w ludzkiej linii BL 22 t(8;4); c) w ludzkiej linii BL 37 t(8;22). C — kierunek położenia centromeru chromosomu; T — kierunek położenia telomeru chromosomu; 1 — egzony genu *c-myc*; 2 — sekwencje genów immunoglobulin.

(według a—(25), b—(22), c—(26), zmienione)

III-4. Ekspresja genu *c-myc* w komórkach normalnych i nowotworowych

Badania poziomu transkrypcji genu *c-myc* w różnych liniach chłoniaka Burkitta przyniosły sprzeczne wyniki, dlatego bardziej wiarygodną metodą pomiaru aktywności transkrypcyjnej translokowanego i nietranslokowanego *allelu c-myc* stała się analiza długości wytwarzanego *c-myc* mRNA [22, 26, 27, 29]. W wyniku trawienia nukleazą S1 hybrydów między mRNA z badanej linii a znakowaną sondą *c-myc* DNA pochodzącą z komórek normalnych, udało się rozróżnić transkrypty powstające na skutek inicjacji transkrypcji w dwóch różnych miejscach. Normalne komórki (bez

translokacji) produkują dwa rodzaje *c-myc* mRNA, różniące się długością o 160 pz tj. o odległość dwóch miejsc startu transkrypcji. Obydwa miejsca startu wykorzystywane są w komórkach normalnych z różną częstością — zwykle drugie miejsce (P2) jest częściej wykorzystywane niż pierwsze (P1), tak że stosunek ilościowy wytwarzanych transkryptów *c-myc* (mRNA-P1: mRNA-P2) w liniach komórek kontrolnych waha się od 0,21 do 0,45 [29]. W liniach chłoniaka Burkitta, w których translokacja występuje poza *lokus c-myc* również wykorzystywane są obydwa miejsca startu transkrypcji (patrz tabela 1) jednak z równą częstością a nawet z przewagą miejsca pierwszego [22, 26, 29]. W innego rodzaju liniach tego samego nowotworu, w których miejsce pęknięcia genu *c-myc* występuje w I egzonie lub w I intronie — odcinając w ten sposób naturalne miejsca startu, transkrypcja rozpoczyna się w nowym, aktywowanym po translokacji miejscu startu transkrypcji znajdującym się najczęściej w I intronie. [29]. W tych liniach możliwe jest rozróżnienie między transkrypcją translokowanego i nietranslokowanego *allelu c-myc*. Na podstawie takich badań stwierdzono, iż *allel* nietranslokowany (znajdujący się na drugim, niebiorącym udziału w translokacji chromosomie 8) prawie nie ulega transkrypcji [22, 28, 29], natomiast całą pulę *c-myc* mRNA stanowią transkrypty *allelu* translokowanego. Powyższe dane wskazują, że translokacja zaburza regulację ekspresji nie tylko translokowanego ale być może również ekspresję genu nietranslokowanego [28, 29].

III-5. Model regulacji ekspresji genu *c-myc*

W niektórych liniach chłoniaka Burkitta, w których translokacja wychodzi poza *lokus c-myc*, stwierdzono zmiany sekwencji typu delecji lub /i insercji co w powiązaniu ze zjawiskiem przesunięcia równowagi transkrypcji na korzyść pierwszego miejsca startu może sugerować iż zmianie uległy miejsca regulatorowe genu [29].

Biorąc pod uwagę następujące fakty: 1 — brak ekspresji nietranslokowanego *allelu c-myc*, 2 — przesunięcie równowagi transkrypcji na korzyść pierwszego miejsca startu i 3 — częste zmiany w sekwencji translokowanego genu *c-myc*, grupa Leder a z Harvard Medical School w USA zaproponowała model negatywnej regulacji genu *c-myc* [22, 29]. Model ten przewiduje trzy możliwe warianty:

- 1 — gen *c-myc* podlega regulacji przez trans-działający represor;
- 2 — gen *c-myc* produkuje swój własny, *cis*-działający represor, (autoregulacja bezpośrednia);
- 3 — produkt genu *c-myc* oddziałuje z inną(-ymi) cząsteczką(-ami) efektorową, hamującą transkrypcję genu *c-myc* (autoregulacja pośrednia).

Odcięcie końca 5' genu *c-myc* lub zmiany w jego sekwencji powodują zanik wrażliwości takiego genu na sygnały represyjne czego konsekwencją

jest konstytutywna transkrypcja genu. W wariantach autoregulacyjnych modelu — konstytutywna produkcja białka *c-myc* powoduje trwałe wyłączenie normalnego nietranslokowanego *allelu* [22, 29].

Rzeczywista funkcja białka *c-myc* nie jest dotąd znana. Wiadomo jedynie, że białko produkowane przez wirusa MC29 (na podstawie sekwencji powstałej z odcinka wirusowego genu *gag* i genu *v-myc*) jest białkiem jądrowym. Być może produkt genu *c-myc* pełni w jądrze komórki jakies funkcje regulatorowe w ekspresji genów jak to sugerują Leder i w s p. [22].

Udział genów immunoglobulin w regulacji genu *c-myc* pozostaje niejasny. Sugerowany wcześniej wpływ tzw. sekwencji wzmacniającej na regulację translokowanego *allelu c-myc* [34] jest raczej wykluczony, gdyż sekwencja ta najczęściej zostaje przeniesiona do produktu wzajemnego translokacji a więc znajduje się na innym chromosomie niż translokowany *allel* genu *c-myc*. Nie można jednak wykluczyć, iż jakies inne sekwencje o podobnych własnościach (ang. *enhancer-like*, *promoter-like*) nie zostają uaktywniane po translokacji w obrębie genów immunoglobulin [22, 24].

IV. Uwagi końcowe

W wielu nowotworach zostały stwierdzone specyficzne translokacje chromosomów co sugeruje, że translokacja może być w niektórych przypadkach pierwotną przyczyną transformacji nowotworowej. Wydaje się również, że tylko niektóre miejsca na chromosomach posiadają własność uruchamiania mechanizmu onkogenezy po objęciu ich translokacją np. komórkowe onkogeny [40]. W świetle najnowszych danych doświadczalnych potwierdza się teza, że przekształcenie komórkowego protoonkogenu w formę onkogeną zachodzi po zmianach w jego sekwencji. Badania nad translokacjami nie potwierdziły wpływu sekwencji otaczającej onkogen na jego regulację, ale również jej nie zaprzeczyły w związku z czym problem ten pozostaje nadal otwarty. Należy jednak podkreślić, że translokacje chromosomalne jako model badawczy są niezwykle złożone, ponieważ nakładają się w nim różne wzajemnie powiązane zjawiska np. występowanie w jednej komórce translokowanych i nietranslokowanych *alleli* genów (w chłoniakach Burkitta i w mysich szpiczakach są to *allele c-myc* i genów immunoglobulin) oraz występowanie dwóch komplementarnych produktów translokacji na obu chromosomach biorących udział w translokacji. Wpływ tych towarzyszących zjawisk na proces onkogenezy jest, jak dotąd niezbadany. Można mieć jednak nadzieję, iż burzliwy rozwój badań w tej dziedzinie przyniesie wkrótce wiele nowych informacji uzupełniających dotychczasową wiedzę na ten temat.

Praca została napisana w ramach badań finansowanych przez Program Rządowy PR—6, Umowa Nr 2501.

Zaakceptowano do druku 15 marca 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Temin H. M., (1971), *J. Natl. Canc. Inst.*, **46**, 3—7.
2. Duesberg P. H., (1983), *Nature*, **304**, 219—225.
3. Huebner R. J., Todaro G. J., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 1087—1094.
4. Marx J. L., (1984), *Science*, **223**, 673—676.
5. Temin H. M., (1982), *J. Cell. Biochem.*, **19**, 105—118.
6. Rowley J. D., (1983), *Nature*, **301**, 290—291.
7. Sheiness D., Gardinier M., (1984), *Molec. Cell. Biol.* **4**, 1206—1212.
8. Wang J. Y. J., Ledley F., Goff S., Lee R., Groner Y., Baltimore D., (1984), *Cell*, **36**, 349—356.
9. Josephs S. F., Guo Ch., Ratner L., Wong-Staal F., (1984), *Science*, **223**, 487—491.
10. Bonner T., O'Brien S. J., Nash W. G., Rapp U. R., (1984), *Science*, **223**, 71—74.
11. Barnecow A., Scharf M., (1984), *Molec. Cell. Biol.*, **4**, 1179—1181.
12. Muller R., Slamon D. J., Tremblay J. M., Cline M. J., Verma I. M., (1982) *Nature*, **299**, 640—644.
13. Scharf M., Barnecow A., (1984), *Develop. Biol.*, **105**, 415—422.
14. Weinberg R. A., (1983), *Scient. Amer.*, **249**, 102—116.
15. Westaway D., Payne G., Varmus H. E., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 843—847.
16. Schubach W., Groudine M., (1984), *Nature*, **307**, 702—708.
17. Cooper G., (1982), *Science*, **217**, 201—806.
18. Sutherland B. M., Bennet P. V., (1984), *Cancer Res.*, **44**, 2769—2772.
19. Nowell P., Finan J., Dalla-Favera R., Gallo R. C., ar-Rushdi A., Romanczuk H., Selden J. R., Emanuel B. S., Rovera G., Croce C. M., (1983), *Nature*, **306**, 494—497.
20. Pellicci P-G., Lanfrancone L., Brathwaite M. D., Wolman S. R., Dalla-Favera R., (1984), *Science*, **224**, 1117—1121.
21. Brodeur G. M., Seeger R. T., Schwab M., Varmus H. E., Bishop J. M., (1984), *Science*, **224**, 1121—1124.
22. Leder P., Battey J., Lenoir G., Moulding C., Murphy W., Potter H., Stewart T., Taub R., (1983), *Science*, **222**, 765—771.
23. Klein G., (1983), *Cell*, **32**, 311—315.
24. Giallongo A., Appela E., Ricciardi R., Rovera G., Croce C. M., (1983), *Science*, **222**, 430—432.
25. Gerondakis S., Cory S., Adams J. M., (1984), *Cell.*, **36**, 973—982.
26. Hollis G. F., Mitchell K. F. Battey J., Potter H., Taub R., Lenoir G. M., Leder P., (1984), *Nature*, **307**, 752—755.
27. Stanton L. W., Yang J-Q., Eckhardt L. A., Harris L. J., Birshstein B. K., Marcu K. B., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 829—833.
28. ar-Rushdi A., Nishikura K., Erikson J., Watt R., Rovera G., Croce C. M., (1983), *Science* **222**, 390—393.
29. Taub R., Moulding C., Battey J., Murphy W., Vasicek T., Lenoir G. M., Leder P., (1984), *Cell*, **36**, 339—343.
30. Davis M., Malcolm S., Rabbits T. H., (1984), *Nature*, **308**, 286—288.
31. Dalla-Favera R., Martinotti S., Gallo R. C., Erikson J., Croce C. M., (1983) *Science*, **219**, 963—967.
32. Mushinski J. F., Potter M., Bauer S. R., Reddy E. P., (1983), *Science*, **220**, 795—798.

33. Stanton L. W., Fahrlander P. D., Tesser P. M., Marcu K. B., (1984), *Nature*, **310**, 423—424.
34. Hayday A. C., Gillies S. D., Saito H., Wood C., Wiman K., Hayward W. S., Tonegawa S., (1984), *Nature*, **307**, 334—340.
35. McClintock B., (1951), *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **16**, 13—47.
36. Goldschmidt R. B., (1951), *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **16**, 1—11.
37. Wilson A. C., Sarich V. M., Maxson L. R., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3028—3030.
38. Malonov G., Malonova Y., (1974), *Nature*, **237**, 33—34.
39. Clausen J. J., Syverton J. T., (1962), *J. Natl. Canc. Inst.*, **28**, 117—146.
40. Mitelman F., (1984), *Nature*, **310**, 325—327.
41. Mitelman F., (1983), *Cytogenet. Cell. Genet.*, **36**, 1—515.
42. Yunis J. J., (1983), *Science*, **221**, 227—236.
43. Gazin C., de Dinechin S. D., Hampe A., Masson J-M., Martin P., Stehelin D., Galibert F., (1984), *EMBO J.*, **3**, 383—387.
44. Watt R., Stanton L. W., Marcu K. B., Gallo R. C., Croce C. M., Rovera G., (1983), *Nature*, **303**, 725—728.
45. Colby W. W., Chen E. Y., Smith D. H., Levinson A. D., (1983), *Nature*, **301**, 722—725.

EWA KALINOWSKA *)

Ekspresja genów wprowadzonych do komórek ssaków metodą transfekcji

Expression of genes introduced into mammalian cells by transfection

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Markery genetyczne stosowane w badaniach nad transferem genów**
- III. Struktura genu kinazy tymidynowej (*tk*) wirusa *Herpes simplex* (HSV-1)**
- IV. Transfer genu *tk* wirusa HSV-1 do fibroblastów mysich linii LTK⁻ jako modelowy układ doświadczalny**
- V. Stabilność ekspresji genu *tk* wirusa HSV-1 w transformantach TK⁺**
- VI. Sekwencje DNA zwiększające częstość transformacji otrzymanych metodą transfekcji**
- VII. Kofekcja i ekspresja genów nieselekcjonowanych**
- VIII. Mutacje w genach wprowadzonych do komórek metodą transfekcji**
- IX. Zastosowanie transfekcji do badania transformacji nowotworowej**
- X. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Genetic markers used in the gene transfer studies**
- III. Structure of thymidine kinase gene (*tk*) of *Herpes simplex* virus type 1 (HSV-1)**
- IV. Transfer of HSV-1 *tk* gene into mouse fibroblast cell line LTK⁻ as a model system**
- V. Stability of HSV-1 *tk* gene expression in TK⁺ transformants**
- VI. DNA sequences enhancing frequency of transformations by transfection**
- VII. Cotransformation and expression of unselectable genes**
- VIII. Mutations in genes transferred by transfection**
- IX. Use of transfection to study of the malignant transformation**
- X. Final remarks**

* Mgr, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, 44-100 Gliwice.

I. Wstęp

Wiele terminów określających zjawiska lub metody stosowane w genetyce molekularnej ssaków pochodzi z genetyki molekularnej mikroorganizmów. W odniesieniu do komórek ssaków mają one nieco odmienne znaczenie. Dla uniknięcia niejasności podaję znaczenie kilku powszechnie używanych terminów. Przez „transfekcję” rozumiemy proces wprowadzenia do komórek — hodowanych w kulturze, egzogenego DNA, najczęściej sklonowanego w plazmidach. „Transformacja” oznacza zmiany fenotypowe komórek — biorców, powstałe w wyniku transfekcji. „Transformacja nowotworowa” — to przekształcenie komórek prawidłowych w nowotworowe, zarówno w wyniku przyjęcia egzogenego DNA, jak i w wyniku traktowania komórek prawidłowych czynnikami rakotwórczymi (chemicznymi, fizycznymi i biologicznymi). Komórki ssaków — w kulturach mogą przyjąć egzogeny DNA w wyniku fuzji z mikrokomórkami służącymi jako dawca DNA [1], przez endocytozę protoplastów bakteryjnych, zawierających zamplifikowane sekwencje badanego DNA [2], endocytozę liposomów zawierających DNA [3, 4], mikroiniekcję DNA bezpośrednio do jąder komórek biorców [5]. Najszersze zastosowanie znalazła metoda transfekcji komórek oczyszczonym DNA [6] lub fragmentami chromosomów [7, 8]. Ekspresja informacji zawartej w przyjętym DNA zachodzi w niewielkiej części populacji komórek-biorców. Odróżnienie komórek, które przyjęły egzogeny DNA od reszty populacji jest możliwe przez zastosowanie selektywnych pożywek hamujących wzrost komórek, które nie przyjęły egzogenego DNA i nie nabyły nowych cech pozwalających na wzrost w selektywnej pożywce.

II. Markery genetyczne stosowanie do pozytywnej selekcji transformantów

Najczęściej stosowanymi markerami w transformacji komórek ssaków są geny uczestniczące we wczesnych stadiach biosyntezy DNA. Należą do nich geny: kinazy tymidynowej (*tk*), fosforybozylotransferazy adeninowej (*aprt*), fosforybozylotransferazy hypoksantynowo-guaninowej (*hgprrt*) i reduktazy dihydrofolanowej (*dhfr*). Mutanty komórkowe, defektywne pod względem genów: *tk*, *aprt* i *hgprrt*, charakteryzują się dobrze zbadanymi i łatwymi do wykrycia właściwościami biochemicznymi. Komórki (TK⁻) wyrastają w pożywkach w obecności 5-bromodezoksyurydyny (BUdR), 5-fluorodezoksyurydyny (FUdR) lub trójfluorotymidyny (TPT), ponieważ z braku kinazy analogi ulegają włączeniu do DNA.

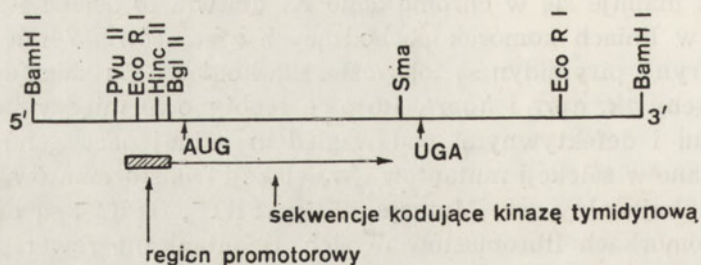
Komórki APRT mogą namnażać się w pożywkach z dodatkiem 8-aza-adeniny (8AA) lub 2-aminopuryny (DAP), a komórki HGPRT⁻ mogą być hodowane w obecności 6-tioguaniny (TG) lub 8-azaguaniny (8AG).

Gen *hgprt* mapuje się w chromosomie X; ułatwia to selekcję mutantów HGPRT⁻ w liniach komórek pochodzących z samców. Wymienione pochodne puryn i pirymidyn są toksyczne dla komórek posiadających funkcjonalne geny *tk*, *aprt* i *hgprt*. Różnice fenotypowe między komórkami normalnymi i defektywnymi pod względem jednej pary genów zostały wykorzystane w selekcji mutantów i w selekcji transformantów, które odzyskały funkcjonalny gen. Mutacje TK⁻, APRT⁻, HPRT⁻ są bardzo stabilne w komórkach fibroblastów mysich. Spontaniczne rewersje mutacji APRT⁻ lub HPRT⁻ zdarzają się raz na 1×10^8 komórek. W linii L fibroblastów mysich nigdy nie otrzymano rewersji mutacji TK⁻. Gen *dhfr* często ulega zwielokrotnieniu w komórkach hodowanych w pożywkach z dodatkiem wzrastających stężeń analogów kwasu foliowego, takich jak aminopteryna i ametopteryna (tzw. antyfoliany). DNA izolowany z komórek opornych na analogi kwasu foliowego zawiera wielokrotne kopie genu *dhfr*, co powoduje zwiększenie ich odporności na antyfoliany.

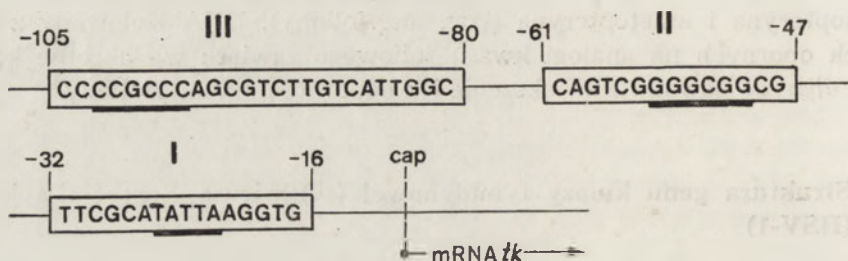
III. Struktura genu kinazy tymidynowej (*tk*) wirusa *Herpes simplex-1* (HSV-1)

Wirusowy gen kinazy tymidynowej (*tk*) wykazuje komplementację funkcji TK w komórkach TK⁻ zakażonych wirusem HSV-1 [9]. Kinaza tymidynowa wirusa HSV-1 różni się od komórkowej ruchliwością elektroforetyczną [10], wydajnością fosforylowania jododezoksycytydyny [11], zdolnością do fosforylowania acykloguanozyny [12] oraz własnościami serologicznymi.

Gen *tk* wirusa HSV-1 zlokalizowano we fragmencie obejmującym 3400 par nukleotydów, otrzymanym po trawieniu wirusowego DNA enzymem restrykcyjnym BamHI [13]. Fragment ten został następnie zklonowany w bakteryjnym plazmidzie pBR322. Namnażanie hybrydowych plazmidów — zawierających sekwencje genu *tk* wirusa HSV-1 nie znosiło funkcji genu kinazy tymidynowej, ponieważ w kulturach fibroblastów myszy linii LTK⁻ pojawiały się kolonie o fenotypie TK⁺ [14, 15, 16, 17]. Wirusowy gen *tk* może również ulegać ekspresji w komórkach *E.coli* TK⁻ transformowanych plazmidem niosącym gen *tk* HSV-1 [18]. Fragment BamHI DNA HSV-1 trawiono szeregiem endonukleaz restrykcyjnych i sprawdzano aktywność genu *tk* w krótszych odcinkach DNA. Sekwencje kodujące kinazę tymidynową mieszczą się we fragmencie DNA Pvu II — Sma I o długości około 1300 par nukleotydów [15, 19, 20, 21]. Mapę restrykcyjną fragmentu BamHI DNA wirusa HSV-1 przedstawia rycina 1. Miejsce inicjacji transkrypcji poprzedzone jest regionem obejmującym około 105 par zasad zawierającym elementy kontrolujące zarówno dokładne miejsce inicjacji jak i wydajność transkrypcji [22, 23]. Uproszczony schemat organizacji sekwencji poprzedzających gen *tk* HSV-1 pokazuje rycina 2. Region I



Ryc. 1. Mapa restrykcyjna fragmentu BamHI DNA wirusa HSV-1 (wg Colbere-Garapin, Chousterman, Horodniceanu, Kourilsky i Garapin — [15]).



Ryc. 2. Uproszczony schemat organizacji sekwencji DNA poprzedzających gen *tk* wirusa HSV-1. Regiony oznaczone I, II i III zawierają sygnały kontrolujące miejsce inicjacji i wydajność transkrypcji (wg McKnight — [24]).

wyznaczający miejsce inicjacji transkrypcji mRNA *tk* jest oddalony o 16 par zasad od sygnału „start” dla transkrypcji. W regionie tym znajduje się sekwencja typu „TATA box” homologiczna do sekwencji występującej w odległości 25—30 nukleotydów przed miejscem startu transkrypcji dla większości genów eukariotycznych. Regiony II i III zawierają sygnały warunkujące częstość inicjacji transkrypcji, ponieważ mutacje delecyjne w tych regionach powodują zmniejszenie wydajności transkrypcji. Zwiększenie odległości między regionami I, II i III przez insercję dodatkowych sekwencji również powoduje zmniejszenie wydajności transkrypcji. Mechanizm współdziałania sekwencji kontrolujących transkrypcję genu *tk* wirusa HSV-1 nie jest znany. Początkowo przypuszczano, że heksanukleotydowa sekwencja 5'CCGCCC-3' regionu III komplementarna w odwróconej orientacji do sekwencji 5'-GGGCGG-3' regionu II powodują zmianę konformacji DNA przez tworzenie jednołańcuchowej pętli (ang. *stem-loop*) i że tylko taka konformacja DNA gwarantuje wydajne tworzenie kompleksu z białkami uczestniczącymi w inicjacji transkrypcji [24]. Hipotetyczny mechanizm współdziałania powtarzających się sekwencji regionu II i III — odpowiedzialnych za wydajność transkrypcji mRNA kinazy tymidynowej nie znalazł potwierdzenia w wynikach dalszych badań, ogłoszonych w 1984 r. przez McKnighta — autora przytoczonej tutaj hipotezy.

W dalszych badaniach okazało się, że całkowite usunięcie regionu II i sprzężenie regionu III z regionem I, dwukrotnie zwiększa wydajność transkrypcji mRNA kinazy tymidynowej. Zmiana orientacji powtarzających się sekwencji regionu III — w mutantach z delecją od —32 do —80, dodatkowo zwiększa wydajność transkrypcji mRNA kinazy tymidynowej. W wirusowym genie *tk* nie ma intronów. Sekwencje kodujące łańcuch polipeptydowy kinazy tymidynowej stanowią nieprzerwany ciąg 1128 par nukleotydów [20, 21].

IV. Transfer genu *tk* wirusa HSV-1 do fibroblastów mysich linii LTK⁻ jako system modelowy

Najczęściej stosowaną, w wielu przypadkach najwygodniejszą metodą przeniesienia genu *tk* jest transfekcja komórek biorców LTK⁻ hybrydowym plazmidem zawierającym gen *tk* wirusa HSV-1. Transformujący DNA w formie osadu wapniowo-fosforanowego jest dodawany do hodowli komórek-biorców. Osad DNA najczęściej sporządza się z dodatkiem wielkocząsteczkowego DNA służącego jako nośnik [15]. Selekcję klonów TK⁺ przeprowadza się w pożywce z dodatkiem hypoksantyny, aminopteryny i tymidyny (HAT) [26, 27]. Ekspresja genu *tk* zależy od tego, czy gen *tk* nie został uszkodzony w procesie rekombinacji z DNA gospodarza i czy uległ integracji we właściwej konfiguracji i we właściwym miejscu w chromosomie. Częstość transformacji zależy także od stanu fizycznego DNA plazmidu. Plazmid pAGO w formie liniowej transformował komórki LTK⁻ z wydajnością 2—3 razy większą niż ten sam plazmid w formie kolistej [15]. Funkcja DNA nośnikowego nie jest dokładnie poznana. DNA transformujący łączy się kowalencyjnie z nośnikowym DNA tworząc kontakteryjne struktury o wielkości do 2×10^6 par nukleotydów [28]. Sekwencje ograniczające selekcyjowany marker pochodzą z nośnikowego DNA. Można przypuszczać, że ogromna liczba powtarzających się sekwencji pochodzących z nośnikowego, wielkocząsteczkowego DNA stymuluje integrację przez zapoczątkowanie homologicznej rekombinacji w miejscach bogatych w powtarzające się sekwencje. Hipotezę tę zdają się potwierdzać wyniki doświadczeń, w których używano nośnikowego DNA o znanej sekwencji nukleotydów, takiego jak DNA SV40 czy DNA pBR332 [29]. Analiza miejsca wiązania nośnikowego DNA z DNA markera selekcyjowanego (gen *tk*) wskazuje, że proces rekombinacji najprawdopodobniej zachodzi w miejscu homologii między sekwencjami pBR322 a *tk* obejmującym 16—19 par zasad:

pBR322 GGCAGCGTTGGGTCCT GGC
HSV *tk* GGC TCGCTGGGTCCTAGGC

W przypadku transformacji fibroblastów myszy LTK⁻ genem *tk* HSV-1 w obecności nośnikowego DNA nie stwierdzono specyficznych miejsc integracji *tk* HSV-1 z chromosomalnym DNA gospodarza [30]. Natomiast w komórkach ludzkich TK⁻ HeLa (BU25) traktowanych fragmentem DNA o długości 2000 par nukleotydów zawierającym gen *tk* HSV-1, sekwencje genu *tk* HSV-1 były wbudowane w chromosom 5 [31].

Częstość transformacji zależy również od rodzaju komórek biorców. Najwyższą wydajność transformantów TK⁺ otrzymano w klonie 10 linii LTK⁻ fibroblastów mysich. Inne linie komórek TK⁻, jak np. komórki złośliwego potworniaka myszy [32] czy komórki mysiego szpiku kostnego [27] okazały się gorszymi biorcami egzogennego DNA. Obecnie nie można wyjaśnić tak znacznych różnic w wydajności transformacji.

V. Stabilność ekspresji genu *tk* wirusa HSV-1 w transformantach TK⁺

Komórki transformantów TK⁺ pochodzące z jednej kolonii mogą, po kilku pasażach w pożywce nieselekcjonującej, tracić zdolność do syntezy kinazy tymidynowej. Nie oznacza to jednak, że przyjęty przez nie gen *tk* został utracony, ponieważ część komórek takich populacji ponownie odzyskuje cechę TK⁺ (TK⁺ → TK⁻ → TK⁺) [33]. Komórki transformantów TK⁺ posiadające wielokrotne kopie genu *tk* wirusa HSV-1, wbudowane w chromosomalny DNA nie zmieniają fenotypu [34]. Ekspresja wielu genów w komórkach zwierzęcych zależy od stopnia ich metylacji. Sekwencje genu *tk* w klonach transformantów o fenotypie TK⁺ są słabo metylowane [35]. Przepuszczalnie w DNA wyższych kręgowców występują rejony, w których metylacja zasad zdarza się znacznie częściej niż w pozostałych obszarach. Jeśli obcy DNA wbuduje się w chromosom w rejonie silnej metylacji, to też zostanie zmetylowany. Metylacja *in vitro* plazmidu zawierającego DNA wczesnego regionu wirusa SV40 i gen *tk* HSV-1 redukowała ekspresję genu *tk*, natomiast nie wywierała wpływu na syntezę antygenu T kodowanego przez wczesny region wirusa SV40 [36]. Utrata fenotypu TK⁺ w klonach transformantów może również wynikać ze zmian w strukturze chromatyny w miejscu integracji genu *tk* [37]. Ekspresję genu *tk* w komórkach transformantów, które zmieniły fenotyp na TK⁻ można uzyskać działaniem 5-azacytydyny — czynnika blokującego metylację w sekwencjach CpG [38]. Zmiana fenotypu TK⁺ na TK⁻ może być konsekwencją zarówno metylacji jak i mutacji w obrębie genu *tk* lub w jego bezpośrednim sąsiedztwie.

VI. Sekwencje DNA zwiększające częstość transformacji

Długie, powtarzające się sekwencje DNA, ograniczające prowirusowy genom retrowirusów (LTR) mogą aktywować ekspresję heterologicznych genów, które zostały pozbawione własnych sekwencji promotorowych. LTR wirusa nekrozy śledziony myszy wyizolowanego przez Friend (FSFFV) przyłączone do regionu DNA, kodującego kinazę tymidynową wirusa HSV-1, w odległości 200 par nukleotydów przed miejscem inicjacji transkrypcji mRNA, całkowicie zastępują region promotorowy genu *tk*. Zarówno zwiększenie odległości między LTR wirusa FSFFV a regionem kodującym genu *tk*, jak i zmiana orientacji tych sekwencji względem siebie całkowicie znoszą zdolność do syntezy mRNA kinazy tymidynowej. Przyłączenie LTR wirusa FSFFV do fragmentu DNA HSV-1, obejmującego sekwencje promotorowe i kodujące genu *tk*, wydajnie zwiększa częstość transformacji $TK^- \rightarrow TK^+$ niezależnie od orientacji obu sekwencji względem siebie. Pod warunkiem jednak, że przy tej samej orientacji odległość między nimi wynosi około 1200 par zasad, a w przypadku LTR przyłączonych do końca 3' genu *tk* w odwróconej orientacji odległość ta nie może być większa niż 200 par nukleotydów [39]. LTR retrowirusów białaczki mysiej Moloney'a (MoMLV) zwiększają 10–20 krotnie częstość stabilnych transformantów TK^+ niezależnie od ich umiejscowienia i orientacji w stosunku do genu *tk*. Za zwiększenie częstości transformacji odpowiedzialne są tandemowe powtarzające się sekwencje występujące w LTR. Transfer genów nieselekcjonowanych nie sprzężonych z plazmidem niosącym LTR również zachodził z wyższą częstością. Zwiększenie częstości transformacji nie było związane ani ze zwiększoną wydajnością integracji egzogenego DNA z chromosomalnym DNA gospodarza ani z podwyższonym poziomem transkrypcji [40]. Obecność sekwencji LTR może zwiększać częstość powstawania "prześciowych" transformantów lub w jakiś sposób ułatwiać "prześciowym" transformantom stabilizację stanu transformacji.

VII. Kotransformacja i ekspresja genów nieselekcjonowanych

Przedstawiony dotychczas system obejmuje tylko geny kodujące biochemiczne funkcje komórek wyróżniające je fenotypowo w warunkach hodowli *in vitro*. Ponieważ transformacja zachodzi w niewielkiej części populacji komórek traktowanych egzogenym DNA, można założyć, że podobnie jak w transformacji bakterii w procesie tym uczestniczą tylko komórki „kompetentne” — zdolne do pobrania egzogenego DNA. Stwarza to szerokie możliwości badania nieselekcjonowanych sekwencji DNA, podawanych komórkom jednocześnie z markerem selekcjonowanym. W tego typu doświadczeniach gen *tk* HSV-1 służy jako marker umożliwiający selekcję transformantów. Chromosomalny DNA części klonów TK^+ za-

wiera sekwencje innych genów przyjęte przez komórki jednocześnie z genem *tk* [41, 42, 43]. W badaniu ekspresji genów nieselekcjonowanych, wprowadzonych do komórek z markerem selekcjonowanym należy uwzględnić, czy badany gen ulega normalnej ekspresji w komórkach nie podlegających różnicowaniu np. w fibroblastach, czy tylko w specyficznych komórkach zróżnicowanych. Gen kodujący antygen T wirusa SV40 sprzężony z genem *tk* w plazmidzie pOT ulega ekspresji w różnym stopniu nie tylko w różnych klonach, lecz także w poszczególnych komórkach tego samego klonu TK⁺ [44]. Różnice w ekspresji genu kodującego antygen T tłumaczy się różnymi miejscami integracji z chromosomalnym DNA gospodarza. Geny ulegające normalnej ekspresji tylko w komórkach swoiście zróżnicowanych mogą również w pewnym stopniu ulegać ekspresji w fibroblastach mysich linii L. Gen β -globiny królika sprzężony w wektorze plazmidowym z genem *tk* HSV-1, występuje w transformantach TK⁺ w licznych kopiach, a ilość cząsteczek mRNA β -globiny sięga 2000 na komórkę [45]. Ekspresja genu owalbuminy kurzej w transformantach fibroblastów myszy — otrzymanych w wyniku transfekcji plazmidem zawierającym gen owalbuminy sprzężony z genem *tk* HSV-1 jest również bardzo wydajna. Transformanty TK⁺ mogą wytwarzać do 100 000 cząsteczek owalbuminy [46], jednak transkrypt tego genu w ich komórkach jest o 650 nukleotydów dłuższy od oryginalnego mRNA owalbuminy kurzej [47]. Wyniki badań ekspresji w fibroblastach mysich genów, dla których normalnym środowiskiem są wyspecjalizowane zróżnicowane komórki wskazują, że „splicing” mRNA takich genów zachodzi prawidłowo nawet w środowisku dla nich nienaturalnym, natomiast inicjacja transkrypcji nie zawsze jest prawidłowa [48, 49, 50]. Zastosowanie fibroblastów myszy w badaniach ekspresji specyficznych genów nie zawsze jest uzasadnione. Być może, bardziej właściwe do tego typu badań są komórki o zachowanej zdolności różnicowania. Ciekawe możliwości badawcze stwarzają komórki złośliwego potworniaka myszy (*teratocarcinoma*). Komórki te wszczepione do zarodków myszy we wczesnych stadiach rozwoju, ulegają różnicowaniu i nie zaburzają normalnego rozwoju zwierzęcia. Przeniesienie transformantów otrzymanych w hodowli *in vitro* do organizmu zwierzęcia pozwoli na dokładniejsze poznanie mechanizmów kontrolujących ekspresję genów ssaków [51]. Prawidłowa i wydajna transkrypcja genów komórek eukariotycznych jest w dużym stopniu zależna od odległości sekwencji promotorowych od końca 5' części kodującej genu. Regiony promotorowe mogą w sposób niespecyficzny aktywować sekwencje kodujące różne białka. Promotor α wirusa HSV-1 może zastąpić region promotorowy genu *tk* oraz może regulować transkrypcję genu owalbuminy kurzej [52, 53]. Sprzężenie genów z silnymi promotorami umożliwi badanie ekspresji takich genów, które w normalnych warunkach wymagają obecności specyficznych czynników, np. hormonów lub genów o bardzo słabych własnych promotorach.

VIII. Mutacje w genach wprowadzonych do komórek metodą transfekcji

Egzogenny DNA podlega w komórkach-biorcach różnorodnym modyfikacjom. Najczęściej powstają pęknięcia w obydwu niciach heliksu oraz modyfikacje wolnych końców [54]. Tylko niewielka część przyjętego przez komórkę DNA przedostaje się do jądra, gdzie może być włączona do genomu gospodarza. Wbudowanie egzogenego DNA do chromosomów komórek-biorców zależy od stopnia homologii sekwencji uczestniczących w procesie rekombinacji. W somatycznych komórkach ssaków zachodzą rekombinacje zależne zarówno od obecności dużych odcinków homologicznych, jak i rekombinacje specyficzne dla miejsca to znaczy takie, w których homologia dotyczy tylko kilkunastu par nukleotydów [55]. Badano również mutacje w genach bakterii wprowadzonych do komórek ssaków. Geny bakterii zostały zklonowane w hybrydowych plazmidach, zawierających dodatkowo fragment wirusa SV40 obejmujący region inicjacji replikacji i „wczesne geny” wirusa. Plazmidy takie (ang. *shuttle vectors*) — wprowadzane do komórek ssaków wrażliwych na wirus SV40 wbudowują się do chromosomów komórek-biorców. Po odpowiedniej obróbce endonukleazami chromosomalnego DNA komórek-biorców, odzyskiwano sekwencje plazmidowe. Odzyskany z komórek DNA plazmidowy służył do transformacji bakterii. Kolonie transformantów bakterii wyrastały na odpowiedniej pożywce selekcyjnej. Namnażano bakterie z pojedynczych kolonii transformantów, izolowano z nich DNA plazmidowy i badano zmiany w strukturze genu bakterii „pasażowanego” przez komórki ssaków. W genach bakterii (*galK*; *lac I*) badanych tą metodą występowały delecje, insercje i zmiany sekwencji zasad nie wpływające na wielkość plazmidów [56, 57]. Obecnie nie można jednoznacznie interpretować otrzymanych wyników, ponieważ zmiany w strukturze genów bakterii mogły powstać zarówno w komórkach ssaków, jak i w trakcie odzyskiwania sekwencji plazmidowych z komórkowego DNA.

IX. Zastosowanie transfekcji do badania transformacji nowotworowej

Transformacja nowotworowa w komórkach hodowanych *in vitro* wyraża się zmianami morfologicznymi komórek i ich kolonii, zdolnością wzrostu w miękkim agarze i mniejszym zapotrzebowaniem na surowicę w pożywce. Komórki takie są zdolne do wzrostu w postaci nowotworowych guzów u zwierząt laboratoryjnych. Informacje dotyczące wyników pierwszych badań transformacji nowotworowej przy użyciu metody transfekcji zostały przedstawione przez Weinberga [58]. W badaniach tych biorcami transformującego DNA były fibroblasty mysie linii NIH 3T3.

DNA izolowany zarówno z linii komórek transformowanych chemicznymi związkami rakotwórczymi, jak i DNA z wielu naturalnych nowotworów ludzkich takich jak rak pęcherza moczowego, rak jelita grubego, rak płuca — wprowadzony do komórek NIH 3T3 metodą transfekcji może indukować transformację nowotworową [59, 60]. Za nieodwracalne zmiany o charakterze nowotworowym odpowiedzialne są sekwencje komórkowego DNA zawierające komórkowe geny *onc* (*c-onc*). Geny te występują w normalnych komórkach zarówno ssaków naczelnych jak i prostych strunowców, a funkcja ich jest związana, najpewniej z regulacją wzrostu komórek [61, 62, 63]. Geny transformujące, zidentyfikowane w różnych ludzkich nowotworach są homologiczne z pewnymi genami zwierzęcych wirusów transformujących. Gen *c-onc* raka pęcherza człowieka jest homologiczny z genem *v-Ha-ras* wirusa mięsaka myszy wyizolowanego przez Harvey'ego natomiast onkogen raka płuca człowieka jest homologiczny z genem *v-Ki-ras* innego wirusa mięsaka myszy wyizolowanego przez Kirsten'a [64, 65]. W linii komórek EJ pochodzących z raka pęcherza moczowego człowieka, fragment DNA odpowiedzialny za transformację obejmuje 6 600 par nukleotydów i jest homologiczny z sekwencjami transformującymi wykrytymi w komórkach linii T24 raka pęcherza moczowego człowieka [66, 67, 68]. Ekspresja onkogeny w komórkach linii T24 jest wielokrotnie wzmożona w porównaniu z ekspresją w komórkach normalnych [69], a jego aktywacja jest efektem mutacji punktowej. W wyniku mutacji w łańcuchu polipeptydowym kodowanym przez gen *ras* w miejscu glicyny znajduje się walina (70,71). Przenoszenie cech nowotworowych do hodowanych *in vitro* fibroblastów myszy linii NIH 3T3 umożliwia identyfikację sekwencji odpowiedzialnych za transformację [72, 73]. Struktura onkogenów komórkowych i ich rola w nowotworach człowieka są szeroko omówione w artykule Chorążego i Szali, ogłoszonym w Post. Bioch. [74].

X. Uwagi końcowe

Klonowanie DNA ssaków w wektorach plazmidowych i wprowadzanie genów lub ich fragmentów, do komórek ssaków w kulturach — pozwoliło na zrozumienie wielu procesów zachodzących w genomach ssaków. Częstość transformacji w komórkach ssaków w wyniku traktowania kultur egzogennym DNA zależy w dużym stopniu od linii komórek-biorców DNA. W ogromnej większości dotychczas prowadzonych badań komórkami-biorcami DNA były fibroblasty myszy linii L i fibroblasty myszy linii NIH 3T3, ponieważ ekspresja „obcych” genów jest w tych komórkach wydajna. Nasuwa się jednak pytanie, dlaczego komórki tych dwóch linii tak często ulegają transformacjom? Podejrzewa się, że w genomach fibroblastów linii L i fibroblastów linii NIH 3T3 zaszły zmiany ułatwiające ekspresję wprowadzonych genów. Fibroblasty linii L — w kulturach, mają

wszystkie cechy komórek prawidłowych. Jednak, w komórkach tych, oprócz mutacji (TK⁻, APRT⁻, HGPRT⁻) mogły dodatkowo zajść inne trwałe zmiany — ułatwiające ekspresję egzogenego DNA. Fibroblasty linii NIH 3T3, w kulturach nie traktowanych żadnymi czynnikami, często samorzutnie zmieniają morfologię kolonii, a wszczepione zwierzętom doświadczalnym indukują guzy. Dalszy postęp w zrozumieniu mechanizmów ekspresji genów w komórkach ssaków może ułatwić zastosowanie innych metod wprowadzania DNA do komórek, jak na przykład mikroiniekcja DNA do jąder komórek lub zastosowanie innych linii komórek-bioreców DNA. Pewne nadzieje wzbudzają również próby skonstruowania nowych wektorów plazmidowych zawierających geny dominujące w komórkach ssaków. Zastosowanie takich plazmidów jako markerów transformacji pozwoli na selekcję transformantów w populacjach niezmutowanych komórek-bioreców DNA [75].

Serdecznie dziękuję Panu Prof. dr Mieczysławowi Chorążemu za przeczytanie maszynopisu i cenne uwagi oraz Pani Annie Jojko za pomoc techniczną w przygotowaniu maszynopisu.

Zaakceptowano do druku 27 marca 1985 r.

PIŚMIENICTWO

1. Smiley J. H., Steege D. A., Jurriczek D. K., Summers W. P., (1980), *Cell* **15**, 455—468.
2. Schafner W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2163—2167.
3. Wong T. K., Nicolau C., Hofschneider P. H., (1980), *Gene* **10**, 87—91.
4. Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10431—10435.
5. Capecchi M., (1980), *Cell* **22**, 479—488.
6. Graham F. L., van der Eb A. J., (1973), *Virology* **52**, 456—467.
7. McBride O. W., Peteson J., (1980), *Ann. Rev. Genet.* **14**, 321—345.
8. Klobutcher L. A., Ruddle F. H., (1981), *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 533—541.
9. Munyon W., Kraiselburd E., Davis M., Mann J., (1971), *J. Virol.* **7**, 813—820.
10. Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R., (1978), *Cell* **14**, 725—731.
11. Summers W. C., Summers W. P., (1977), *J. Virol.* **24**, 314—318.
12. Crumpacker C. S., Chartrand P., Subak-Sharpe J., Wilkie N. M., (1980), *Virology* **105**, 171—184.
13. Wigler M., Silverstein S., Leu L. S., Pellicer A., Cheng Y. C., Axel B., (1977), *Cell* **11**, 223—232.
14. Enquist L., Vande Woude C., Wagner M., Smiley J., Summers W. C., (1979), *Gene* **7**, 335—342.
15. Golbere-Garapin F., Chousterman S., Horodniceanu F., Kourilsky P., Garapin A. A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3755—3759.

16. Kit S., Quavi H., Hazen M., Trkula D., Otsuka H., (1981) *Virology* **113**, 452—464.
17. Wilkie N. H., Clements J. B., Boll W., Mantel N., Lonsdale D., Weissman C., (1979), *Nucl. Ac. Res.* **7**, 859—877.
18. Garapin A. C., Colbere-Garapin F., Cohen-Solal M., Horadniceanu F., Kourilsky P., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 815—819.
19. McKnight S., Gavis E. R., (1980), *Nucl. Ac. Res.* **8**, 5931—5948.
20. McKnight S., (1980), *Nucl. Ac. Res.* **8**, 5949—5964.
21. Wagner M. J., Sharp J. A., Summers W. C., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1441—1445.
22. McKnight S., Gavis E. R., Kingbury R., (1981), *Cell*, **25**, 385—398.
23. Sweet R. W., Chao M. W., Axel R., (1982), *Cell* **31**, 347—353.
24. McKnight S., (1982), *Cell* **31**, 355—365.
25. McKnight S., Kingsbury R. C., Spence A., Smith M., (1984), *Cell*, **37**, 253—262.
26. Szybalski E. H., Szybalski W., (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 2026—2034.
27. Merkola K. E., Stang H. D., (1980), *Science* **208**, 1033—1035.
28. Perucho M., Hanahan D., Wigler M., (1980), *Cell* **22**, 309—317.
29. Anderson R. A., Krahauser T., Camerini-Ottero R. D., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2748—2752.
30. Pellicer A., Wigler M. Axel R., Silverstein S., (1978), *Cell* **14**, 133—141.
31. Kit S., Hazen M., Otsuka H., Quavi H., Trkula D., Del Rose Dubs (1981), *Int. J. Canc.* **28**, 767—776.
32. Pellicer A., Wagner E. F., El Karab A., Dewey M. J., Heuser A. J., Silverstein S., Axel R., Mintz B., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2098—2102.
33. Pellicer A., Robins D., Wold B., Sweet R., Jackson J., Lowy I., Roberts J. M., Sim G. K., Silverstein S., Axel R., (1980), *Science*, **209**, 1414—1422.
34. Huttner K. J., Barbosa J. A., Scangos G. A., Pratcheva D., Ruddle F., (1981), *J. Cell Biol.* **91**, 153—156.
35. Pollack Y., Stein R., Razin A., Cedar H., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6463—6467.
36. Waetcher D. E., Baserga R., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1106—1110.
37. Davies R. L., Funker-Krusi S., Kucherlapati R. S., (1982), *Cell* **31**, 521—529.
38. Clough D. W., Kunkel L. M., Davidson R. L., (1982), *Science* **216**, 70—73.
39. Jolly D. J., Esty A. C., Subramani S., Friedmann T., Verma I. M., (1983), *Nucl. Ac. Res.* **11**, 1855—1873.
40. Joyner A., Yamamoto Y., Berenstein A., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1573—1577.
41. Wigler H. Sweet R., Sim G. K., Wold B., Pellicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., Axel R., (1979), *Cell* **16**, 777—785.
42. Robins D. M., Rijsley S., Binetruy B., Cuzin F., (1981), *Cell* **23**, 29—39.
43. Wold B., Wigler M., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., Axel R. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5684—5688.

44. Hanahan D., Lane D., Lipieh L., Wigler M., Botchan M., (1980), *Cell* 21, 127—139.
45. Mantei N., Boll W., Weissmann C., (1979), *Nature*, 281, 40—46.
46. Lai E. C., Woo S. L. C., Bordelon-Riser M. E., Fraser T. H. O'Malley B. W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 244—248.
47. Breathnaeh R., Mantei N., Chambon P., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 740—744.
48. Mulligan R. C., Howard B. H., Berg P., (1979), *Nature*, 247, 108—114.
49. Hammer D. H., Leder P., (1979), *Nature*, 281, 35—40.
50. Anderson W. F., Killes L., Sanders Haigh L., Kretsehamer P. J. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5399—5404.
51. Wagner E. F., Mintz B., (1982), *Mol. Cell. Biol.* 2, 190—198.
52. Post L. E., Mackem S., Roizman B., (1981), *Cell*, 24, 555—565.
53. Post L. E., Norrild B., Simpson T., Roizman B., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, 2, 233—240.
54. Wake C. T., Gudewicz T., Pouter T., White A., Wilson J. M., (1984), *Mol. Cell. Biol.*, 4, 387—398.
55. Subramani S., Berg P., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3, 1040—1052.
56. Razzaque A., Mizusawa H., Seidman M. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3010—3014.
57. Calos M. P., Lebkowski J. S., Botehan M. R., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3015—3019.
58. Weinberg R. A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 651, 25—35.
59. Cooper G. M., Okenquist S., Silverman, (1980), *Nature*, 284, 418—421.
60. Krontiris T. G., Cooper G. M., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1181—1184.
61. Ellis R. W., DeFe O. D., Shih T., Gonda M. A., Young H. A., Tsuchida N., Lowy D. R., Scolnic E. M., (1981), *Nature*, 292, 506—511.
62. Chang E. M., Furth H. R., Scolnic E. M., Long D. R., (1982), *Nature* 297, 479—483.
63. Eva A., Robbins K. C., Anderson P. R., Srinivasan A., Tronick S. R., Redoly E. P., Ellmore N. W., Galen A. T., Lautenberger J. A., Papas T. S., Westin E. H., Wong-Staal P., Gallo R. C., Aaronson S. A., (1982), *Nature*, 295, 116—119.
64. Der C. J., Krontiris T. C., Cooper G., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3637—3640.
65. Parada L. F., Tabin C. J., Shih C., Weinberg R. A., (1982), *Nature*, 297, 474—479.
66. Shih C., Weinberg R. A., (1982), *Cell*, 29, 161—169.
67. Goldfarb M., Shimizu K., Perucho M., Wigler M., (1982), *Nature*, 296, 404—409.
68. Pulciani S., Santos E., Lauver A. V., Long L. K., Robbins K. C., Barbacid M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2845—2849.
69. Santos E., Tronick S. R., Aaronson S. A., Pulciani S., Barbacid M., (1982), *Nature*, 298, 343—347.
70. Reddy E. P., Reynolds R. K., Santos E., Barbacid M., (1982), *Nature*, 300, 149—152.
71. Taparowsky E., Suard Y., Fasano O., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M., (1982), *Nature*, 300, 762—765.

72. Lane M. A., Sainten A., Cooper G., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5185—5189.
73. Der C. J., Cooper G., (1983), *Cell*, **32**, 201—208.
74. Chorąży M., Szala S., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 261—298.
75. Colbere-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky F., Garapin A. C., (1981), *J. Mol. Biol.*, **150**, 1—14.

JANUSZ GREGER *)

Enzymy uczestniczące w metabolizmie 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach

Mitochondrial enzymes participating in 2'-deoxynucleotide metabolism

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Enzymy katalizujące syntezę 2'-deoksyrybonukleozydo 5' monofosforanów
- III. Enzymy katalizujące syntezę 2'-deoksyrybonukleozydo 5' di- i trifosforanów
- IV. Hydrolazy
 - IV-1. Fosfohydrolazy
 - IV-2. Aminohydrolazy
- V. Regulacja syntezy 2'-deoksynukleotydów
 - V-1. Regulacja aktywności kinaz 2'-deoksyrybonukleozydów
 - V-2. Regulacja aktywności kinaz 2'-deoksyrybonukleozydo 5' mono i difosforanów
 - V-3. Regulacja aktywności fosfohydrolaz i aminohydrolaz
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Enzymes catalysing 2'-deoxyribonucleoside 5' monophosphate synthesis
- III. Enzymes catalysing 2'-deoxyribonucleoside 5' di and triphosphate synthesis
- IV. Hydrolases
 - IV-1. Phosphohydrolases
 - IV-2. Aminohydrolases
- V. Regulation of 2'-deoxynucleotide synthesis
 - V-1. Regulation of 2'-deoxyribonucleoside kinase activities
 - V-2. Regulation of 2'-deoxyribonucleoside 5' mono and diphosphate kinase activities
 - V-3. Regulation of phosphohydrolases and aminohydrolases activities
- VI. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: (Poza powszechnie stosowanymi symbolami rybo i 2'-deoksyrybonukleotydów) Ado — adozyna, Guo — guanozyna, Ino — inozyna, dAdo — deoksyadenozyna, dGuo — deoksyguanozyna, dIno — deoksyinozyna, dCyd —

*) Doc. dr hab., Zakład Chemii Ogólnej Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, 90-131 Łódź, ul. Lindleya 6

deoksycytydina, dThd — tymidyna, ara Ado — 9 N β D arabofuranozydoadenina, PRibPP — 1 difosfo 5 fosfo — α D rybofuranoza, NDP-aza — nukleozydodifosfataza, mDNA — mitochondrialny DNA

I. Wstęp

Jedną z konsekwencji wykrycia mitochondrialnego DNA i jego odrębności był wzrost zainteresowania sposobami, jakimi mitochondria syntezują swój genom. Zainteresowania te ogniskowały się zarówno wokół mechanizmów replikacji DNA [1], jak i szlaków syntezy prekursorów DNA. Dane lat siedemdziesiątych i początku lat osiemdziesiątych wskazują, że pomiędzy metabolizmem 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach i w cytosolu zachodzą wyraźne różnice. Tak więc mitochondria, nie posiadając zdolności syntezy puryn i pirymidyn *de novo*, muszą wykorzystywać 2'-deoksyrybonukleozydy zawarte w cytosolu do syntezy 2'-deoksyrybonukleotydów, przy czym wiodącą drogą syntezy tych związków jest fosforylacja 2'-deoksyrybonukleotydów oraz ich 5'fosforanów. Fosfohydrolazy i aminohydrolazy, będące głównymi mitochondrialnymi enzymami uczestniczącymi w katabolizmie 2'-deoksyrybonukleotydów i 2'-deoksynukleotydów, ukierunkowują z kolei metabolizm tych związków, stając się zarazem przyczyną jego ograniczenia. Mechanizmy kontroli syntezy i katabolizmu 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach opierają się przede wszystkim na sprzężeniach zwrotnych i regulacji aktywności enzymów przez produkty przemian 2'-deoksyrybonukleotydów i 2'-deoksynukleotydów. Niniejszy artykuł stanowi próbę przedstawienia metabolizmu 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach, uwzględniającą przede wszystkim najnowsze dane dotyczące enzymów katalizujących przemiany tych związków.

II. Enzymy katalizujące syntezę 2'-deoksyrybonukleozydo 5'-monofosforanów

Badając subkomórkowe rozmieszczenie aktywności enzymatycznej, która w obecności ATP i jonów Mg^{2+} katalizuje reakcję fosforylacji tymidyny wykazując cechy kinazy. B a u g n e t - M a h i e u i w s p. [2] stwierdzili, że w wątrobie szczura w 20 godzin po częściowej hepatektomii, 3,5% całkowitej aktywności katalizującej syntezę dTMP zawarte jest w mitochondriach. Rozwijając te spostrzeżenia B e r k i w s p. [3, 4], a następnie K i t i w s p. [5] w kilka lat później wykazali, że komórki L zmutowane przez 5 bromo 2'-deoksyurydynę tracą zdolność włączania znakowanej tymidyny do jądrowego DNA, zachowując jednak zdolność włączenia jej do DNA mitochondriów. Konsekwencją tych stwierdzeń było

podjęcie prac, które wykazały, że cytosolowa i mitochondrialna kinaza tymidynowa (5'-fosfohydrolaza ATP: tymidyna, EC 2.7.1.21) są odmiennymi białkami enzymatycznymi. Stwierdzone różnice pomiędzy obu enzymami dotyczą wielkości cząsteczek (83—95 kD enzym cytosolowy, 60—70 kD enzym mitochondrialny) [6—8], odmiennej wrażliwości na naturalne inhibitory enzymu, jakimi są dTTP i dCTP, a także różnej aktywności wobec donorów HPO_4^{2-} oraz swoistości substratowej. I tak cytosolowa kinaza tymidynowa katalizująca fosforylację tymidyny i deoksyurydyny hamowana jest przez dTTP, niewrażliwa natomiast na dCTP i aktywna tylko w obecności ATP i jonów Mg^{2+} ; enzym mitochondrialny katalizuje syntezę dTMP i dCMP, traci aktywność zarówno w obecności dTTP jak i dCTP, natomiast w obecności jonów Mg^{2+} przenosi resztę HPO_4^{2-} na tymidynę i deoksycytydynę nie tylko z ATP, lecz także z UTP, CTP i GTP [8]. Różnice ruchliwości elektroforetycznej oraz wyniki ogniskowania izoelektrycznego obu kinaz wraz z wymienionymi wyżej odmiennymi wartościami mas molowych i wrażliwościami enzymów z cytosolu i mitochondriów na inhibitory i donory HPO_4^{2-} , pozwoliły na wyodrębnienie trzech naturalnych izoenzymów kinazy tymidynowej [9]. Pierwszy z tych izoenzymów, kinaza tymidynowa F, stanowiąca główną frakcję aktywności fosforylującej tymidynę występuje przede wszystkim w cytosolu, hamowana przez dTTP, niewrażliwa jest na dCTP i aktywna jedynie w obecności ATP i jonów Mg^{2+} [10]. Drugi izoenzym, kinaza tymidynowa A, przeważająca w mitochondriach, prócz dTTP hamowana jest także przez dCTP, a w środowisku zawierającym jony Mg^{2+} wykazuje aktywność wobec ATP, GTP i UTP [8—10]. Trzeci izoenzym, kinaza tymidynowa B wykazuje znaczne podobieństwo do izoenzymu F a różni się od niego jedynie ruchliwością elektroforetyczną oraz tym, że występuje niemal wyłącznie w mitochondriach [9—10]. Kinazy tymidynowa F i A kodowane są przez genom jądrowy [11, 17], natomiast izoenzym B, będący prawdopodobnie zmodyfikowaną odmianą izoenzymu A [9, 12], kodowany jest przez genom mitochondrialny [17]. Powinowactwo mitochondrialnej kinazy tymidynowej A do tymidyny jest na ogół mniejsze niż cytosolowego izoenzymu F [4, 13—16]. Miejscem występowania mitochondrialnej kinazy tymidynowej A jest *matrix* mitochondrialna, gdzie zawarte jest około 70% aktywności enzymu [9], obecna jest ona jednak także w błonie wewnętrznej, przy czym 20% tej aktywności stanowi izoenzym B [9, 17].

Komórki LMTK⁻ (tzn. takie, które pozbawione są aktywności kinazy tymidynowej) infekowane wirusem opryszczki HSV-1, zaczynają syntetyzować kinazę tymidynową [18, 19] różniącą się od naturalnych komórkowych kinaz tymidynowych A, F i B, tym że katalizuje także fosforylację dTMP i wielu pochodnych guaniny [20—22]. Jedną z tych pochodnych, znana jako acykloguanozyna (9-/2 hydroksyetoksymetylo-/guanina) wykazuje bardzo silne właściwości przeciwwirusowe. Fosforylacja acykloguanozyny do 3' monofosforanu, zapoczątkowująca łańcuch fosforylacji

prowadzący do acykloguanozyno 3'trifosforanu (hamującego kodowaną przez wirusa polimerazę DNA [23]), możliwa jest dzięki kinazie tymidynowej, którą komórka syntetyzuje na genomie HSV-1.

Oprócz dTMP i dCMP na drodze fosforylacji dThd i dCyd przez kinazy tymidynowe A i B, dTMP może być syntetyzowany w mitochondriach w wyniku przeniesienia grupy metylowej z metylenotetrahydrofolianu na dUMP w reakcji katalizowanej przez syntazę tymidylanową. Enzym ten (C-metylenotransferaza metylenotetrahydrofolian : dUMP, EC 2.1.1.45), wykryty jedynie w mitochondriach *Neurospora crassa* [24], przejmując metaboliczną funkcję kinazy tymidynowej A, której mitochondria tego grzyba nie posiadają [24]. Natomiast obecność enzymu deaminującego dCMP do dUMP, wskazuje na funkcjonowanie w *Neurospora crassa* szlaku metabolicznego, który nagromadza dTMP na drodze syntezy *de novo*. Ta cecha wyróżnia mitochondria *Neurospora crassa* od mitochondriów innych eukariontów, gdzie dominującą jest synteza dTMP na drodze odzyskiwania tymidyny [25].

Obok wspomnianych wyżej kinazy tymidynowej A i syntazy dTMP, kolejnym enzymem katalizującym syntezę dTMP i dCMP w mitochondriach jest nukleozydofosfotransferaza (5'fosfotransferaza rybonukleozydo 5'fosforan:rybo/2'deksyrybonukleozyd, EC 2.7.1.77), przenosząca resztę HPO_4^{2-} z AMP lub UMP na rybo- lub 2'deoksyrybonukleozydy. Enzym wykryty został zrazu w materiale roślinnym [26, 27], a później dopiero stwierdzono jego obecność u zwierząt, zarówno w cytosolu jak i w mitochondriach [9, 28, 29]. W tych ostatnich nukleozydowa fosfotransferaza została określona jako izoenzym C. W przeciwieństwie do enzymu występującego w cytosolu i nazwanego izoenzymem D, izoenzym C wykazuje preferencję do dThd i dCyd [30]. W mitochondriach wątroby normalnej (tj. nie regenerującej) aktywność fosfotransferazy nukleozydowej, wyrażona ilością syntezowanych dTMP lub dCMP, jest 3 krotnie niższa od aktywności kinazy tymidynowej A [30]. Przeniesienie HPO_4^{2-} z AMP lub UMP na dThd lub dCyd hamowane jest przez ATP [9], natomiast dodatnimi modulatorami tej reakcji są dTTP i dCTP [29]. Pozwala to sądzić, że synteza dTMP i dCMP w komórkach mitotycznie czynnych, katalizowana przez kinazę tymidynową A, zapoczątkowującą łańcuch fosforylacji prowadzący do nagromadzenia się dTTP i dCTP, po replikacji genomu mitochondrialnego podtrzymywana jest przez stymulację aktywności fosfotransferazy nukleozydowej.

Informacja o zdolności mitochondriów do katalizowania reakcji fosforylacji dGuo ukazały się na przełomie lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych [30, 31]. Enzym katalizujący tę reakcję w obecności ATP i jonów Mg^{2+} wyizolowany z mitochondriów został scharakteryzowany przez Gowera i wsp. [31], a w porównaniu z enzymem katalizującego podobną reakcję w cytosolu okazał się on odrębnym białkiem. Mitochondrialna kinaza deoksyguanozynowa (5'fosfotransferaza ATP:dGuo, bez

numeru klasyfikacyjnego) katalizuje syntezę dGMP i dIMP; jest ona aktywowana przez dTDP i dTTP oraz nukleotydy urydylowe i dATP [30, 31] nie wykazujące podobnego efektu wobec enzymu cytosolowego [30—32]. W 18 godzinie po częściowej hepatektomii u szczura, enzym mitochondrialny wykazuje dwukrotny wzrost aktywności [30].

W roku 1983 wykazano, że *matriks* mitochondriów wątroby szczura zawiera enzym katalizujący w obecności ATP i jonów Mg^{2+} fosforylację dAdo [33]. Enzym ten określono jako mitochondrialną kinazę deoksyadenozynową (5'fosfotransferaza ATP:dAdo, EC 2.7.1.76). Różnice fizykochemiczne i właściwości kinetyczne reakcji katalizowanych przez oczyszczone enzymy z cytosolu i mitochondriów pozwoliły uznać oba enzymy za odrębne białka [33, 34]. Spośród tych różnic, obok odmiennych wartości mas cząsteczkowych i dimerycznej formy enzymu mitochondrialnego, zwraca uwagę jego preferencja substratowa wobec dAdo, a także jego największa zdolność katalizowania syntezy dAMP w obecności dTTP jako donora HPO_4^{2-} [34]. Guo, Ado, 5-azacytydyna, araAdo, CTP i dCTP, wykazują od 3 do 12-tokrotnie większy efekt hamujący syntezę dAMP katalizowaną przez enzym cytosolowy [34, 35], a co więcej, niektóre inhibitory syntezy dAMP w cytosolu wobec tej samej syntezy katalizowanej przez enzym mitochondrialny, zachowują się jak modulatory dodatnie [34, 35].

Mitochondria większości eukariontów syntezują 2'-deoksynukleozydo 5'monofosforany w reakcjach katalizowanych przez specyficzne kinazy 2'deoksyrybonukleozydów. Jednakże mitochondria drożdży, spośród nukleotydów tymidylowych wbudowują do DNA tylko dTDP i dTTP [36]. Proces ten, będący następstwem obecności w mitochondriach drożdży jedynie kinazy nukleozydodifosforanów [36, 37] nie wyjaśnia sposobów, jakimi dokonuje się przemiana tyminy lub tymidyny w dTDP. Pewne analogie wykryto u mutantów *E. coli* nie zawierających syntazy tymidylanowej ale dysponujących możliwością włączania tyminy do DNA w obecności 2'deoksyrybozylu 1 fosforanu [38]. Sugeruje to, że komórki mutantu nagromadzają dTMP na drodze przeniesienia PRibPP na tyminę, syntezowaną w reakcji katalizowanej przez fosforybozylotransferazę. Jednakże fakt, że w takim szlaku metabolicznym musiałyby uczestniczyć nie występująca w mitochondriach reduktaza rybonukleozydodifosforanów [30], pozostawia sprawę syntezy dTMP w mitochondriach drożdży nadal nie wyjaśnioną.

III. Enzymy katalizujące syntezę 2'-deoksyrybonukleozydo-5'-di i trifosforanów

Pierwsze dane dotyczące zdolności mitochondriów do fosforylowania dTMP w reakcji katalizowanej przez specyficzną kinazę tymidylanową (fosfotransferaza ATP:dTMP, EC 2.7.4.9) ukazały się w roku 1963 [39].

Ponowne zainteresowanie enzymem nastąpiło jednak dopiero w połowie lat siedemdziesiątych, w związku z syntezą nukleotydów tymidylowych i rolą enzymu w syntezie mDNA [24, 40]. Badania nad kinazą dTMP, oprócz stwierdzenia, że enzym występuje w mitochondriach poza błonami [41], nie doprowadziły do bliższej charakterystyki fizykochemicznych właściwości enzymu, głównie z powodu jego niestabilności [24, 40]. Natomiast wyznaczone parametry kinetyki reakcji fosforylacji dTMP i dTDP pozwoliły ustalić, że synteza dTDP i dTTP jest w mitochondriach katalizowana prawdopodobnie przez dwa odmienne enzymy [42]. Jest to zgodne z doniesieniami o istnieniu odrębnych kinaz dTMP i dTDP wykrytych w bakteriach [43], cytosolu wątroby myszy [44] i rosnących komórkach L [45]. Enzym o zbliżonych właściwościach katalitycznych wykryto także w mitochondriach serca wołu [46], ale jego uprzywilejowanymi substratami są rybonukleozydo 5'-difosforany. Aktywność mitochondrialnej kinazy dTMP, podobnie zresztą jak enzymu występującego w cytosolu, hamowana jest przez ADP [42, 47, 48], enzym mitochondrialny ponadto hamowany jest dodatkowo przez GDP, CDP, dADP, dGDP i dCDP [42] przy wartościach K_i zbliżonych do K_i ADP. Niezależnie od miejsca występowania i pochodzenia enzymu, jedynym obok ATP substratem aktywnym jako donor HPO_4^{2-} w reakcji katalizowanej przez kinazę dTMP, jest dATP [46, 48, 49]. Aktywność kinazy dTMP w mitochondriach wątroby szczura wzrasta 20 krotnie w 24 godzinie po częściowej hepatektomii [41].

Mitochondria wątroby szczura wykazują także zdolność do fosforylowania dAMP, dCMP i dGMP w obecności ATP i jonów Mg^{2+} przy bardzo zbliżonych wartościach K_m dla wymienionych substratów [42]. W produktach reakcji, obok dADP, dCDP i dGDP, wykazano również obecność odpowiednich 5'-trifosforanów [42], co nie przesądza sprawy na rzecz istnienia odrębnych kinaz 2'-deoksyrybonukleozydo-5'-difosforanów ale łącznie z obecną w mitochondriach kinazą dTMP i dTDP wskazuje, że zdolne są one do syntezy wszystkich substratów mitochondrialnej polimerazy DNA. W mitochondriach regenerującej wątroby szczura w 24 godzinie po częściowej hepatektomii, aktywności fosforylujące dCMP i dGMP oraz dCDP i dGDP wzrastają 2 krotnie, natomiast szybkość syntezy dADP i dATP pozostaje nie zmieniona [30, 42]. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku kinazy dTMP, pozostałe aktywności enzymatyczne katalizujące fosforylację 2'-deoksyrybonukleozydo 5' mono i difosforanów, występują w mitochondriach poza błonami [42, 46].

IV. Hydrolazy

IV-1. Fosfohydrolazy

W mitochondriach znaleziono trzy enzymy należące do fosfohydrolaz. Są nimi: 5'-nukleotydaza (fosfohydrolaza 5' rybo-2'-deoksyrybonukleoty-

du, EC 3.1.3.5), nukleozydodifosfataza (fosfohydrolaza nukleozydodifosforanów, EC 3.6.1.6) oraz ATPaza (fosfohydrolaza ATP, EC 3.6.1.8).

5'-nukleotydaza, uprzednio uważana jedynie za enzym degradujący [50] zyskała na znaczeniu kiedy stwierdzono, że aktywność enzymu zmienia się w komórkach mitotycznie czynnych [51—53] i uczestniczy w kontroli syntezy DNA [54, 55]. Niemal całkowita aktywność 5'-nukleotydazy występuje w błonach, głównie zewnętrznej [41], enzym łatwo jednak ulega solubilizacji w wyniku traktowania mitochondriów detergentami [56]. Mitochondrialna 5'-nukleotydaza z jednakową aktywnością katalizuje hydrolizę związanego estrowo HPO_4^{2-} niemal wszystkich rybo i 2'-deoksyrybonukleozydo 5'-monofosforanów. Wyjątek stanowią dGMP, IMP oraz dIMP, wobec których aktywność enzymu jest o połowę mniejsza [56]. Ta względnie mała specyficzność mitochondrialnej 5'-nukleotydazy stanowi jedną z różnic, jaką wykazuje ten enzym w zestawieniu z nieaktywną względem AMP 5'-nukleotydazą erytrocytów [57] lub enzymem występującym w błonach limfocytów [58], który z kolei nie katalizuje hydrolizy wiązania estrowego HPO_4^{2-} z 2'-deoksyrybozą w dAMP i dCMP. Różnica ta dotyczy także enzymu występującego w mikrosomach [59], dla którego najlepszym substratem jest AMP. Zasadniczą cechą, jaka wyróżnia mitochondrialną 5'-nukleotydazę jest obniżenie aktywności enzymu wobec dTMP o 60% w regenerującej wątrobie szczura (24 godziny po częściowej hepatektomii) [56]. Podobne, choć ilościowo mniejsze zmiany aktywności enzymu obserwuje się też we frakcji błon komórkowych uzyskanej z regenerującej wątroby szczura, dotyczą one jednak wszystkich substratów enzymu i pojawiają się, kiedy zmiany aktywności mitochondrialnej 5'-nukleotydazy względem dTMP wracają do wartości kontroli [56]. Badając przyczyny wybiórczej zmiany aktywności enzymu z mitochondriów, wykorzystano wyniki odmiennej kinetyki reakcji z dTMP i pozostałymi substratami, co pozwoliło na wniosek, że enzym mitochondrialny wykazuje dwa miejsca wiązania substratów. Jedno z tych miejsc wiąże specyficznie tylko dTMP, drugie zaś wiąże powstałe substraty enzymu [56]. Nie ma obecnie danych wskazujących czy mitochondrialna 5'-nukleotydaza w zestawieniu z enzymem z cytosolu [60] lub błon komórkowych [58] jest odrębnym białkiem enzymatycznym. Sądzić raczej należy, że odmienne zachowanie się enzymu wynika z różnych mechanizmów regulacji jego aktywności.

ATPaza zależna od jonów magnezu (Mg^{2+} — ATPaza) jest jednym z najlepiej poznanych enzymów mitochondrialnych [61]. Budowę podjednostek enzymu, ich wzajemną topografię w błonach oraz sekwencję genu mitochondrialnego kodującego ATPazę scharakteryzowano tak szczegółowo [61—65], że powtarzanie tych danych jest niecelowe. Warto natomiast wspomnieć, że oprócz Mg^{2+} -ATPazy mitochondria wątroby, nerki i jelita zawierają ATPazę aktywowaną przez jony HCO_3^- , przy czym ta ATPaza w zestawieniu z Mg^{2+} -ATPazą ujawnia znaczne różnice wrażliwości na inhibitory [66]. Mg^{2+} -ATPaza katalizuje hydrolizę wiązania bez-

wodnikowego, którym w ATP, jak we wszystkich rybo- i 2'-deoksyrybonukleozydo 5'trifosforanach, związany jest γ -ortofosforan [30, 61, 66]. W świetle doniesień o wyizolowaniu odrębnych fosfohydrolaz, których substratami są jedynie ATP i GTP [67] lub tylko dTTP [68], należy sądzić, że kompleks, któremu nadaje się nazwę mitochondrialnej ATPazy [61] jest również zespołem enzymów specyficznych wobec poszczególnych substratów.

Enzymem o podobnie szerokiej preferencji substratowej jest difosfataza nukleozydowa w obecności jonów Mg^{2+} katalizująca hydrolizę wiązania bezwodnikowego w 5'difosforanach. Sądzi się, że enzym jest dodatkową aktywnością ATPazy [61], lub, że stanowi wypadkową aktywności ATPazy i kinazy adenylanowej [69]. Nie przesądzając pochodzenia difosfatazy nukleozydowej należy odnotować fakt, że w mitochondriach regenerującej wątroby szczura w 24 godziny po częściowej hepatektomii, aktywności Mg^{2+} -ATPazy i difosfatazy nukleozydowej obniżają się odpowiednio o 50% i 40%. Dotyczy to jednak tylko aktywności wobec ATP, dATP, dGTP i dTTP oraz wobec odpowiadającym im 5'difosforanom [30]. Spostrzeżenie to zasługuje na uwagę, ponieważ ADP jest naturalnym inhibitorem Mg^{2+} -ATPazy [61, 70, 71].

IV-2. Aminohydrolazy

W mitochondriach stwierdzono dotychczas występowanie dwóch enzymów należących do aminohydrolaz. Są nimi: deaminaza adenozynowa (aminohydrolaza Ado/dAdo, EC 3.5.4.4) oraz deaminaza AMP (aminohydrolaza AMP, EC 3.5.4.6).

Deaminaza adenozyny jest enzymem budzącym znaczne zainteresowanie, ze względu na jej udział w biosyntezie nukleotydów purynowych i pirymidynowych [72—74]. Zarówno w cytosolu jak i w mitochondriach, enzym katalizuje reakcję hydrolitycznej deaminacji Ado i dAdo do Ino i dIno, uwalniając przy tym NH_3 [41, 75, 76]. Deaminazę adenozynową znaleziono w mitochondriach wątroby [41] i mózgu [77], a także w cytosolu wątroby, śledziony, żołądka, jelit, płuc i nerek [78]. Mitochondrialna deaminaza adenozynowa związana jest z błonami, gdzie występuje w formie latentnej [77], dopiero bowiem traktowanie mitochondriów detergentami ujawnia aktywność enzymu [41, 77]. Rolę deaminazy adenozynowej w nagromadzeniu ATP i toksycznego dATP w limfocytach T i B oraz w erytrocytach u ludzi z uwarunkowanym genetycznie niedoborem enzymu [76, 79, 80] zrozumiano dopiero po stwierdzeniu, że dAdo hamując aktywność hydrolazy S-adenozylhomocysteinowej [81, 82] odpowiedzialna jest za reakcje transmetylacji [82]. Brak aktywności hydrolazy S-adenozylhomocysteinowej w mitochondriach [34] każe jednak sądzić, że rola deaminazy adenozynowej uczestniczącej w regulacji stężenia dAdo sprowadza się w tych organellach do limitowania szybkości syntezy nukleoty-

dów deoksyadenylowych z których dATP spełnia rolę podwójną: będąc silnym inhibitorem kinazy deoksyguanozynowej ogranicza syntezę nukleotydów deoksyguanylowych, natomiast hamując na drodze sprzężenia zwrotnego fosforylację dAdo, staje się jednym z czynników kontroli syntezy nukleotydów deoksyadenylowych (rozdział V-1). Chociaż mitochondrialna deaminaza adenozyńska wykazuje jednakowe powinowactwo do Ado i dAdo, 24 godziny po częściowej hepatektomii, deaminacja Ado wzrasta w mitochondriach wątroby szczura o 40%, natomiast deaminacja dAdo maleje o 70% [41]. Aktywność enzymu jest kompetycyjnie hamowana przez dAdo, jeżeli deaminowana jest Ado i odwrotnie, ale hiperboliczna kinetyka reakcji katalizowanej przez enzym oraz identyczne wartości K_i , sugerują istnienie jednego miejsca wiązania obu substratów przez enzym [41, 42].

Niespodzianką było wykrycie w mitochondriach wątroby szczura aktywności deaminującej AMP [41, 56], głównie dotąd opisywanej w cytosolu różnych narządów [83—83]. Aktywność ta, związana z błonami ujawnia się podobnie jak aktywność 5' nukleotydazy po traktowaniu mitochondriów detergentami. Obecność jej wykazano inkubując mitochondria z ^{14}C -AMP w optymalnych warunkach dla aktywności tego enzymu. Prowadzi to do powstania ^{14}C -IMP oraz ^{14}C -Ino, których łączna ilość równa jest ilości ^{14}C -AMP, jaka nie ulega hydrolizie do ^{14}C -Ado w reakcji katalizowanej przez 5'-nukleotydazę [41]. Deaminaza AMP wykorzystywana jest głównie do wytwarzania NH_3 w cyklu nukleotydów purynowych [83]. Wydaje się jednak możliwe, że w mitochondriach, poza regulacją aktywności deaminazy adenozyńskiej (rozdział V-3), deaminaza AMP z dehydrogenazą glutaminianową dostarczając NH_3 do syntezy karbomylofosforanu. Opisano trzy izoenzymy AMP, nazwane A, B i C, występujące w mięśniach, w wątrobie, nerkach oraz płucach [84, 85], nie ma jednak żadnych danych wskazujących którym z tych izoenzymów jest enzym mitochondrialny. Jak dotąd, jedyną różnicą, jaką wykazuje deaminaza AMP występująca w mitochondriach, są zmiany aktywności enzymu w wątrobie regenerującej [41], czego nie wykryto w odniesieniu do enzymu zawartego w cytosolu tego narządu [85]. Inne właściwości mitochondrialnej deaminazy AMP, wliczając w to aktywujący wpływ jonów K^+ [86, 87], czy hamujący efekt ATP, GTP i ADP [88, 89], nie wyróżniają enzymu mitochondrialnego w zestawieniu z cytosolową deaminazą AMP.

V. Regulacja syntezy 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach

V-1. Regulacja aktywności kinaz 2'-deoksyrybonukleotydów

Aktywność kinazy tymidynowej A, regulowana jest na drodze sprzężenia zwrotnego przez dTTP i dCTP hamujące odpowiednio syntezę dTMP i dCMP [30]. Regulacja fosforylacji dGuo przez kinazę deoksyguanozynową

zachodzi na podobnej drodze, przy czym związkiem hamującym syntezę dGMP jest dGMP, wykazujący takie same właściwości wobec kinazy deoksyadenozynowej [34]. Fosforylacja dAdo kontrolowana jest także przez dATP, jednakże efekt hamujący tego związku jest wielokrotnie słabszy [34]. 2'-deoksyrybonukleozydy hamują przede wszystkim syntezę dAMP i dGMP. dAdo silnie hamuje fosforylację dGuo, natomiast dGuo niemal całkowicie zatrzymuje fosforylację dAdo [30, 34]. W regulacji aktywności kinaz 2'-deoksyrybonukleozydowych uczestniczą także fosfohydrolazy. I tak 5'-nukleotydaza obniżając aktywność w mitochondriach komórek mitotycznie czynnych względem dTMP, przesuwając równowagę fosforylacji dThd do dTMP w prawo. Ten efekt regulatorowy jest następstwem nie zmienionej aktywności 5'-nukleotydazy względem dAMP [56], co poprzez zwiększenie stężenia dAdo (hamującej z kolei aktywność enzymu względem dTMP [56]), obniża jego zdolność hydrolizy dTMP do dThd i HPO_4^{2-} . W nagromadzeniu dAdo uczestniczą również deaminazy występujące w mitochondriach. Istota tego procesu (omówiona w rozdziale V-3), polega m.in. na obniżeniu aktywności deaminazy AMP w mitochondriach wątroby regenerującej o 70% [41]. W konsekwencji zamiast deaminacji do IMP, AMP, pod wpływem 5-nukleotydazy ulega hydrolizie do Ado, która z kolei hamuje kompetycyjnie aktywność deaminazy adenozynowej względem dAdo [41].

Rola Mg^{2+} -ATPazy oraz difosfatazy nukleozydowej — wykazujących w mitochondriach wątroby regenerującej tylko połowę aktywności względem ATP, dATP, dTTP, ADP, dADP i dTDP [39] — w regulacji aktywności kinaz 2'-deoksyrybonukleozydowych sprowadza się do utrzymywania odpowiednio wysokiego stężenia dATP i nukleotydów tymidylowych, będących aktywatorami syntezy dGMP [34]. Mitochondria narządów mitotycznie czynnych nie wykazują zmian aktywności kinazy deoksyadenozynowej [30] i bez przeszkód zapoczątkowują łańcuch fosforylacji prowadzący do dATP. Jest prawdopodobne, że toksyczny efekt dATP dokonuje się na drodze pobudzenia syntezy dGMP, końcowy bowiem produkt fosforylacji nukleotydów 2'-deoksyguanylowych jakim jest dGTP, hamuje zarówno syntezę jak i dGMP [30, 34]. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że w mitochondriach normalnej (tj. nie regenerującej) wątroby aktywność deaminazy deoksyadenozynowej dwukrotnie przewyższa aktywność kinazy deoksyadenozynowej [41], w tych więc warunkach fosforylacja dAdo do dAMP nie gra większej roli w przemianach. W mitochondriach wątroby regenerującej (24 godziny po częściowej hepatektomii), czterokrotny spadek aktywności deaminazy deoksyadenozynowej przy nie zmienionej aktywności kinazy deoksyadenozynowej [30, 41] powoduje odwrócenie tych zależności i w konsekwencji dominującą przemianą dAdo staje się fosforylacja do dAMP [34]. Ponieważ synteza dAMP zapoczątkowuje ciąg reakcji kończących się wzrostem stężenia dATP, ochrona przed wspomnia-

nym wyżej cytotoksycznym efektem gromadzącego się w nadmiarze dATP polega na zwrotnym hamowaniu aktywności kinazy deoksyadenozynowej przez dATP.

V-2. Regulacja aktywności kinaz 2'-deoksyrybonukleozydo 5' mono i difosforanów

Spośród scharakteryzowanych dotychczas czynników regulujących fosforylację dTMP, istotna rola przypada 5'-nukleotydzie. Udział tego enzymu w regulacji syntezy dTDP związany jest ze zmianami aktywności enzymów, które w mitochondriach regulują stężenie dThd i dAdo, ponieważ nukleozydy te hamują odpowiednio aktywność 5'-nukleotydu względem dTMP i dAMP [41, 56]. Argumentem przemawiającym na korzyść udziału 5'-nukleotydu w regulacji aktywności kinazy dTMP jest ponadto bezpośrednie sąsiedztwo submitochondrialnego rozmieszczenia obu enzymów oraz fakt, że jedynym substratem, wobec którego aktywność 5'-nukleotydu w mitochondriach komórek dzielących się spada jest dTMP [30, 41, 56]. Mniejsze znaczenie w regulacji syntezy dTDP przypada GDP i CDP. Wprawdzie oba te nukleotydy syntezowane są w mitochondriach [91] i hamują fosforylację dTMP [42], ale duże wartości K_i przy nie zmniejszonej aktywności difosfatazy nukleozydowej względem GDP i CDP [30] eliminują je spośród czynników regulujących syntezę dTDP w mitochondriach.

Regulacja aktywności kinazy dAMP dokonuje się poprzez końcowy produkt łańcucha fosforylacji nukleotydów 2'-deoksyadenylowych, tj. przez dATP, nie kompetencyjny zaś charakter hamowania syntezy dADP sugeruje allosteryczny mechanizm tej kontroli [42]. Synteza dGDP i dGTP związana jest z aktywnościami sześciu innych enzymów. Są nimi kinaza tymidynowa A, kinaza dTMP, kinaza dTDP, 5'-nukleotydu, kinaza deoksyadenozynowa oraz Mg^{2+} -ATPaza. Trzy pierwsze odpowiedzialne są za syntezę aktywatorów fosforylacji dGuo: 5'-nukleotydu reguluje szybkość fosforylacji dTMP do dTDP, kinaza deoksyadenozynowa zapoczątkowuje fosforylację kończącą się syntezą trzeciego aktywatora kinazy deoksyguanozynowej jakim jest dATP, wreszcie zmniejszona aktywność Mg^{2+} -ATPazy zapobiega obniżaniu się stężenia dATP, niezbędnego do stymulacji syntezy nukleotydów 2'-deoksyguanylowych.

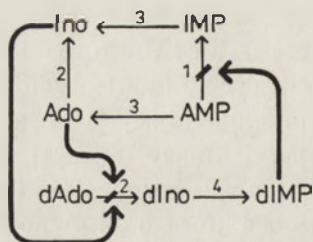
Kontrola syntezy dCDP i dCTP zachodzi w mitochondriach na drodze zwrotnego hamowania kinazy tymidynowej A przez dCTP [30] i związana jest aktywnościami kinaz dTMP i dTDP, ponieważ dTTP na tej samej drodze hamuje również fosforylację dCyd [8, 10, 30].

V-3. Regulacja aktywności fosfohydrolaz i aminohydrolaz

W kontroli aktywności 5'-nukleotydu uczestniczy Mg^{2+} -ATPaza, regulująca stężenie ATP, inhibitora 5'-nukleotydu [41]. Pośrednio mito-

chondrialna ADPaza kontrolująca poprzez ADP aktywność Mg^{2+} -ATPazę, włączona jest także do mechanizmów mających wpływ na aktywność 5'-nukleotydu [69, 70, 71].

Relacje pomiędzy aktywnościami deaminazy AMP, deaminazy adenylozynowej, 5'-nukleotydu i kinazy deoksyguanozylowej oraz wynikające z nich mechanizmy kontroli aktywności mitochondrialnych deaminaz przedstawia rycina 1.

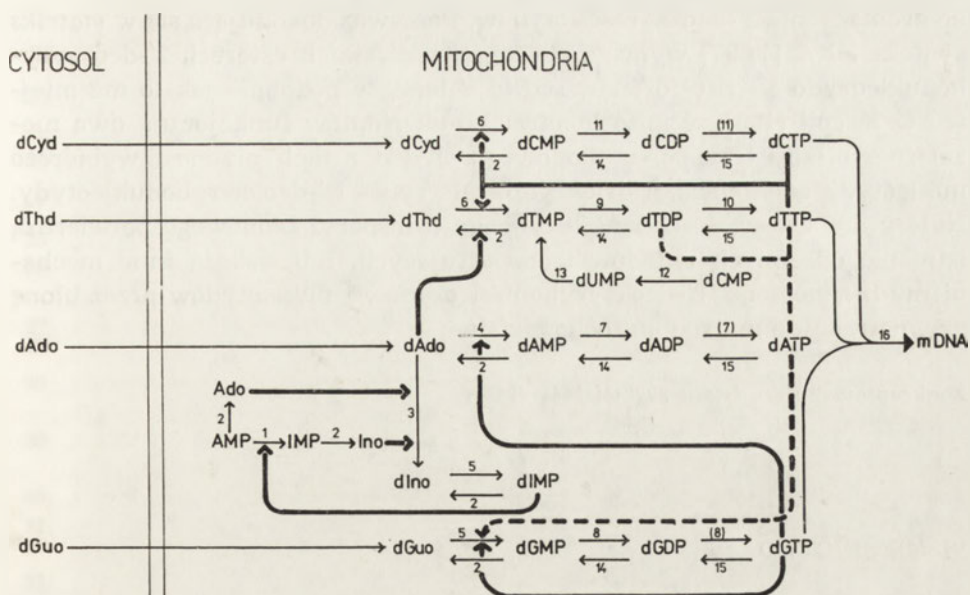


Ryc. 1. Regulacja aktywności deaminazy AMP oraz deaminazy adenylozylowej (deoksyadenosiny w mitochondriach. 1 — deaminaza AMP; 2 — deaminaza Ado/dAdo; 3 — 5'-nukleotydu; 4 — kinaza deoksyguanozylowa; \leftarrow hamowanie reakcji.

AMP będąc substratem deaminazy i 5'-nukleotydu deaminowany jest do IMP lub hydrolizowany do Ado, kompetencyjnie hamuje deaminację dAdo [41, 42]. Podobne cechy posiadają Ino powstająca w wyniku hydrolizy IMP lub dezaminacji Ado [41]. W przypadku wzmożenia deaminacji dAdo gromadząca się dIno — będąc substratem kinazy deoksyguanozylowej — fosforylowana jest do dIMP [31]; ten zaś hamując dezaminację AMP [42] preferuje hydrolizę AMP do Ado i dezaminację Ado do Ino, dostarczając tym samym dwóch inhibitorów dezaminacji dAdo. W regulacji stężenia deoksyadenosiny w mitochondriach uczestniczą zatem cztery enzymy: deaminaza AMP, deaminaza Ado, 5'-nukleotydu oraz kinaza deoksyguanozylowa. W mitochondriach komórek mitotycznie czynnych enzymy te prowadzą do oszczędzania dAdo [41], zachowując ją jako substrat fosforylacji i syntezy nukleotydów deoksyadenylozylowych [30].

VI. Uwagi końcowe

Zawarte w mitochondriach enzymy katalizują reakcje, których przebieg i mechanizmy regulacji przedstawiono na rycinie 2. Łatwo zauważyć, że reakcje te prezentują zaledwie część szlaków katabolizmu i anabolizmu 2'-deoksynukleotydów [92—94]. Zwraca ponadto uwagę fakt, że mitochondria, nie zawierające reduktazy rybonukleozydodifosforanowej [39] nie są w stanie zredukować rybonukleotydów do odpowiednich 2'-deoksy pochodnych. W mitochondriach nie znaleziono aktywności rybozylotransferazy i fosforybozylotransferazy [42], co wyklucza syntezę dGMP, dIMP czy dAMP, tym bardziej, że substratem przenoszonym przez drugą transferazę jest PRibPP a nie 2'-deoksy PRibPP [95, 96]. Powstaje zatem pytanie, w jaki sposób 2'-deoksyrybonukleozydy przedostają się z cytosolu



Ryc. 2. Schemat metabolizmu 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach. Hamowanie, aktywacja. Oznaczenia enzymów: 1 — deaminaza AMP; 2 — 5'-nukleotydaza; 3 — deaminaza dAdo; 4 — kinaza dAdo; 5 — kinaza dGuo; 6 — kinaza dThd; 7 — kinaza dAMP; 8 — kinaza dGMP; 9 — kinaza dTMP; 10 — kinaza dTDP; 11 — kinaza dCMP; 12 — deaminaza dCMP; 13 — syntaza dTMP; 14 — NDPaza; 15 — ATPaza; 16 — polimeraza DNA. Na schemacie uwzględniono tylko te enzymy, których obecność stwierdzono w mitochondriach. Enzymy, których oznaczenia podano w nawiasach, prawdopodobnie katalizują reakcje przedstawione odpowiednimi równaniami.

do *matrixs* mitochondrialnej, gdzie zawarta jest nie tylko większość aktywności kinaz 2'-deoksyrybonukleozydowych i nukleotydów niezbędnych do syntezy prekursorów DNA, lecz także dokonuje się synteza DNA [1, 97]. Błona zewnętrzna dla związków o masie cząsteczkowej 5000 D a więc dla wszystkich nukleozydów i nukleotydów, nie stanowi bariery na drodze pomiędzy cytosolem a *matrixs* [98], chociaż ułatwienie przechodzenia nukleotydów w obecności 5'-nukleotydyazy [99] wskazuje, że preferowanymi substratami tego procesu są nukleozydy. Taką barierą staje się natomiast błona wewnętrzna, w której umiejscowiony jest dokładnie scharakteryzowany układ mitochondrialnej translokazy, specyficznej jedynie wobec nukleotydów adeninowych [100—102]. *Matrixs* mitochondrialna zawiera wprawdzie fosfotransferazę GTP—AMP, która oprócz przeniesienia reszty HPO_4^{2-} z GTP na AMP, katalizuje także przemianę $\text{GTP} + \text{dAMP} \rightleftharpoons \text{GDP} + \text{dADP}$ oraz $\text{dGTP} + \text{AMP} \rightleftharpoons \text{dGDP} + \text{ADP}$ [103, 104], jest to jednak sposób wyrównywania stężenia ADP w *matrixs*, podobnie jak to czyni w przestrzeni międzybłonowej kinaza rybonukleozydo 5'-difosforanów [47, 100], nie zaś droga, która w *matrixs* wykorzystywana jest

do gromadzenia 2'-deoksynukleotydów. Ponieważ dokonująca się w *matriks* synteza DNA [1, 97] wymaga obecności wszystkich czterech 2'-deoksyrybonukleozydo 5'-trifosforanów sądzić należy, że podobnie jak to ma miejsce w *E. coli* [105], w mitochondriach eukariontów funkcjonują dwa niezależne układy transportu błonowego. Jeden z nich przenosi wybiórczo nukleotydy adeninowe, a drugi pozostałe rybo- i '-deoksyrybonukleotydy. Należy oczekiwać, że badania czynnego transportu błonowego potwierdzą istnienie odrębnych układów transportujących, lub wskażą inne mechanizmy przenoszenia 2'-deoksyrybonukleotydów i nukleotydów przez błonę wewnętrzną do matriks mitochondrialnej.

Zaakceptowano do druku 20 kwietnia 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Hubscher V., Kuenzle C. C., Spadari S., *Eur. J. Biochem.*, (1977), **81**, 249—258.
2. Baugnet-Mahieu L., Goutier R., Semal M., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 323—328.
3. Berk A. J., Clayton D. A., *J. Biol. Chem.*, (1973), **248**, 2722—2729.
4. Berk A. J., Meyer B. J., Clayton D. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1973), **154**, 563—565.
5. Kit S., Leung W.-C., Kaplan L. A., *Eur. J. Biochem.*, (1973), **39**, 43—48.
6. Ellims P. H., Van Der Weyden M. B., *J. Biol. Chem.*, (1980), **255**, 11290—11295.
7. Allen G. P., Mc Gowan J. J., Randall C. C., Mancini W., Cheng Y.-C., Gentry G. A., *Virology*, (1979), **92**, 367—374.
8. Kit S., Leung W.-C., *Biochem. Genet.*, (1974), **11**, 231—247.
9. Kit S., *Moll. Cell. Biochem.*, (1976), **11**, 161—182.
10. Kit S., Leung W.-C., Jorgensen G. N., Dubbs D. R., *Int. J. Canc.*, (1974), **14**, 598—610.
11. Kit S., Leung W.-C., *J. Cell. Biol.*, (1974), **61**, 35—44.
12. Kit S., Leung W.-C., Trkula D., (1974, Control Process in Neoplasia, ed. Muhlman M. A. and Hanson R. W., str. 103—145, Acad. Press, N. York — London).
13. Leung W.-C., Dubbs D. R., Trkula D., Kit S., *J. Virol.*, (1975), **16**, 486—497.
14. Her M. O., Momparler R. L., *J. Biol. Chem.*, (1971), **246**, 6152—6158.
15. Cheng Y.-C., Prusoff W. H., *Biochem.*, (1974), **6**, 1179—1185.
16. Chraibi R., Wright M., *J. Biochem.*, (1983), **93**, 323—330.
17. Kit S., Leung W.-C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1975), **67**, 1—7.
18. Chen M. S., Walker J. W., Prusoff W. H., *J. Biol. Chem.*, (1979), **254**, 10747—10753.
19. Chen M. S., Summers W. P., Walker J. W., Summers W. C., *J. Virol.*, (1979), **30**, 942—945.
20. Cooper G. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1973), **70**, 3788—3792.

21. Elion G. B., Furman P. A., Fyfe J. A., de Miranda P., Beauchamp L., Schaeffer H. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1977), **74**, 5716—5720.
22. Fyfe J. A., Keller P. M., Furman P. A., Miller R. L., Elion G. B., *J. Biol. Chem.*, (1978), **253**, 8721—8727.
23. Derse D., Chank Y. C., Furman P. A., Elion G. B., *J. Biol. Chem.*, (1981), **256**, 11447—11451.
24. Rossi M., Woodward D. O., *J. Bacteriol.*, (1975), **121**, 640—647.
25. Gołaszewski T., *Post. Biochem.*, (1976), **22**, 27—52.
26. Arima T., Masaka M., Shiosaka T., Okuda H., Fujii S., *Biochim. Biophys. Acta*, (1971), **246**, 184—193.
27. Bols N. C., Zimmerman A. M., *Comp. Biochem. Physiol.*, (1977), **57B**, 31—35.
28. Leung W.-C., Chen T. R., Dubbs D. R., Kit S., *Exptl. Cell. Res.*, (1975), **95**, 320—326.
29. Kit S., Leung W.-C., Trkula D., Dubbs D. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1975), **169**, 66—76.
30. Fabianowska-Majewska K., Greger J., *Enzyme*, (1982), **27**, 124—129.
31. Gower W. R., Carr M. C. Jr., Ives D. H., *J. Biol. Chem.*, (1979), **254**, 2180—2183.
32. Barker J., Lewis R., *Biochim. Biophys. Acta*, (1981), **658**, 111—123.
33. Fabianowska-Majewska K., Greger J., Gorzkiewicz B., *Enzyme*, (1984), **31**, 27—32.
34. Greger J., Fabianowska-Majewska K., Gorzkiewicz B., *Enzyme*, (1984), **31**, 33—38.
35. Krygier V., Momparler R. L., *J. Biol. Chem.*, (1971), **246**, 2752—2757.
36. Zeman L., Lusena C. V., *FEBS Letters*, (1974), **40**, 84—87.
37. Pedersen P. L., *J. Biol. Chem.*, (1973), **248**, 3956—3962.
38. Hosono R., Hosono H., Kuno S., *J. Biochem.*, (1975), **78**, 123—129.
39. Kielley R. K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1963), **10**, 249—253.
40. Radsak K., Albring M., *J. Gen. Virol.*, (1974), **25**, 457—463.
41. Greger J., Fabianowska K., *Enzyme*, (1979), **24**, 54—60.
42. Greger J., Rozprawa habilitacyjna, wyd. AM Łódź (1980).
43. Ivatsuki N., *J. Biochem.*, (1977), **82**, 1347—1359.
44. Kielley R. K., *Biochim. Biophys. Acta*, (1961), **53**, 123—131.
45. Griffith T. J., Helleiner C. W., *Biochim. Biophys. Acta*, (1965), **108**, 114—124.
46. Jacobus W. E., Evans J. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1975), **66**, 995—1002.
47. Kielley R. K., *J. Biol. Chem.*, (1970), **245**, 4204—4212.
48. Smith L. K., Ekain R. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1975), **167**, 61—71.
49. Lee L.-S., Cheng Y.-C., *J. Biol. Chem.*, (1977), **252**, 5686—5691.
50. Goldberg D. M., *Digestion*, (1978), **8**, 87—99.
51. Mozer T. J., Warner H. R., *J. Virol.*, (1977), **24**, 635—641.
52. Newby A. C., Luzio J. P., Hales N., *Biochem. J.*, (1975), **146**, 625—633.
53. Arima T., Shirasaka T., Okuda H., Fujii S., *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), **277**, 15—24.
54. Warner R. H., Drong R. F., Berget S. M., *J. Virol.*, (1975), **15**, 273—280.
55. Takuma T., Kumegawa M., *J. Biochem.*, (1977), **82**, 477—481.
56. Greger J., Fabianowska-Majewska K., *Enzyme*, (1980), **25**, 26—32.
57. Paglia D. E., Valentine W. N., *J. Biol. Chem.*, (1975), **250**, 7973—7979.
58. Dornand J., Bonnafous J.-C., Mani J.-C., *Eur. J. Biochem.*, (1978), **87**, 549—465.

59. Fox I. H., Marchant P. J., *Cand. J. Biochem.*, (1976), **54**, 1055—1060.
60. Itoh R., Usami C., Nishino T., Tsushima K., *Biochim. Biophys. Acta*, (1978), **526**, 154—162.
61. Senior A. E., *Biochim. Biophys. Acta*, (1973), **301**, 249—277.
62. Brooks J. C., Senior A. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1971), **147**, 467—470.
63. Senior A. E., *J. Bioenerg.*, (1971), **2**, 141—150.
64. Macino G., Tsagaloff A., *J. Biol. Chem.*, (1979), **254**, 4617—4623.
65. Kuzela S., Luciakova K., Lakota J., *FEBS Letters*, (1980), **114**, 197—201.
66. Suzuki S., *Comp. Biochem. Physiol.*, (1980), **67B**, 277—288.
67. Beutler E., Kuhl W., *Biochim. Biophys. Acta*, (1980), **601**, 372—379.
68. Dahlmann N., Muller D., *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.*, (1980), **361**, 1851—1854.
69. Smith G. P., Smith G. D., Peters T. J., *Biochem. J.*, (1980), **192**, 527—535.
70. Crosby B., Boutry M., Goffeau A., *Biophys. Res. Commun.*, (1979), **88**, 448—455.
71. Lowe P. N., Beechey R. B., *Biochem. International*, (1982), **4**, 9—16.
72. Weber G., Jackson R. C., Williams J. C., Goulding F. J., Eberts T. J., (1977), w *Advances in Enzyme Regulations*, ed. Weber G., str. 53—77, Pergamon Press, Oxford — N. York.
73. Fox I. H., Burk L., Planet G., Goren M., Kaminska J., *J. Biol. Chem.*, (1978), **253**, 6794—6800.
74. Dietz A. A., Czebotar V., *Canc. Res.*, (1977), **37**, 419—426.
75. Lin A. L., Elford H. L., *J. Biol. Chem.*, (1980), **255**, 8523—8528.
76. Fox I. H., Kelly W. N., *Ann. Rev. Biochem.*, (1978), **47**, 655—686.
77. Mustafa S. J., Tewari C. P., *Biochim. Biophys. Acta*, (1970), **198**, 93—100.
78. Trotta P. P., Ahland M. P., Brown G. F., Balis M. E., *Mol. Pharmacol.*, (1978), **14**, 199—209.
79. Webster A. D. B., North M. E., Rowe M., Johnson S. M., (1980), *Primary Immunodeficiencies*, INSERM Symposium No 16, Ed. Seligmann M., str. 279—286, Hitzing W. H. — Elsevier.
80. Hirschhorn R., Roegner V., Rubinstein A., Papageorgion P., *J. Clin. Invest.*, (1980), **65**, 768—771.
81. Abeles R. H., Tashijan A. H. Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1980), **95**, 612—617.
82. Duerre J. A., Briske-Anderson M., *Biochim. Biophys. Acta*, (1981), **678**, 275—282.
83. Makarewicz W., *Post. Biochem.*, (1979), **25**, 169—195.
84. Ogasawara N., Goto Y., Yamada Y., Yoshino M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1977), **79**, 671—676.
85. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T., *Eur. J. Biochem.*, (1978), **87**, 297—304.
86. Chun Y.-L., Harkness D. R., *Biochim. Biophys. Acta*, (1976), **34**, 27—40.
87. Kaletha K., Stankiewicz A., Makarewicz W., Zydowo M., *Int. J. Biochem.*, (1976), **7**, 67—71.
88. Brady T. G., Costello J. F., *Biochim. Biophys. Acta*, (1974), **350**, 455—460.
89. Ronca-Testoni S., Raggi A., Ronca G., *Biochim., Biophys. Acta*, (1970), **198**, 101—122.
90. Wortmann R. T., Mitchell B. S., Edwards N. L., Fox I. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1979), **76**, 2434—2437.
91. Tsiftoglou A. S., Georgatsos J. G., *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), **262**, 239—246.

92. Snyder F. F., Henderson J. F., *J. Biol. Chem.*, (1973), **248**, 5899—5904.
93. Jackson R. C., Lui M. S., Boritzki T. J., Morris H. P., Weber G., *Canc. Res.*, (1980), **40**, 1286—1291.
94. Mc Cairns E., Fahey D., Sauer D., Rowe P. B., *J. Biol. Chem.*, (1983), **258**, 1851—1856.
95. Lipstein B., Boar P., Sperling O., *Biochim. Biophys. Acta*, (1978), **521**, 45—54.
96. Tax W. J., veer Kamp J. H., *Comp. Biochem. Physiol.*, (1978), **59B**, 219—222.
97. Tsagaloff A., Macino G., Sebald W., *Ann. Rev. Biochem.*, (1979), **48**, 419—441.
98. Turska E., *Post. Biochem.*, (1980), **26**, 47—61.
99. Dornand J., Bonnafous J.C., Gavach C., Mani J.-C., *Biochimie*, (1979), **61**, 973—977.
100. Duszyński J., *Post. Biochem.*, (1975), **21**, 275—293.
101. Klingenberg M., *J. Membr. Biol.*, (1980), **56**, 97—105.
102. Pollak J. K., Sutton R., *Biochem. J.*, (1980), **192**, 75—83.
103. Tomaselli A. G., Schirmer R. H., Noda L. H., *Eur. J. Biochem.*, (1979), **93**, 257—262.
104. Tomaselli A. G., Noda L. H., *Eur. J. Biochem.*, (1979), **93**, 263—270.
105. Munch-Petersen A., Mygind B., Nicolaisen A., Pihl N. J., *J. Biol. Chem.*, (1979), **254**, 3730—3737.

KOMUNIKAT

Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego

Polskie Towarzystwo Toksykologiczne informuje, że III Zjazd Naukowy Towarzystwa odbędzie się w dniach 20—23 wrzesień 1987 roku w Kozubniku koło Bielska-Eiależ.

Wszystkich zainteresowanych zapraszamy do wzięcia udziału w Zjeździe. Wszelkich informacji na temat organizacji Zjazdu udziela Oddział Śląski PTT adres:

II Katedra Histologii i Embriologii
Śląskiej Akademii Medycznej
ul. Medyków 20
40—752 Katowice—Ligota
tel. 526-524

Przewodniczący
Komitetu Organizacyjnego
doc dr hab. Marcin Kamiński

SŁOWNICTWO BIOCHEMICZNE

Komisja Słownictwa Biochemicznego przedstawia tłumaczenia 6 dokumentów na temat słownictwa sacharydów, dziękując jednocześnie prof. dr hab. Januszowi Sokołowskiemu, członkowi Komisji Terminologii Chemicznej Polskiego Towarzystwa Chemicznego za cenną współpracę.

SŁOWNICTWO MONOSACHARYDÓW ROZGAŁĘZIONYCH

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): „Nomenclature of Branched-Chain Monosaccharides, Recommendations 1980”, opublikowanego w *Eur. J. Biochem.*, 119, 5—8, (1981) i w innych czasopismach.

Tłumaczyli *Andrzej Gamian i Ewa Katzenellenbogen*

Spis treści

1. Tworzenie nazw form acyklicznych
 - 1.1. Podstawa słownictwa
 - 1.2. Wybór łańcucha macierzystego
 - 1.3. Tworzenie nazwy monosacharydu macierzystego
 - 1.4. Tworzenie nazw monosacharydów macierzystych posiadających dwie grupy równocenne
 - 1.5. Rozgałęzienia
 - 1.6. Numeracja
2. Podstawienie terminalne
3. Tworzenie nazw form cyklicznych
4. Przykłady ogólne

Opisano nazewnictwo form acyklicznych podając w pierwszej części reguły wyboru łańcucha macierzystego. Prowadzi to do nazwania macierzystego monosacharydu i nazwania C-podstawnika, który tworzy rozgałęzienie. W tym przypadku należy stosować konwencje stereochemiczne aby określić konfigurację: dwa podstawniki na jednym węglu łańcucha macierzystego są podawane według ich ważności, przy czym przy wprowadzaniu nazwy monosacharydu macierzystego przyjmuje się, że podstawnik ważniejszy zastępuje grupę hydroksylową, a podstawnik mniej ważny zastępuje wodór. Grupy równocenne i podstawienie terminalne rozważa się osobno. W dalszej kolejności opisano formy cykliczne. Podano także szereg przykładów.

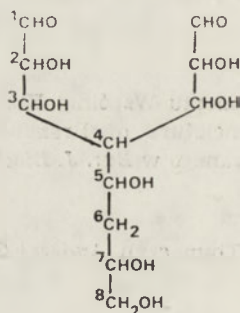
1. Tworzenie nazw form acyklicznych

1.1. Podstawa słownictwa

Rozgałęziony monosacharyd należy oznaczać jako pochodną macierzystego nierozgałęzionego monosacharydu, przedstawionego w swojej formie acyklicznej.

1.2. Wybór łańcucha macierzystego

Łańcuchem macierzystym określa się nierozgałęziony, złożony w całości z atomów węgla łańcuch, posiadający jedną lub więcej grup karbonylowych i zawierający największą ilość monosacharydowych jednostek węglowych. Jeżeli pozostaje jakakolwiek możliwość wyboru, wtedy macierzystym nazwiemy łańcuch zawierający najwięcej atomów węgla. Przykład numeracji przedstawia Ryc. 1

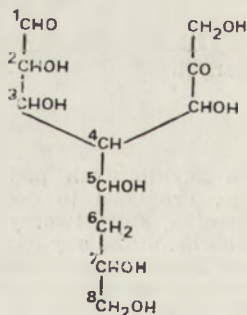


Ryc. 1.

Na podstawie numeracji prawidłową nazwą cukru macierzystego będzie oktoza, a nie alternatywna heptodialdoza.

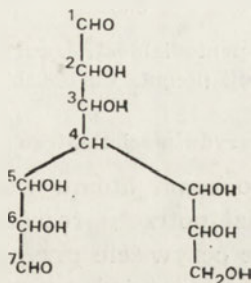
Jeżeli po zastosowaniu tej reguły pozostaje możliwość wyboru, wtedy dokonuje się go według następującego porządku preferencji:

a) Nazwę aldoza należy preferować przed nazwą ketoza (patrz Ryc. 2). Macierzystą jest numerowana oktoza, a nie alternatywna 2-oktuloza.



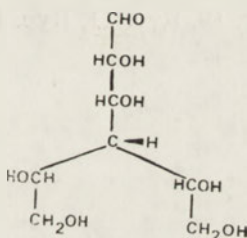
Ryc. 2.

b) Maksymalna liczba grup karbonylowych (potencjalnych). Przykład podano na Ryc. 3. Ponumerowana na rycinie dialdoza jest nazwą preferowaną przed innymi możliwymi.



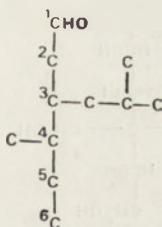
Ryc. 3.

c) Miejsce lub miejsca rozgałęzienia powinno się określać za pomocą możliwie najniższych lokantów. Przykład przedstawiono na rycinie 4. Macierzystym będzie łańcuch numerowany pionowo, nie zaś łańcuch skręcający w prawo w pozycji 3, ponieważ lokanty rozgałęzień to 3,4 a nie 3,5.

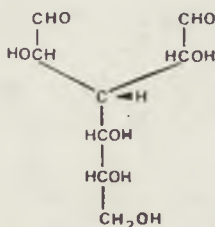


Ryc. 4.

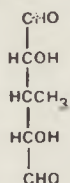
d) Nadzędność reguły Carb-8.2 (reguła 8.2 patrz [1]). Przykłady podano na Ryc. 5, Ryc. 6 i Ryc. 7.



Ryc. 5. 3-deoksy-3-C-(*L*-glicero-1-hydroksy-2-oksyetylo)-*D*-altro-heksoza (nie *D*-glicero-, *D*-gluko- według Reguły Carb-8.2a)



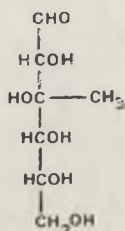
Ryc. 6. 4-deoksy-4-C-(*L*-glicero-1,2-dihydroksyetylo)-*D*-gulo-heksoza (nie *D*-glicero-, *L*-talo- według Reguły Carb-8.2a)



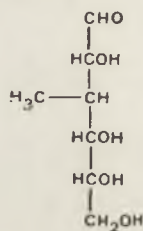
Ryc. 7. 3-deoksy-3-metylo-*rybo*-pentodialdoza. Uwaga! Przyjęto jako formę D, dla zdefiniowania kierunku numeracji (Reguła Carb-8.2b)

1.3. Tworzenie nazwy monosacharydu macierzystego

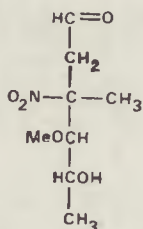
W celu określenia stereochemii atomu węgla (punktu rozgałęzienia) łańcucha węglowego zachodzi potrzeba rozróżnienia podstawników przy tym rozgałęzieniu, pomijając oczywiście przypadki, gdy dwa podstawniki rozgałęzienia są równocenne lub też jeden z nich można uznać za równocenny fragmentowi łańcucha macierzystego (potrz 1.4). Pierwszeństwo dwu podstawników (łącznie z wodorem, jeżeli taki występuje) w miejscu rozgałęzienia wyznacza się według postępowania (opartego głównie na liczbie atomowej) stosowanego w regułach sekwencji (patrz Uzupełnienie 2 w [3]). Z kolei symbol konfiguracyjny wprowadza się według reguły Carb-8.8, kiedy to podstawnik bardziej uprzywilejowany zastępuje grupę hydroksylową (porównaj regułę Carb-8.14 dla aminocukrów i regułę Carb-8.36 dla analogów siarkowych i selenowych). Przykłady przedstawiono na Ryc. 8, Ryc. 9, Ryc. 10, Ryc. 11, Ryc. 12 i Ryc. 13.



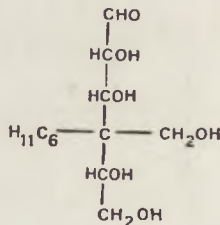
Ryc. 8. 3-C-metylo-D-glukoza (tlen ma pierwszeństwo względem węgla)



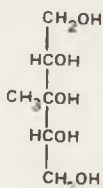
Ryc. 9. 3-deoksy-3-C-metylo-D-glukoheksosa (węgiel ma preferencję w stosunku do wodoru)



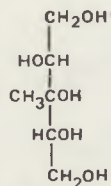
Ryc. 10. 2,3,6-trideoksy-3-C-metylo-4-O-metylo-3-C-nitro-D-likso-heksosa (azot ma pierwszeństwo wobec węgla)



Ryc. 11. 4-C-cyloheksylo-4-deoksy-4-C-metylo-3-C-nitro-D-likso-heksosa (tlen ma pierwszeństwo w stosunku do węgla [C-2'])



Ryc. 12. 3-C-metylo-rybitol

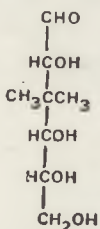


Ryc. 13. 3-C-metylo-D-arabinitol

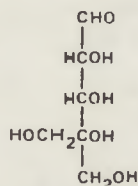
Uwaga: Pierwszy przykład został wyprowadzony z D-glukozy, ponieważ jest to podstawiona D-glukoza; drugi związek nazwano od D-gluko-heksozy, ponieważ z powodu utraty tlenu przestaje on być podstawioną glukozą, chociaż ma konfigurację D-gluko.

1.4. Tworzenie nazw monosacharydów macierzystych posiadających dwie grupy równocenne

Jeżeli dwa podstawniki w punkcie rozgałęzienia łańcucha macierzystego są równocenne lub jeżeli jeden z nich jest równocenny części łańcucha macierzystego, wtedy macierzysty monosacharyd powinien otrzymać nazwę według Reguły Carb-8.14 dla niepodstawionych deoksymonosacharydów. Przykłady przedstawiono na Ryc. 14 i Ryc. 15.



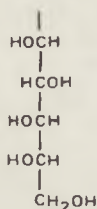
Ryc. 14. 3-deoksy-3,3-di-C-metylo-D-rybo-heksoza



Ryc. 15. 4-C-(hydroksymetylo)-D-erytro-pentoza

1.5. Rozgałęzienia

Każde rozgałęzienie określa się nazwą systematyczną albo zwyczajową jako alkil lub podstawiony alkil — itd., zastępujący atom C-wodoru monosacharydu macierzystego o łańcuchu nierozgałęzionym. W obrębie rozgałęzienia konfiguracje wokół centrów asymetrii wskazuje się przez zastosowanie przedrostków konfiguracyjnych (Reguła Carbo-8.8 i Carb-8.9). Jeżeli pierwszy atom rozgałęzienia jest chiralny, wtedy główny łańcuch jest uważany za grupę X przy stosowaniu Reguły Carb-8.8. Przykład przedstawia Ryc. 16.



Ryc. 16. L-gluko-1,2,3,4,5-pentahydroksypentyl lub L-gluko-pentitol-yl

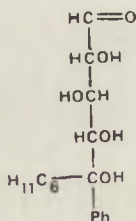
1.6. Numeracja

Monosacharyd macierzysty o nierozgałęzionym łańcuchu numeruje się zgodnie z zasadą Carb-8.4, to znaczy w aldozie atom węgla grupy karbonylowej (potencjalnej) jest atomem numer 1, w ketozie ma on numer możliwie najniższy.

Atomy węgla każdego rozgałęzienia numeruje się cyframi arabskimi, poczynając od atomu węgla przyłączonego do łańcucha głównego (patrz Nomenklatura Chemii Organicznej A-2-9 [4]).

2. Podstawienie terminalne

Jeżeli końcowy atom węgla monosacharydu jest asymetryczny w wyniku obecności dwu podstawników węglowych, które nie mogą być rozpastrywane jako część składowa łańcucha cukrowego, stereochemię nowego centrum asymetrycznego należy wskazać za pomocą Reguły Sekwencji (R lub S) (patrz także Reguła Carb-8.34 i Carb-8.35). Przykład przedstawia Ryc. 17.



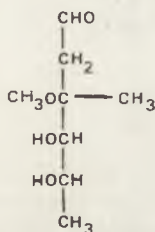
Ryc. 17. (5R)-5-C-cykloheksylo-5-C-fenyl-D-ksyloza

3. Tworzenie nazw form cyklicznych

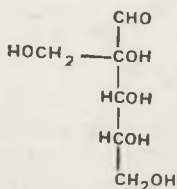
W przeciwieństwie do reguły Carb-8.20, nazwa cyklicznej formy monosacharydu o rozgałęzionym łańcuchu opierać się będzie na nazwie systematycznej jej formy acyklicznej, w której oba atomy węglowodanowe, między którymi nastąpiła cyklizacja, są uważane za część łańcucha głównego. Forma cykliczna jest więc definiowana na podstawie konwencyjnej nomenklatury konfiguracyjnej węglowodanów.

4. Przykłady ogólne

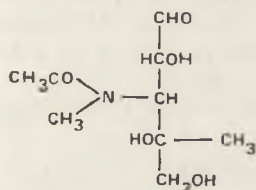
Formy acykliczne przedstawiono na Ryc. 18, Ryc. 19, Ryc. 20, Ryc. 21, Ryc. 22 i Ryc. 23, cykliczne na Ryc. 24, Ryc. 25 i Ryc. 26.



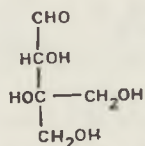
Ryc. 18. Kladynoza. 2,6-dideoksy-3-C-metylo-3-O-metylo-L-rybo-heksoza



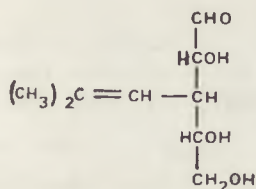
Ryc. 19. Hamameloza. 2-C-(hydroksymetylo)-D-ryboza



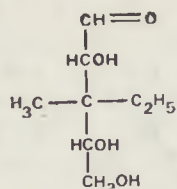
Ryc. 20. N-acetylogarozamina. 3-deoksy-4-C-metylo-3-C-(N-metylo-acetamido)-L-arabinoza. Uwaga! Związek ten uważa się raczej za arabinozę, niż arabino-pentozę ponieważ zastąpienie tlenu azotem (lub innym heteroatomem) wciąż pozwala uważać go za pochodną arabinozy.



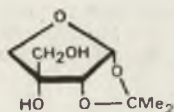
Ryc. 21. D-apioza. 3-C-(hydroksymetylo)-D-glicero-tetroza



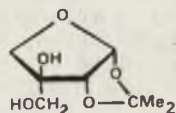
Ryc. 22. 3-deoksy-3-C-(2-metylo-1-propenylo)-D-ksylo-pentozą



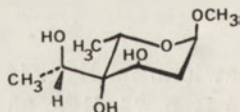
Ryc. 23. 3-deoksy-3-C-etylo-3-C-metylo-D-rybo-pentozą



Ryc. 24. Z D-apiozy: 3-C-(hydroksymetylo)-1,2-O-izopropylideno-α-D-erythro-tetrofuranosa



Ryc. 25. Z D-apiozy: 3-C-(hydroksymetylo)-1,2-O-izopropylideno-β-L-treo-tetrofuranosa



Ryc. 26. Metylo-2,6-dideoksy-4-C-(L-glicero-1-hydroksyetylo)- α -L-ksylo-heksopiranozyd

PIŚMIENNICTWO

1. Tentative rules for carbohydrate nomenclature, part 1. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1969, *Biochemistry*, **10**, 3985—4004 i 4995 (1971) i inne czasopisma. Patrz także str. 174—195 w [2].
2. Biochemical Nomenclature and Related Documents, IUB, The Biochemical Society, London, 1978.
3. Rules for the nomenclature of organic chemistry, section E, stereochemistry (recommendations 1974), IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry, *Pure Appl. Chem.*, **45**, 11—30, (1976), patrz też część E w [4] i str. 1—18 w [2].
Nomenklatura związków organicznych, część E, Stereochemia, PWN, Warszawa—Łódź, 1979.
4. Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC, Sections A, B, C, D, E, F and H, Pergamon, Oxford, 1979.
Nomenklatura związków organicznych, część A, B, PWN, Warszawa—Łódź, 1978, część C, PWN, 1979, część E, PWN, 1978.

SŁOWNICTWO MONOSACHARYDÓW NIENASYCONYCH

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): „Nomenclature of Unsaturated Monosaccharides, Recommendations 1980”, opublikowanego w *Eur. J. Biochem.*, **119**, 1—3, (1981) i w innych czasopismach

Tłumaczyli *Andrzej Gamian i Ewa Katzenellenbogen*

Podano zalecenia dotyczące nazewnictwa monosacharydów nienasyconych. Opisano sposób użycia wrostka (infix) „en” oznaczającego wiązanie podwójne. Dla określenia pochodnych cukrowych z wiązaniami potrójnymi lub sprzężonymi wiązaniami podwójnymi należy w ich nazwach użyć przedrostków „dehydro” wskazujących położenie wiązań jak i przedrostków „deoksy”.

Zalecenia niniejsze dotyczą nazw cukrów zawierających podwójne lub potrójne wiązania między dwoma sąsiednimi atomami węgla łańcucha

szkieletowego pochodnej monosacharydowej. Wiązanie podwójne pomiędzy atomem węgla łańcucha szkieletowego i atomem na zewnątrz łańcucha, a także wiązanie podwójne lub potrójne pomiędzy dwoma atomami węgla na zewnątrz łańcucha szkieletowego będzie traktowane według normalnych zasad nomenklatury organicznej [1].

1. Wiązania podwójne

Pochodne monosacharydowe zawierające podwójne wiązanie między dwoma sąsiednimi atomami węgla łańcucha szkieletowego otrzymają nazwę przez wstawienie w nazwę odpowiedniej całkowicie nasyconej pochodnej wrostka „x-en”. Wrostek ten umieszcza się bezpośrednio po nazwie rdzenia określającej długość łańcucha cukru. Lokant x jest numerem pozycji niżej numerowanego atomu węgla zaangażowanego w wiązanie podwójne. Relacje steryczne w wiązaniu podwójnym zaznacza się, jeżeli zajdzie potrzeba, za pomocą przedrostków (Z) — i (E) — poprzedzających całą nazwę. Uwagi.

a) Termin „glikal” nie jest zalecany, jest on nazwą zwyczajową cyklicznych enolowych eterowych pochodnych cukrów mających wiązanie podwójne pomiędzy atomami węgla 1 i 2 pierścienia. Terminu tego nie należy używać ani modyfikować przy nazywaniu pochodnych monosacharydowych zawierających podwójne wiązanie w jakiegokolwiek innej pozycji.

b) Stosując zasadę wyprowadzania nazwy od pochodnej nasyconej, składniki mające grupę >C=CR-O- jako część systemu pierścieniowego określa się jako pochodne nienasycone anhydro alditoli w przypadku, gdy R jest wodorem lub węglem; w przypadku zaś, gdy R jest atomem fluorowca, chalkogenem lub pierwiastkiem z rodziny azotowców nazwa powinna być nazwą glicenozy lub pochodnej glicenozylowej.

c) Dla lepszego brzmienia, jeśli zajdzie potrzeba, można używać wrostka „eno”.

d) Oznaczenia steryczne (Z) — i (E) — (patrz [2]) można pominąć w przypadku, gdy wiązanie podwójne znajduje się w obrębie systemu pierścienia zbudowanego z sześciu lub mniej atomów, ponieważ wymogi steryczne w takich systemach zezwalają zazwyczaj tylko na formę (Z)—.

2. Wiązania potrójne lub sprzężone wiązania podwójne

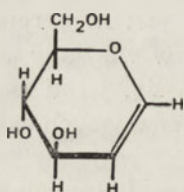
Pochodne monosacharydowe zawierające wiązanie potrójne lub sprzężone wiązania podwójne w łańcuchu szkieletowym powinny być nazywane na podstawie odpowiedniego całkowicie nasyconego cukru przez użycie właściwej liczby przedrostków dehydro i deoksy (patrz Uwaga). Przed-

rośliny winny być umieszczone w porządku alfabetycznym przed nazwą rdzeniową.

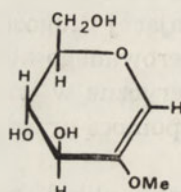
Związki te można również nazywać zgodnie z regułami nomenklatury organicznej IUPAC.

Uwaga: Atomy węgla w łańcuchu szkieletowym związków ze sprzężonymi wiązaniami nie mają przyłączonych ani atomów wodoru ani grup OH. Przyrostki zaś takie jak -itol sugerują obecność atomu tlenu na każdym z atomów węgla. (patrz [4]). Nazwy zatem takie jak pentynitol lub 2,3-pentadienitol są przeto bezsensowne ponieważ określają związki, które istnieć nie mogą.

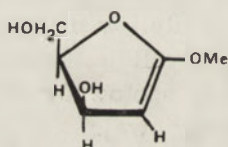
Przykłady przedstawiono na Rycinach 1—25.



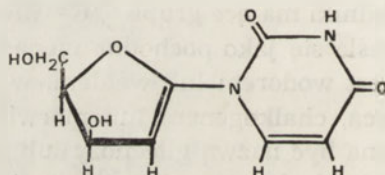
Ryc. 1. 1,5-anhydro-2-deoksy-D-arabinoheks-1-enitol (nie zalecana nazwa zwyczajowa D-glukal)



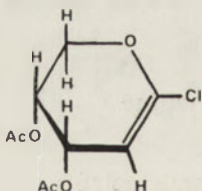
Ryc. 2. 1,5-anhydro-2-O-metylo-D-arabinoheks-1-enitol



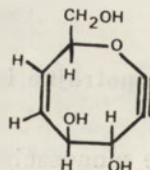
Ryc. 3. Metylo-2-deoksy-D-treo-pent-1-enofuranozyd



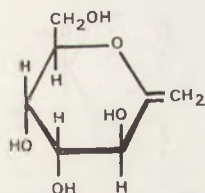
Ryc. 4. 1-(2-deoksy-D-treo-pent-1-enofuranozylo)uracyl



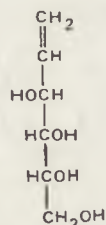
Ryc. 5. Chlorek 3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-D-erythro-pent-1-enopiranozylu



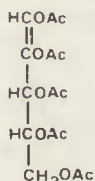
Ryc. 6. (Z)-1,7-anhydro-1,1,2-tetrahydro-2,5,6-trideoksy-D-ksylo-okt-5-enitol



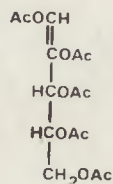
Ryc. 7. 2,6-anhydro-1-deoksy-D-*altrio*-hept-1-enitol (alfabetyczne pierwszeństwo wobec alternatywnej nazwy: 2,6-anhydro-7-deoksy-D-*talo*-hept-6-enitol)



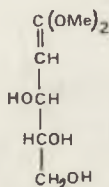
Ryc. 8. 1,2-dideoksy-D-*arabino*-heks-1-enitol



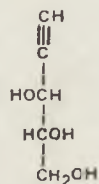
Ryc. 9. (Z)-1,2,3,4,5-penta-O-acetylo-D-*erythro*-pent-1-enitol



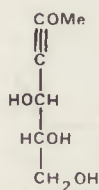
Ryc. 10. (E)-1,2,3,4,5-penta-O-acetylo-D-*erythro*-pent-1-enitol



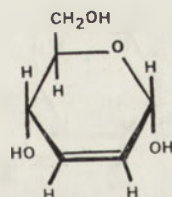
Ryc. 11. Acetal dimetylowy 2-deoksy-D-*treo*-pent-1-enozy



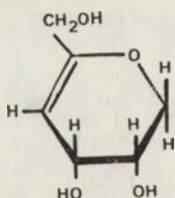
Ryc. 12. 1,1,2,2-tetrahydro-1,2-dideok-*sy*-D-*treo*-pentitol



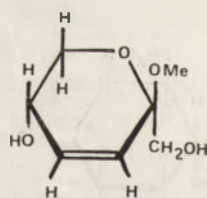
Ryc. 13. 1,1,2,2-tetrahydro-2-deoksy-1-O-metylo-D-*treo*-pentitol



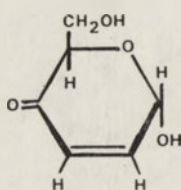
Ryc. 14. 2,3-dideoksy- α -D-*erythro*-heks-2-enopiranoza



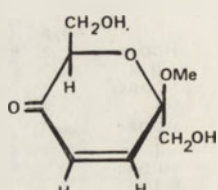
Ryc. 15. 1,5-anhydro-4-deoksy-D-erythro-heks-4-enitol (liczbowe pierwszeństwo przed alternatywną nazwą 2,6-anhydro-3-deoksy-L-erythro-heks-2-enitol)



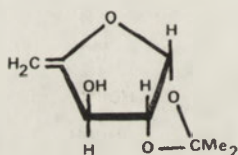
Ryc. 16. Metylo-3,4-dideoksy-beta-D-glicero-heks-3-en-2-uloipiranozyd



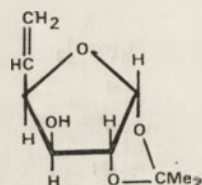
Ryc. 17. 2,3-dideoksy-alpha-D-glicero-heks-2-enopiranozo-4-uloza



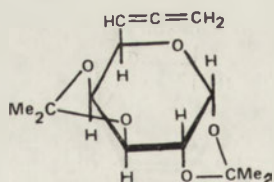
Ryc. 18. Metylo-3,4-dideoksy-beta-D-glicero-hept-3-en-2-uloipiranozydo-5-uloza



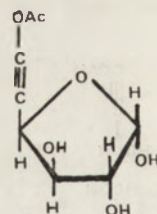
Ryc. 19. 5-deoksy-1,2-O-izopropylideno-beta-L-treo-pent-4-enofuranoza



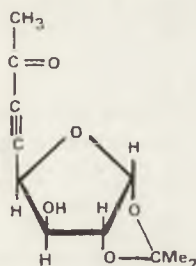
Ryc. 20. 5,6-dideoksy-1,2-O-izopropylideno-alpha-D-ksylo-heks-5-enofuranoza



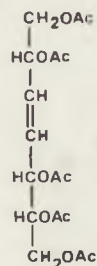
Ryc. 21. 6,7,7,8-tetradehydro-6,7,8-trideoksy-1,2:3,4-di-O-izopropylideno-alpha-D-galakto-oktopiranoza



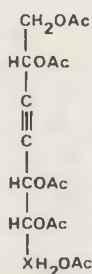
Ryc. 22. 6-O-acetylo-5,5,6,6-tetradehydro-5-deoksy-alpha-D-ksylo-heks-5-enofuranoza



Ryc. 23. 5,5,6,6-tetrahydro-5,6,8-trideok-
sy-1,2-O-izopropylideno- α -D-ksylo-okto-
1,4-furanozo-7-uloza



Ryc. 24. (Z)-1,2,5,6,7-penta-O-acetylo-3,4-
dideokso-D-rybo-hept-3-enitol



Ryc. 25. 1,2,5,6,7-penta-O-acetylo-3,3,4,4-tetrahydro-3,4-dideokso-D-rybo-heptitol

PISMIENICTWO

1. Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC, Sections A, B, C, D, E, F and H, Pergamon, Oxford 1979.
Nomenklatura związków organicznych, część A, B, PWN, Warszawa—Łódź 1978, część C, PWN, 1979, część E, PWN, 1979.
2. Rules for the nomenclature of organic chemistry, section E, stereochemistry recommendations 1974), IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry, *Pure Appl. Chem.*, 45, 11—30 (1976), patrz też część E w [1] i str. 1—18 w [3].
Nomenklatura związków organicznych, część E, Stereochemia, PWN, Warszawa—Łódź, 1979.
3. Biochemical Nomenclature and Related Documents, IUB, The Biochemical Society, London, 1978.
4. Tentative rules for carbohydrate nomenclature, part 1, IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1969, *Biochemistry*, 10, 3985—4004 i 4995 (1971) i inne czasopisma. Patrz także str. 174—195 w [3].
Nowe polskie słownictwo biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa, 1983.

SKRÓCONE NAZWY ŁAŃCUCHÓW OLIGOSACHARYDOWYCH

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): „Abbreviated Terminology of Oligosaccharide Chains, Recommendations 1980”, opublikowanego w *Eur. J. Biochem.*, **126**, 433–437, (1982) i w innych czasopismach.

Tłumaczyli *Andrzej Gamian i Ewa Katzenellenbogen*

Spis treści

1. Piśmiennictwo
2. Definicje
3. Zalecenia
 - 3.1. Nazwy zwyczajowe
 - 3.2. Nazwy systematyczne
 - 3.3. Skróty nazw używane w nomenklaturze oligosacharydów
 - a-d. Symbole cukrów i ich użycie
 - e. Kwasy uronowe
 - f. Deoksycukry
 - g. Aminodeoksycukry
 - h. Anhydrocukry (etera wewnątrzcząsteczkowe)
 - i. Konfiguracja
 - j. Konfiguracja anomeryczna
 - k. Użycie wzorów
 - 3.4. Oligosacharydy nierozgałęzione
 - 3.5. Oligosacharydy cykliczne
 - 3.6. Oligosacharydy rozgałęzione i podstawione
4. Dodatek: Zwięzły system symboli reszt cukrowych w łańcuchach oligosacharydowych

1. Piśmiennictwo

Nazwy systematyczne i wzory strukturalne oligosacharydów i łańcuchów oligosacharydowych w polisacharydach i glikokoniugatach stają się niewygodne, jeśli stosuje się je na oznaczanie cząsteczek o większych wymiarach. W przypadku tych ostatnich pojawia się potrzeba użycia nazw skróconych. Poniższe zalecenia, oparte na raporcie podkomitetu, uwzględniają głównie to, co już stało się praktyką w piśmiennictwie na temat węglowodanów.

Zalecenia niniejsze oparte na Tymczasowych Regułach Nomenklatury Węglowodanów, opracowanych przez Komisję IUPAC-IUB [1] podają w przejrzysty sposób wszystkie dostępne informacje strukturalne. W przypadku kiedy potrzeba bardziej skondensowanego zestawu skrótów, powinno się stosować zalecenia podane w dziale Lip-9.3 Słownictwa Lipi-

dów [2]. Zalecenia te wraz z kilkoma przykładami ich zastosowania podane są w Dodatku do niniejszego dokumentu.

2. Definicje

Oligosacharyd jest cząsteczką zawierającą kilka (od 2 do około 10) reszt monosacharydowych połączonych wiązaniami glikozydowymi. Cukier zawierający dwie takie reszty jest disacharydem, zawierający trzy takie reszty trisacharydem itd.

3. Zalecenia

3.1. Nazwy zwyczajowe

a) Dopuszcza się dalsze stosowanie nazw zwyczajowych, utrwalonych w literaturze i zastrzeżonych dla określonych struktur w tych przypadkach, gdy pełne nazwy byłyby niewygodne w użyciu.

Przykłady:

Disacharydy: celobioza, chitobioza, gencjbioza, kojibioza, laktoza, melibioza, soforoza, α,α -trehaloza, sacharoza, turanoza

Tri- i oligosacharydy: melezytoza, panoza, rafinoza, stachioza

Dalsze przykłady podane są w dziale Lip-9 Słownictwa Lipidów [2].

b) Nazwy takich disacharydów, jak ksylobioza i mannobioza, są dwuznaczne i można je używać tylko wtedy, gdy nie ma ryzyka wprowadzenia niejasności. Nazwa systematyczna powinna być podana razem ze zwyczajową przy pierwszym wzmiankowaniu.

c) Przyjęte nazwy zwyczajowe disacharydów na określenie wyższych oligosacharydów można używać tylko wtedy, gdy oligosacharyd zawiera jeden rodzaj reszt cukrowych i wiązań.

Przykłady: celotetraoza, maltotrioza.

Jeżeli nazwa zwyczajowa wyższego oligosacharydu pochodzi od nazwy węglowodanu zawierającego dwa lub więcej różnych rodzajów cukrów lub rodzajów wiązań, stosowanie jej nie jest wskazane.

Przykłady: Nie zaleca się takich nazw, jak agarotetraoza i nigeorotrioza.

3.2. Nazwy systematyczne

Nazwy systematyczne powinny być stosowane według reguł Carb-8.39 i Carb-8.40 [1].

3.3. Skróty nazw oligosacharydów

a) Wskazane symbole pochodzą od nazw zwyczajowych cukrów składowych. Dla jasności, zwięzłości i możliwości umieszczania w tabelach, tam gdzie jest to możliwe, symbole zostały ograniczone do trzech liter nazwy zwyczajowej.

Alloza	= All	Liksoza	= Lyx
Altroza	= Alt	Ryboza	= Rib
Galaktoza	= Gal	Ksyloza	= Xyl
Glukoza	= Glc	Ramnoza	= Rha
Guloza	= Gul	Fukoza	= Fuc
Idoza	= Ido	Fruktoza	= Fru
Mannoza	= Man	Kwas neuraminowy	= Neu
Taloza	= Tal	Kwas muraminowy	= Mur
Arabinoza	= Ara		

Symbole pochodzące od rzadziej używanych nazw zwyczajowych można stosować, ale nazwa systematyczna powinna być wówczas podana razem z nazwą zwyczajową i skrótem przy pierwszym wzmiankowaniu.

Przykłady:

3,6-dideoksy-D-ksylo-heksoza (abekwoza = Abe)
 6-deoksy-D-glukoza (kwinowoza = Qui)
 3-C-(hydroksymetylo)-D-glicero-aldotetroza (D-apioza =
 = Api)

b) Symbole reprezentują zarówno strukturalne wzory związków, jak i ich nazwy.

c) Symbole reprezentują poszczególne cukry lub ich reszty. W tekstach pisanych nie należy używać symboli wolnych cukrów, można ich jednak używać w tabelach, diagramach i na rycinach.

d) Odmiany pierścieniowe cukru można zaznaczyć tam, gdzie to potrzebne, przez dopisanie do odpowiedniego symbolu nazwy monosacharydu pierwszej litery słów: furanoza, piranoza lub septanoza, pisanej małą literą i kursywą.

Przykłady:

Arabinofuranoza = Araf
 Glukopiranoza = Glcp

e) Kwas uronowy — Przyrostek A dodaje się do symbolu monosacharydu macierzystego.

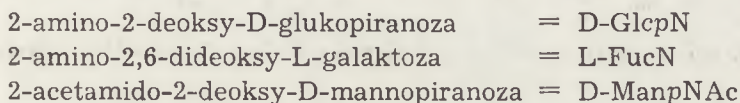
Przykłady:

Kwas glukuronowy = GlcA
 Kwas galaktopiranuronowy = GalpA

f) Deoksycukry — Zaleca się pełne nazwy, a nie ich skróty. Jedynym wyjątkiem jest 2-deoksy-D-erytro-pentoza (deoksyryboza), którą określa się skrótem dRib.

g) Aminodeoksycukry — W przypadku 2-amino-2-deoksycukrów do symbolu cukru macierzystego dodaje się przyrostek N. Jeśli monosacharyd jest N-acetylowany, stosuje się przyrostek NAc.

Przykłady:



W przypadku innych, mniej rozpowszechnionych aminodeoksycukrów dodaje się odpowiednie lokanty przed literą N.

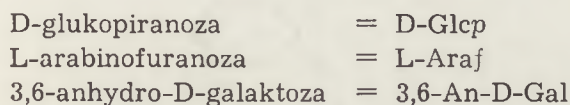
Przykład: 3,6-Bis(acetamido)-3,6-dideoksymannoza = Man_{3,6}(NAc)₂

h) W przypadku anhydrocukrów odpowiednie lokanty i przedrostek An dodaje się przed symbolem monosacharydu macierzystego.

Przykład: 3,6-anhydrogalaktoza = 3,6AnGal

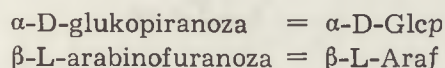
i) Konfiguracja — Symbol konfiguracyjny (D lub L) umieszcza się przed symbolem monosacharydu i oddziela od niego łącznikiem (*hyphen*).

Przykłady:



j) Konfiguracja anomeryczna — Symbol anomeru (α lub β) umieszcza się przed symbolem konfiguracyjnym i oddziela od niego łącznikiem.

Przykłady:



k) Wzory strukturalne skomplikowanych struktur można podawać jednocześnie z zapisem skróconym celem jaśniejszego ich przedstawienia.

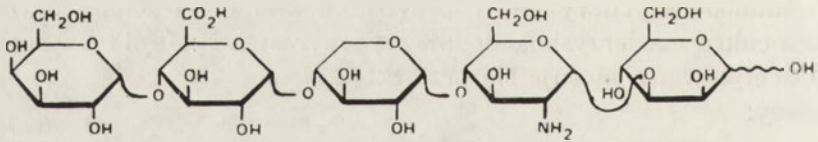
3.4. Oligosacharydy nierozgałęzione

Między symbolami (nazwami skróconymi) jednej monosacharydowej grupy lub reszty i reszty następnej umieszcza się dwa lokanty, które wskazują odpowiednie atomy biorące udział w wiązaniu glikozydowym. Lokanty te (zapisane w nawiasie) rozdzielone są strzałką (skierowaną od lokanta odpowiadającego glikozylowemu atomowi węgla do lokanta odpowiadającego atomowi węgla z grupą hydroksylową zaangażowaną w wiązanie) (patrz Reguła Carb-8.40 [1]). W przypadku oligosacharydów nieredukujących, strzałek dwukierunkowych między lokantami odpowiednich glikozylowych atomów węgla używa się tylko w sytuacji, kiedy stosowane są symbole, a nie nazwy.

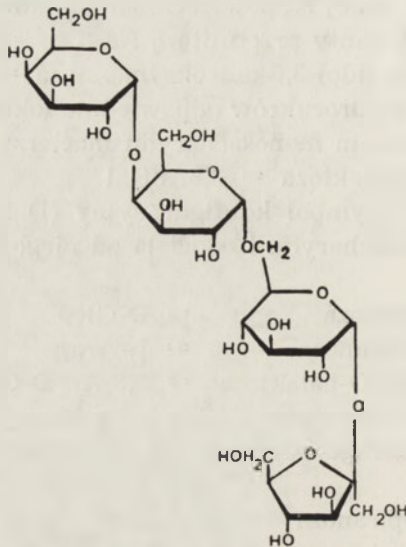
Łączniki, nie służące do oddzielenia symbolu konfiguracyjnego od symbolu monosacharydu, można pominąć np.



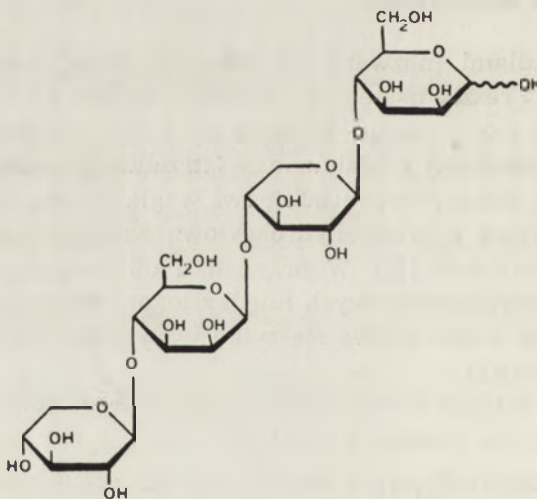
Przykłady podano na Ryc. 1, Ryc. 2 i Ryc. 3.



Ryc. 1. α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- α -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpN-(1 \rightarrow 3)-D-Manp



Ryc. 2. α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-Fruf



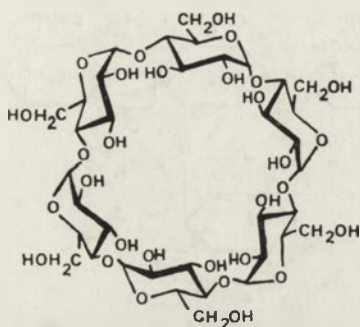
Ryc. 3. β -D-Xylp(1 \rightarrow 4)- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-D-Manp

3.5. Oligosacharydy cykliczne

Oligosacharyd cykliczny można przedstawić za pomocą symboli, jak podano na Ryc. 4.

Przykład:

Cyklomaltohekszoza (starsze nazwy — cykloheksaamyloza, α -dekstryna Schardingera lub α -cyklodekstryna nie są wskazane)



Ryc. 4 α -[4]-[α -D-Glcp] $_6$ (1)

3.6. Oligosacharydy rozgałęzione i podstawione

a) Podstawniki można oznaczać następującymi symbolami:

acetyl	= Ac	metyl	= Me
benzoił	= Bz	fenyl	= Ph
benzyl	= Bzl, PhCH ₂ (Bn)	p-toluenosulfonyl	= Tos (Ts) tosyl
etył	= Et	trimetylosilył	= Me ₃ Si
glikolyl	= Gl	tritył	= Trt, Ph ₃ C (Tr)
metanosulfonyl	= MeSO ₂ (Ms) mesyl		

Większość z tych symboli znajduje się na listach symboli zalecanych do użytku biochemicznego [3] lub do przedstawiania pochodnych aminokwasów [4]. Niektóre symbole, powszechnie używane w literaturze węglowodanowej, podane są w nawiasach. Podstawników nie poprzedza się symbolem atomu, jeśli łączą się z tlenem lub azotem, ale jeśli wiążą się z węglem, poprzedza się literą C, pisaną kursywą. Miejsce podstawienia wskazuje odpowiedni lokant cyfrowy. Podstawniki umieszcza się bezpośrednio po skrócie reszty monosacharydowej.

Przykłady:

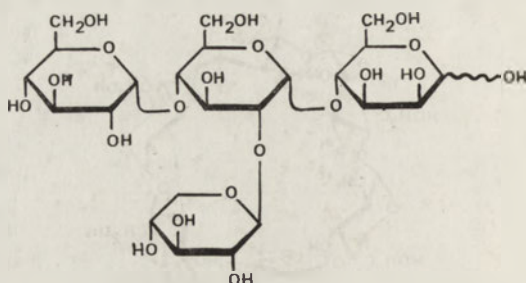
D-glukopirauronian etylu	= D-GlcpA6Et
4-siarczan β -D-galaktopiranozy	= β -D-Galp4SO ₃ ⁻
2-C-metylo-D-ksyloza	= D-Xyl2CMe
3,4-di-O-metylo-L-ramnoza	= L-Rha3,4Me ₂

Kwas *N*-acetylneuraminowy = Neu5Ac

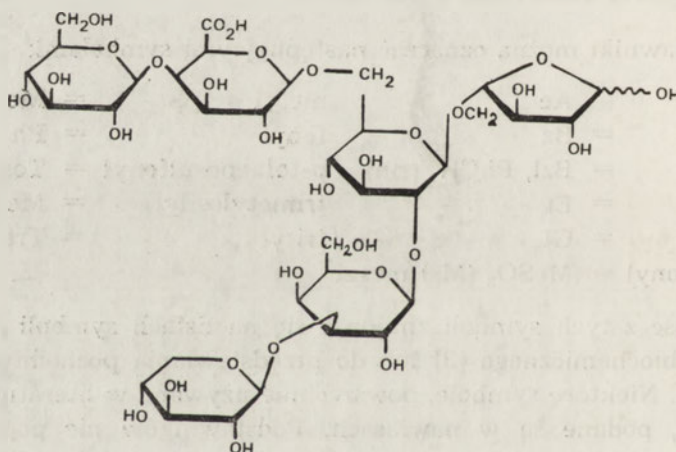
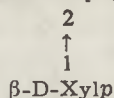
Kwas *N*-acetylo-2-deoksyneuro-2-enaminowy = Neu2en5Ac

b) W przypadku rozgałęzionych oligosacharydów łańcuch główny i oligosacharydowe łańcuchy boczne przedstawia się tak, jak to ustalono dla oligosacharydów nierozgałęzionych. Miejsce rozgałęzienia wskazuje się powyżej lub poniżej łańcucha głównego liczbami i strzałką określającymi wiązanie glikozydowe.

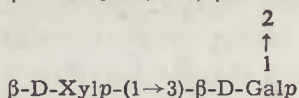
Przykłady przedstawiono na Ryc. 5 i Ryc. 6.



Ryc. 5. α -D-Glcp-(1→4)- α -D-Glcp-(1→4)-Manp

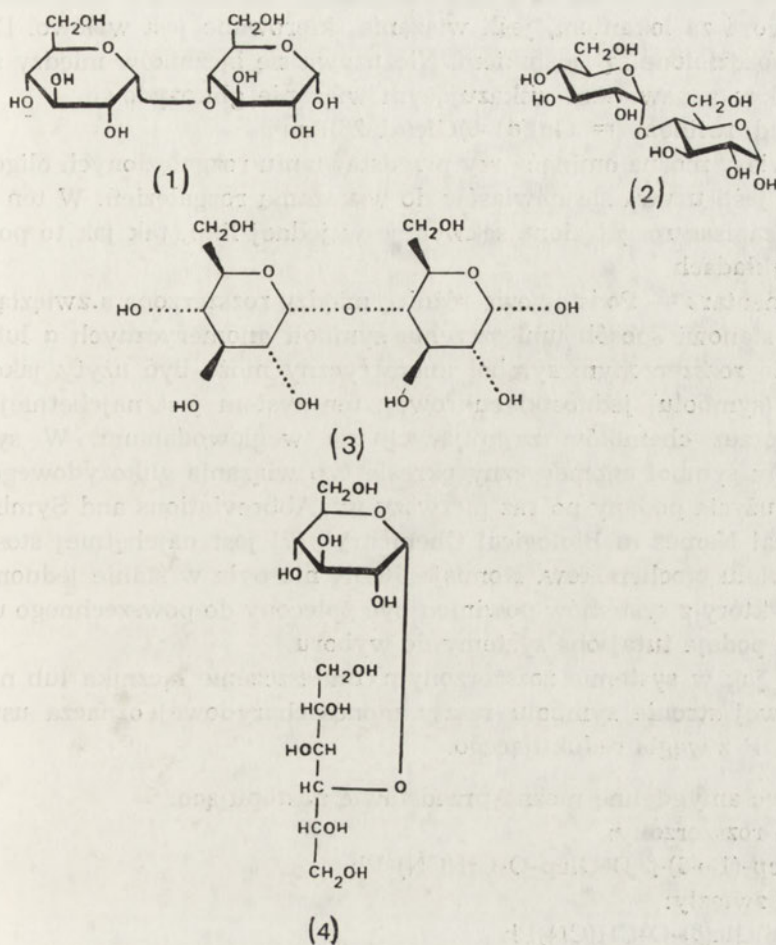


Ryc. 6. β -D-Glcp-(1→4)- β -D-GalpA-(1→6)- β -D-Glcp-(1→5)-L-Araf



c) Przy rysowaniu wzorów strukturalnych można używać wzorów przestrzennych Haworth'a (wzór 1 na Ryc. 7), wzorów konformacyjnych (wzór 2 na Ryc. 7) lub wzorów Mills'a [5] (wzór 3 na Ryc. 7 [1, 6]). Trzeba jednak pamiętać o tym, że szczegółowa konformacja wskazana przez wzór kon-

formacyjny nie w każdym przypadku została definitywnie ustalona. Wzory Mills'a są szczególnie użyteczne w opisach stosowanych w pracach syntetycznych. Czasem zaleca się użycie wzoru Fischera (wzór 4 na Ryc. 7).



Ryc. 7. α -maltoza (wzór 1, 2 i 3) i maltitol, 4-O- α -D-glukopiranozylo-D-glucytol (wzór 4)

4. Dodatek

Zwięzły system oznaczania reszt cukrowych w oligosacharydach i łańcuchach oligosacharydowych.

Zgodnie z tym systemem sugestia o pospolicie występującej konfiguracji i wielkości pierścienia zawarta jest już w samym symbolu. Tak więc Glc oznaczają D-glukopiranozę; Fru, D-fruktofuranozę; Fuc, L-fukopiranozę. Jeżeli wiadomo, że konfiguracja lub wielkość pierścienia różni się od powszechnie występujących lub ma być w szczególny sposób podkreślona,

można to wskazać przez użycie odpowiednich symboli z rozszerzonego systemu.

Symbol anomeryczny wskazuje konfigurację wiązania glikozydowego i dlatego umieszcza się go przed lokantem, jeśli wiązanie skierowane jest w prawo, i za lokantem, jeśli wiązanie skierowane jest w lewo. Dwa lokanty rozdzielone są łącznikiem. Nie używa się łączników między symbolem cukru a nawiasem wskazującym wiązanie glikozydowe.

Przykład: rafinoza = Gal(α 1-6)Glc(α 1-2 β)Fru

Nawiasy można ominąć przy przedstawianiu rozgałęzionych oligosacharydów, jeśli używa się nawiasów do wskazania rozgałęzień. W ten sposób można zapisać rozgałęzione sekwencje w jednej linii, tak jak to pokazano na przykładach.

Komentarz — Podstawową różnicę między rozszerzoną a zwięzłą formą zapisu stanowi sposób umieszczenia symboli anomerycznych α lub β . W systemie rozszerzonym symbol anomeryczny może być użyty jako część nazwy (symbolu) jednostki cukrowej; ten system jest najchętniej stosowany przez chemików zajmujących się węglowodanami. W systemie zwięzłym symbol anomeryczny określa typ wiązania glikozydowego. Taki sposób użycia podany po raz pierwszy w „Abbreviations and Symbols for Chemical Names in Biological Chemistry” [7] jest najchętniej stosowany przez wielu biochemików. Komisja JCBN nie była w stanie jednomyślnie ustalić, który z systemów powinien być polecony do powszechnego użytku, dlatego podaje tutaj oba systemy do wyboru.

Tak jak w systemie rozszerzonym, umieszczenie łącznika lub nawiasu po prawej stronie symbolu reszty monosacharydowej oznacza usunięcie grupy OH z węgla redukującego.

Tak więc amygdalinę można przedstawić następująco:

System rozszerzony:

β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-O-CH(CN)-Ph

System zwięzły:

Glc(β 1-6)Glc(β)-O-CH(CN)Ph

Dotyczy to również przedstawiania glikolipidów (odnośnik 2, dział Lip-9.3).

Następujące przykłady ilustrują użycie dwóch różnych systemów. Odnoszą się one do struktur I—VI podanych wyżej.

Komentarz — Przy długich lub wielokrotnych rozgałęzieniach poleca się używanie dwuliniowego zapisu nawet w systemie zwięzłym.

Struktura I (Ryc. 1)

System rozszerzony: α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- α -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpN-(1 \rightarrow 3)-D-Manp

System zwięzły: Gal(α 1-4)GlcA(α 1-4)Xyl(α 1-4)GlcN(α 1-3)Man

Struktura II (Ryc. 2)

System rozszerzony: α -D-Galp-(1→4)- α -D-Galp-(1→6)- α -D-Glcp-(1↔2- β -D-Fruf

System zwięzły: Gal(α 1-4)Gal(α 1-6)Glc(α 1-2 β)Fru

Struktura III (Ryc. 3)

System rozszerzony: β -D-Xylp-(1→4)- β -D-Manp-(1→4)- β -D-Xylp-(1→4)-D-Manp

System zwięzły: Xylp(β 1-4)Man(β 1-4)Xylp(β 1-4)Man

Uwaga: W tym przypadku używa się tylko Xylp w systemie zwięzłym, żeby zaznaczyć formę piranozową.

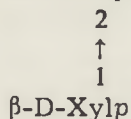
Struktura IV (Ryc. 4)

System rozszerzony: α 4)-[α -D-Glcp]₆-(1

System zwięzły: [\rightarrow 4Glc α 1 \rightarrow]₆ lub [4Glc α 1]₆

Struktura V (Ryc. 5)

System rozszerzony: α -D-Glcp-(1→4)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Manp

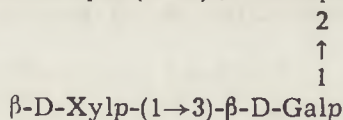


System zwięzły: Glc α 1-4(Xyl β 1-2)Glc α 1-4Man

Struktura VI (Ryc. 6)

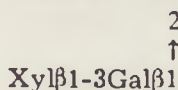
System rozszerzony:

β -D-Glcp-(1→4)- β -D-GalpA-(1→6)- β -D-Glcp-(1→5)-L-Araf



System zwięzły: Glc β 1-4GalA β 1-6(Xyl β 1-3Gal β 1-2)Glc β 1-5Ara
lub

Glc β 1-4GalA β 1-6Glc β 1-5Ara

**PISMIENICTWO**

1. Tentative rules for carbohydrate nomenclature, part 1, 1969, *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 3rd Ed. 1978, IUB, 174—195, *Biochemistry*, **10**, 3985—4004 i 4995 (1971) i inne czasopisma.

2. The Nomenclature of lipids, 1976, Biochemical Nomenclature and Related Documents, 3rd Ed. 1978, IUB, 122—132, *Biochem. J.*, **171**, 21—35, (1978) i inne czasopisma.
Nowe polskie słownictwo biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa, 1983.
3. Abbreviations and Symbols, Biochemical Nomenclature and Related Documents, 3rd Ed. 1978, IUB, pp. 57—61, *Eur. J. Biochem.*, **74**, 1—5, (1977).
4. Symbols for Amino-Acid Derivatives and Peptides, 1971, Biochemical Nomenclature and Related Documents, 3rd Ed. 1978, IUB, 78—84, *Eur. J. Biochem.*, **27**, 201—207, (1972) i inne czasopisma.
Nowe polskie słownictwo biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa, 1983.
5. Mills J. A., (1955), *Adv. Carbohydr. Chem.*, **10**, 1—53.
6. Section E. Stereochemistry, w: Nomenclature of Organic Chemistry (1979, pp. 473—490, Pergamon, Oxford, patrz także w Biochemical Nomenclature and Related Documents, 3rd Ed. 1978, IUB, pp. 1—18.
Nomenklatura związków organicznych, część E, Stereochemia, PWN, Warszawa—Łódź, 1979.
7. Abbreviations and Symbols for Chemical Names of Special Interest in Biological Chemistry, 1965, Biochemical Nomenclature and Related Documents, 3rd Ed. IUB pp. 52—56, *Biochemistry*, **5**, 1445—1453 (1966) i inne czasopisma.

SŁOWNICTWO POLISACHARYDÓW

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): „Polysaccharide Nomenclature, Recommendations 1980”, opublikowanego w *Eur. J. Biochem.*, **126**, 439—441, (1982) i w innych czasopismach.

Tłumaczyli Ewa Katzenellenbogen i Andrzej Gamian

Spis treści

1. Nazwy ogólne
2. Znaczenie końcówki -an
3. Konfiguracja jednostek
4. Tworzenie nazw nowo odkrytych polisacharydów
5. Pochodne kwasów uronowych
6. Pochodne aminodeoksycukrów
7. Polisacharydy zbudowane z więcej niż jednego rodzaju reszt
8. Oznaczenie wiązań
9. Reszty podstawione
10. Glikoproteiny, proteoglikany i peptydoglikany

Słownictwo polisacharydów opiera się na ogólnych zasadach ustalonych dla słownictwa organicznego [1] i węglowodanów [2]. Zalecane skróty zawarte są w *Abbreviated Terminology of Oligosaccharide Chains* — dokumencie opublikowanym równocześnie z niniejszym i podającym symbole jasno przedstawiające wszystkie znane cechy strukturalne oraz w Dodatku do wyżej wspomnianego dokumentu (a także w dziale Lip-3 w *Nomenklaturze Lipidów* [3]), zawierającym bardziej zwięzły system skrótów. Przykłady obu systemów skrótowych podano w niniejszym artykule.

1. Polisacharydem (glikanem) nazywa się makrocząsteczkę zbudowaną z dużej ilości reszt monosacharydowych (glikoz) połączonych między sobą wiązaniami glikozydowymi. Termin poli (glikoza) nie jest w pełnym znaczeniu synonimem polisacharydu (glikanu) (zob. *Nomenclature of Regular Single Strand Organic Polymers* [4]), ponieważ obejmuje również makrocząsteczki złożone z reszt glikozowych połączonych między sobą wiązaniami nieglikozydowymi.

Uwaga: Polisacharydy mogą być liniowe, rozgałęzione lub cykliczne. Większość polisacharydów posiada na jednym końcu redukującą resztę monosacharydową i dlatego są związkami redukującymi, jednakże istnieją polisacharydy mające nieredukujące reszty na obu końcach cząsteczki.

Polisacharydy zawierające stosunkowo dużą ilość reszt aminocukrowych można prawidłowo określać terminem polisacharyd, jednak gdy zajdzie potrzeba szczegółowego podkreślenia, można zastosować termin glikozoaminoglikan.

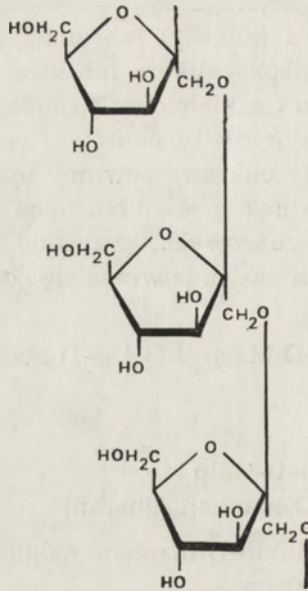
Polisacharydy zbudowane tylko z jednego rodzaju monosacharydu określa się jako homopolisacharydy (homoglikany). Podobnie, jeśli obecne są dwa lub więcej rodzajów monomerycznych jednostek, używa się nazwy grupowej heteropolisacharyd (heteroglikan).

Terminu oligosacharyd używa się powszechnie na określenie węglowodanów zbudowanych z 2 do około 10 reszt monosacharydowych.

2. Nazwę polisacharydu (glikanu) złożonego z jednego typu reszt monosacharydowych tworzy się według ogólnej zasady przez zastąpienie końcówki cukru „oza” przyrostkiem „-an”.

Uwaga: Przykładami powszechnego użycia końcówki „-an” są: ksylian dla polimerów ksylozy, mannan dla polimerów mannozy i galaktan dla polimerów galaktozy. Celuloza i skrobia są glukanami, ponieważ są zbudowane z reszt glukozy.

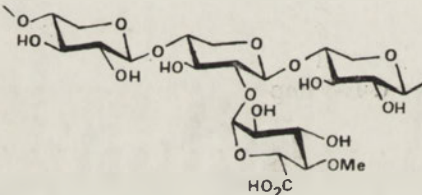
3. Gdy wskazuje się przynależność reszt monomerycznych do odpowiedniej serii konfiguracyjnej, nazwa polisacharydu może być poprzedzona literą „D” lub „L”.



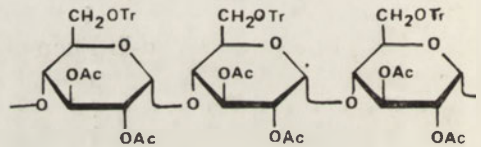
Rys. 2. (2→1)-β-D-fruktofuranan (inulina)

9. Gdy polisacharyd (glikan) jest podstawiony, każdy rodzaj podstawienia reszt cukrowych staje się częścią nazwy i umieszcza się go w porządku alfabetycznym.

Przykłady przedstawiono na Ryc. 3 i Ryc. 4



Rys. 3. (4-O-metylo-α-D-glukuro)-D-ksylan (z brzozy, *Betula*)



Rys. 4. 2,3-di-O-acetylo-6-O-trityloamylza

10. Polimery zawierające kowalencyjnie związane reszty monosacharydowe i aminokwasowe określa się nazwą glikoprotein, proteoglikanów i peptydoglikanów.

Uwaga: Nie jest możliwe przeprowadzenie ścisłej granicy między tymi polimerami. Ogólnie biorąc, glikoproteiny są białkami złożonymi, zawierającymi albo grupy oligosacharydowe albo polisacharydowe o stosunkowo niskiej względnej masie cząsteczkowej. Proteoglikany są białkami przyłączonymi do polisacharydów o wysokiej masie cząsteczkowej. Peptydoglikany zawierają łańcuchy polisacharydowe połączone kowalencyjnie z łańcuchami peptydowymi. Takie związki są składnikami bakteryjnych ścian komórkowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC, Pergamon, Oxford, 1979.
2. Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, 1969, Biochemical Nomenclature and Related Documents, 3rd Ed. 1978, IUB, 174—195, *Biochem. J.*, **125**, 673—695, (1971) i inne czasopisma.
Nowe polskie słownictwo biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa, 1983.
3. The Nomenclature of Lipids, 1976, Biochemical Nomenclature and Related Documents, 3rd Ed. 1978, IUB, 122—132, *Biochem. J.*, **171**, 21—35, (1978) i inne czasopisma.
Nowe polskie słownictwo biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa, 1983.
4. Nomenclature of Regular Single—Strand Organic Polymers (1976) *Pure Appl. Chem.*, **48**, 375—385.

SYMBOLE OPISUJĄCE KONFORMACJĘ
ŁAŃCUCHÓW POLISACHARYDOWYCH

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): „Symbols for Specifying the Conformation of Polysaccharide Chains, Recommendations 1981”, opublikowanego w *Eur. J. Biochem.*, **131**, 5—7, (1983) i w innych czasopismach.

Tłumaczyli *Andrzej Gamian i Ewa Katzenellenbogen*

Spis treści

1. Ogólne zasady zapisu
 - 1.1. Kierunek numerowania
 - 1.2. Jednostka monomeryczna
 - 1.3. Numerowanie atomów
 - 1.4. Odległości międzyatomowe
 - 1.5. Kąty wiązań
 - 1.6. Kształt pierścienia
 - 1.6.1. Endocykliczne kąty torsyjne
 - 1.6.2. Ogólny zapis konformacji reszty cukrowej
 - 1.7. Konformacja ugrupowań bocznych
2. Orientacja wiązania glikozydowego
 - 2.1. Oznaczenie wiązań
 - 2.2. Kąty torsyjne
3. Charakterystyka heliksu

Niniejsze zalecenia przygotowano aby umożliwić precyzyjne określenie konformacji polisacharydów; słownictwo węglowodanów [1] jak również

symbole opisujące formy pierścieniowe monosacharydów [3] i skrócone nazwy oligosacharydów [4] opublikowano osobno. Zalecenia te są zgodne z opublikowanymi zaleceniami dotyczącymi konformacji polinukleotydów [5] i z wcześniejszymi zaleceniami dotyczącymi konformacji polipeptydów [6].

1. Ogólne zasady zapisu

1.1. Kierunek numerowania

Polisacharydy są makrocząsteczkami zbudowanymi z wielu jednostek cukrowych połączonych wiązaniami glikozydowymi. Łańcuch numeruje się od redukującej reszty glikozowej do glikozowej grupy nieredukującej. Stąd wskaźnik i oznacza poszczególną jednostkę sacharydową w łańcuchu polimeru, $(i - 1)$ oznacza sąsiednią jednostkę w kierunku biegnącym od końca nieredukującego oraz $(i + 1)$ — w kierunku do końca nieredukującego. Ten kierunek numerowania wybrano tak, ażeby zysk lub utrata reszty przy końcu nieredukującym przez przeniesienie grupy glikozylowej nie zmieniały numeracji wszystkich jednostek w łańcuchu. Pewne polisacharydy nie zawierają redukujących grup końcowych i są inicjowane przez tworzenie wiązań glikozydowych, np. do O1 (reguła 1.3) innego cukru, do alditolu lub do alkoholu. W przypadku tych polisacharydów, reszta tworząca to wiązanie glikozydowe jest uważana za pierwszy człon łańcucha.

1.2. Jednostka monomeryczna

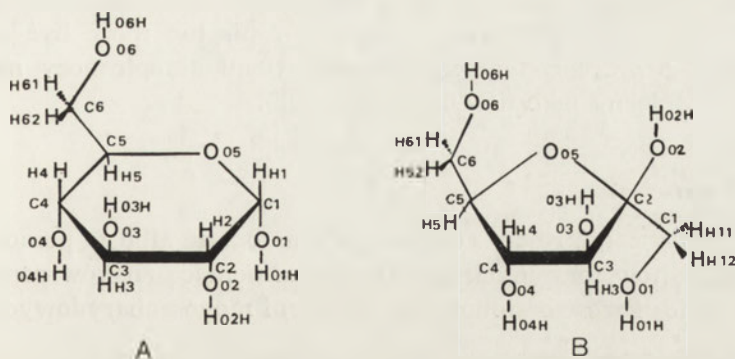
Jednostką monomeryczną jest monosacharyd. W przypadku polisacharydów złożonych strukturę pierwszorzędową powinno podawać się tak, jak opisano w zaleceniach pt. „Skrócone nazwy łańcuchów oligosacharydowych” [4]. Tlen wiązania glikozydowego jest częścią reszty glikozylowanej. Ponieważ jego pozycja jest istotna przy opisie jednostki, kąt torsyjny w wiązaniu glikozydowym jest włączony w charakterystykę reszty cukrowej (reguła 2.2).

Granice jednostki pokazano na Ryc. 4

1.3. Numerowanie atomów

Numerowanie atomów dwu jednostek monosacharydowych (heksopiranozy i heksofuranazy) pokazano na Ryc. 1. Zapis tutaj stosowany jest zgodny z zapisem proponowanym dla opisu konformacji polinukleotydów. Atomy oznaczono więc jako C3, O2, H4 itd. Atomy wodoru grupy metylenowej można rozróżnić przy pomocy dodatkowego numeru, np. H61 i H62, gdzie niższym numerem oznaczono atom *pro-S* [7]. Jeżeli zachodzi ko-

nieczność wskazania określonej jednostki sacharydowej, jej lokant można dodać w nawiasie, np. 03(*i*), C4(*i*+1), H61(*i*-1).



Ryc. 1. Zapis numerowania atomów jednostki hekscypiranozowej (A) i heksofuranozowej (B).

1.4. Odległości międzyatomowe

W tabelarycznych zapisach odległości międzyatomowych atomy nie związane ze sobą przedstawia się przy pomocy pojedynczej kropki między nimi, np. 02.03, zaś wiązania kowalencyjne za pomocą łączników między atomami, np. C1—C2.

Wiązania wodorowe zaznacza się za pomocą linii kropkowanych niezależnie od tego, czy wodór jest pokazany, czy nie, np. 06...05 lub 06-H...05. Atom, przy którym występuje wodór zapisuje się jako pierwszy, jeżeli rozróżnienie takie jest możliwe.

Odległość międzyatomową należy oznaczać jako *b* (C1.C2); symbolu *l* nie powinno się stosować, ponieważ można go pomylić z cyfrą 1, a także dlatego, że litera *l* jest używana do oznaczenia amplitudy drgań w dyfrakcji elektronowej (podrozdz. 1.4 odnośnik 5).

Tabela 1

Przykłady kątów torsyjnych w pierścieniach cukrowych

	Aldofuranozy	Aldopiranozy	Ulofuranazy (np. D-fruktofuranaza)
v0	C4—04—C1—C2	C5—05—C1—C2	C5—05—C2—C3
v1	04—C1—C2—C3	05—C1—C2—C3	—
v2	C1—C2—C3—C4	C1—C2—C3—C4	05—C2—C3—C4
v3	C2—C3—C4—04	C2—C3—C4—C5	C2—C3—C4—C5
v4	C3—C4—04—C1	C3—C4—C5—05	C3—C4—C5—05
v5	—	C4—C5—05—C1	C4—C5—05—C2

1.5. Kąty walencyjne

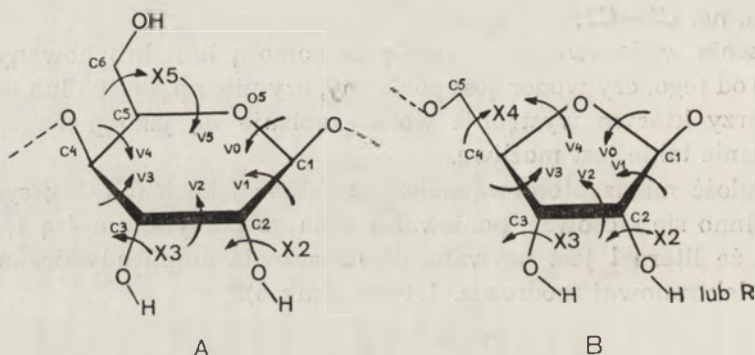
Kąt walencyjny zawarty między trzema atomami A-B-C oznacza się przez „tau” i zapisuje jako $\tau(A,B,C)$. Jeżeli nie ma dwuznaczności, ponieważ centralny atom jest dwuwartościowy, zapis ten może być skrócony do $\tau(B)$. Kąt przy pierścieniowym atomie tlenu aldopiranozy może być wobec tego zapisany jako $\tau(C1,05,05)$ lub $\tau(05)$.

1.6. Kształt pierścienia

Kształt pierścienia reszty cukrowej można opisać albo za pomocą endocyklicznych kątów torsyjnych (1.6.1) albo za pomocą znaków zapisu konformacji pięcio- i sześcioczłonowych pierścieni monosacharydowych (1.6.2).

1.6.1. Endocykliczne kąty torsyjne

W celu przeprowadzenia kompletnego opisu konformacji pierścienia cukrowego, oprócz podania długości wiązań i kątów walencyjnych, konieczne jest sprecyzowanie endocyklicznych kątów torsyjnych wokół przynajmniej kilku wiązań pierścieniowych. Te pierścieniowe kąty torsyjne określane symbolem ν (ni), można opisać przez podanie numeru wskazującego wiązanie, tak jak to zestawiono w Tabelcy 1 (patrz także Rys. 2).



Ryc. 2. Zapis kątów torsyjnych jednostki heksopiranozowej (A) i pentopentofuranozowej (B). Kąty torsyjne ν zdefiniowano w Tabelcy 1. Egzocykliczne kąty torsyjne „ χ ” zdefiniowano w 1.7.

Kąt torsyjny atomów A—B—C—D jest kątem pomiędzy A—B i C—D w rzucie czterech atomów na płaszczyznę prostopadłą do B—C. Przyjęto, że kąt torsyjny jest dodatni, gdy bliższe obserwatora wiązanie, patrząc wzdłuż wiązania centralnego, wymaga obrotu w prawo (zgodnie ze wskazówkami zegara) do uzyskania konformacji naprzeciwległej. Dla dalszych szczegółów patrz rozdz. 1.6 zaleceń dotyczących konformacji polipeptydów [6] lub zaleceń dotyczących stereochemii [7].

Atomami odniesienia tych kątów torsyjnych są zawsze atomy pierścienia. Wskaźnik ν odnosi się do pierwszego atomu wiązania torsyjnego, np. tlen pierścienia oznacza się jako $\nu 0$ a C2 jako $\nu 2$. Stąd $\nu 1$ nie ma sensu w przypadku 2-uloz.

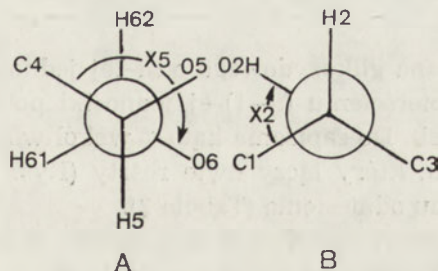
1.6.2. Ogólny zapis konformacji reszty cukrowej

W wielu badaniach kompletny opis pierścienia cukrowego za pomocą terminów określających kąty torsyjne nie jest możliwy, a nie zawsze jest on również konieczny. Istnieje możliwość łatwiejszego opisu za pomocą konwencjonalnego zapisu pierścieni 5- i 6-członowych [3]. W tym zapisie przybliżona konformacja pierścienia wskazana jest za pomocą dużej litery pisanej kursywą, oznaczającej kształt pierścienia, oraz numeracji, która odróżnia wariantowe formy każdego kształtu, np. 4C_1 .

1.7. Konformacja grup bocznych

Podstawnik pierścienia piranozydowej reszty cukrowej, np. grupę hydroksylową, można określić jako aksjalny lub ekwatorialny w danej konformacji. W celu dokładnego opisu orientacji podstawnika pierścienia wieloatomowego konieczne jest podanie kąta torsyjnego wokół wiązania egzocyklicznego. Atomem odniesienia w pierścieniu jest atom węgla z numerem o jeden niższym niż numer węgla podstawionego, chyba że podstawienie ma miejsce na węglu anomerycznym, kiedy to tlen pierścienia staje się atomem odniesienia. Atomem odniesienia w egzocyklicznej grupie $-\text{CH}_2\text{X}$ jest X.

Egzocykliczny kąt torsyjny zapisuje się jako χ (chi), a dalej zaznacza się atomy, do których kąt się odnosi, np. $\chi(\text{C1}-\text{C2}-\text{O2}-\text{H})$, lub tam gdzie nie ma wątpliwości, to po prostu za pomocą znaku χ^2 (Rys. 2 i Rys. 3).

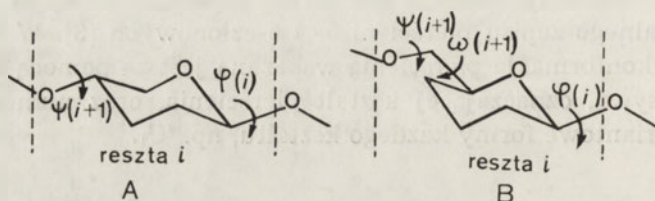


Ryc. 3. Projekcje Newmana [7] pokazujące egzocykliczny kąt torsyjny χ . (A) Rzut wzdłuż wiązania C5—C6 od C5 do C6, pokazujący χ_5 ; (B) rzut wzdłuż wiązania C2—O2 od C2 do O2, pokazujący χ_2 .

2. Orientacja wiązania glikozydowego

2.1. Oznaczenie wiązań

Wiązania glikozydowe są częścią szkieletu polisacharydu. Połączenie glikozydowe można najłatwiej opisać używając symboli jednostek monomerycznych oraz lokantów łącznie ze znakiem opisującym anomerię, np. w celobiozie: Glc(i)(β 1—4)Glc(i—1). Jeżeli zachodzi potrzeba dokładniejszego zapisu, wtedy można go podać w formie C1(i)-O4(i—1)-C4(i—1). Granice i-tej reszty pokazano na Rys. 4



Ryc. 4. Znakowanie kątów torsyjnych określających orientację wiązań glikozydowych w reszcie piranozydowej uwzględniające: (A) glikozylowany hydroksyl pierścienia cukrowego, (B) glikozylowany hydroksyl związany z egzocyklicznym atomem węgla. Granice i-tej reszty zaznaczono za pomocą pionowych linii przerywanych. Numer reszty cukrowej (i-1, i, i+1) przy φ , ψ i ω jest umownie numerem reszty glikozylującej.

2.2. Kąty torsyjne

Tabela 2

Kąt torsyjny φ definiujący część wiązania glikozydowego

Jednostka	Kąt torsyjny
Aldopiranoza	O5(i)—C1(i)—OX(i—1)—CX(i—1)
Aldofuranoza	O4(i)—C1(i)—OX(i—1)—CX(i—1)
Ulopiranoza	O6(i)—C2(i)—OX(i—1)—CX(i—1)
Ulofuranoza	O5(i)—C2(i)—OX(i—1)—CX(i—1)

Do opisanego wiązania glikozydowego od i-tej jednostki do atomu węgla zlokalizowanego w pierścieniu (i—1)-ej jednostki potrzebne są dwa kąty torsyjne φ (fi) i ψ (psi). Do zapisania kąta φ wokół wiązania od węgla anomerycznego do tlenu, który łączy dwie reszty (Rys. 4), używa się tlenu pierścienia jako atomu odniesienia (Tabela 2).

Do opisu kąta torsyjnego ψ wokół wiązania skierowanego od tlenu glikozydowego (i—1) reszty do węgla tej reszty (Rys. 4) jako atom odniesienia stosuje się atom węgla niższy o jednostkę w numeracji. Ponieważ kąt ten określa sposób wiązania i-tej reszty może być oznaczony jako $\psi(i)$. Gdy wiązanie glikozydowe nie obejmuje atomu węgla zlokalizowanego w

pierścieniu lecz dotyczy węgla umiejscowionego w łańcuchu bocznym, istotny jest także kąt ω (omega) wokół następnego wiązania C—C. Dla 1→6 połączonej aldopiranozy kąt ten jest egzocyklicznym kątem $\chi_5(i-1)$ -ej reszty. Niemniej można go oznaczać jako $\omega(i)$ (Rys. 4B) ponieważ odnosi się do i -tej reszty. Kąt torsyjny jest kątem atomów OX—CX—CX-1—CX-2, gdzie X jest numerem atomu węgla, którego grupa hydroksylowa jest glikozylowana.

3. Charakterystyka heliksu

Przy opisie heliksów lub segmentów helikalnych można używać następujących symboli:

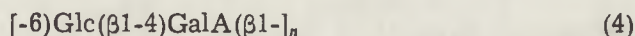
n = ilość powtarzających się jednostek przypadających na jeden zwój

h = jednostkowa wysokość (przesunięcie przypadające na jedną powtarzającą się jednostkę wzdłuż osi heliksu)

$t = 360^\circ/n$ = jednostkowy skręt (kąt obrotu wokół osi heliksu przypadający na jedną powtarzającą się jednostkę)

p = wysokość zwoju heliksu = $n \cdot h$

Uwaga: Powtarzającą się jednostką w homopolisacharydzie jest reszta cukrowa. Heteropolisacharydy mogą posiadać powtarzające się jednostki dwu lub więcej reszt, np.



Polisacharyd można dokładnie opisać za pomocą parametrów biegunów współrzędnych atomowych r_i , φ_i , z_i , gdzie i , r_i jest promieniem osi heliksu każdego atomu, a φ_i i z_i są odpowiednio różnicą kątową i różnicą wysokości względem punktu odniesienia. Punktem odniesienia powinien być element symetrii lub jeżeli nie ma takiego elementu, powinien nim być atom C1 monosacharydu.

PIŚMIENNICTWO

1. Tentative rules for carbohydrate nomenclature, part 1, IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1969, *Biochemistry*, **10**, 3985—4004 i 4995 — (1971) i inne czasopisma. Patrz także str. 174—195 w [2].
2. Biochemical Nomenclature and Related Documents, IUB, The Biochemical Society, London, 1978.
3. Conformational nomenclature for five and six-membered ring forms of monosaccharides and their derivatives. Recommendations 1980, IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Eur. J. Biochem.*, **111**, 295—298, (1980) i inne czasopisma. Nowe polskie słownictwo biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa, 1983.
4. Abbreviated terminology of oligosaccharide chains, Recommendations 1980, IUPAC-IUB Joint Commission of Biochemical Nomenclature (JCBN), *Eur. J.*

- Biochem.*, **126**, 433—437, (1982), i inne czasopisma. Nowe polskie słownictwo biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa, 1983.
- Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polynucleotide chains, Recommendations 1982, IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Eur. J. Biochem.*, **131**, 9—15, (1983).
 - Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains, Tentative rules 1969 (approved 1974), IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), *Pure Appl. Chem.*, **40**, 291—308, (1974) i inne czasopisma, patrz także str. 94—102 w [2].
 - Rules for the nomenclature of organic chemistry, section E, Stereochemistry (Recommendations 1974), IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC), *Pure Appl. Chem.*, **45**, 11—30, (1976), patrz też str. 1—18 w [2] i str. 473—490 w [8], Nomenklatura związków organicznych, część E, Stereochemia, PWN, Warszawa—Łódź, 1979.
 - Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC, Section A, B, C, D, E, F and H. (Rigaudy J., Klesney S. P. eds), Pergamon Press, Oxford 1979. Nomenklatura związków organicznych, część A, B, PWN, Warszawa—Łódź, 1978, część C, PWN, 1979, część E, PWN, 1978.

SŁOWNICTWO OKREŚLAJĄCE KONFORMACJE PIĘCIO- I SZEŚCIOCZŁONOWYCH FORM PIERŚCIENIOWYCH MONOSACHARYDÓW I ICH POCHODNYCH

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): „Conformational Nomenclature for Five and Six-Membered Ring Forms of Monosaccharides and Their Derivatives, Recommendations 1980”. opublikowanego w *Eur. J. Biochem.*, **111**, 295—298, (1980) i w innych czasopismach.

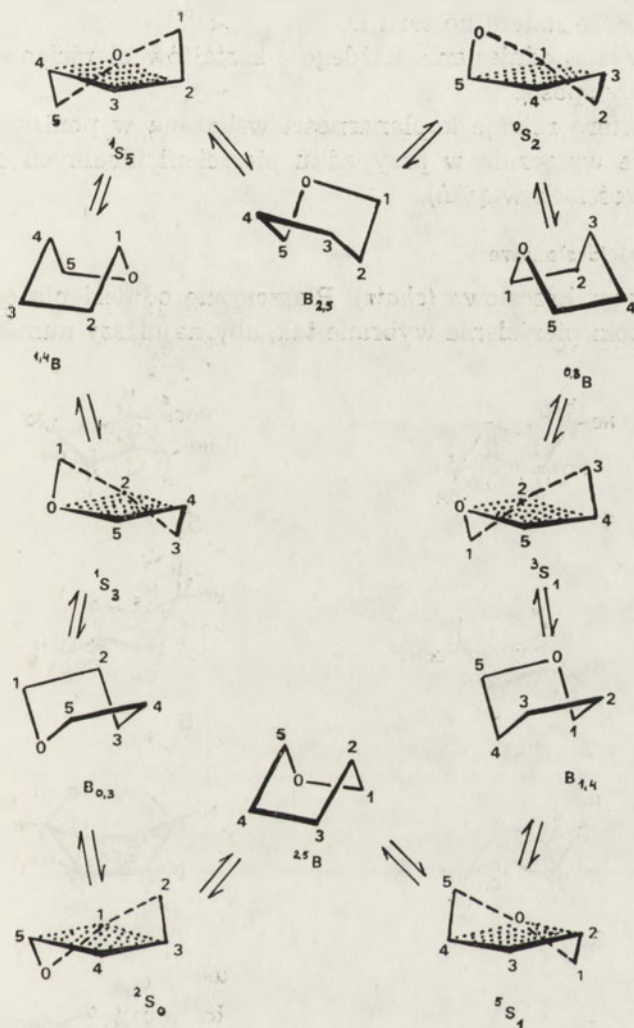
Tłumaczyli Ewa Katzenellenbogen i Andrzej Gamian

Ilość informacji o konformacji węglowodanów stale wzrasta, potrzebne jest przeto ujednoczenie zaleceń dotyczących słownictwa określającego konformacje najbardziej pospolitych form pierścieniowych. Niniejszy zbiór zaleceń oparty jest na raporcie podkomitetu JCBN.

1. Przybliżoną konformację pięcio- lub sześcioczłonowej formy pierścieniowej węglowodanu można wskazać za pomocą dużej litery pisanej kursywą określając w ten sposób kształt pierścienia, a liczbami odróżniać poszczególne warianty (np. 4C_1). Znak konformacyjny umieszcza się po nazwie monosacharydu, np. D-glukoza- 4C_1 .

2. Poszczególne konformacje określa się za pomocą odpowiednich liter: Pierścienie sześcioczłonowe: *C* (konformacja krzesłowa), *B* (konformacja łodziowa), *S* (konformacja skośna) (tzn. forma pośrednia między dwoma łodziowymi w cyklu form giętkich) i *H* (konformacja pół-krzesłowa). Pierścienie pięcioczłonowe: *E* (konformacja kopertowa) i *T* (konformacja skręcona).

Uwaga: Różne kształty pierścieni pokazano na Ryc. 1 i Ryc. 2, przykłady (1)—(16). Przedstawione formy są wyidealizowane i mniejsze odchylenia zostały pominięte. Niektóre z pokazanych form mogą występować tylko przejściowo raczej niż jako konformacje uprzywilejowane.



Ryc. 1. Cykl giętkich łódkowo-skośnych aldopiranoz.

3. Liczby są lokantami atomów pierścienia, które leżą na zewnątrz płaszczyzny odniesienia, zdefiniowanej w regule 4. Lokanty atomów pierścienia znajdujących się po tej stronie płaszczyzny odniesienia, z której numeracja przebiega zgodnie z ruchem wskazówek zegara (to jest „górną” stronę płaszczyzny furanoidowego lub piranoidowego wzoru Hawortha zapisanego w normalny sposób), zapisuje się jako indeksy górne przed literą. Natomiast te atomy pierścieniowe, które znajdują się po drugiej

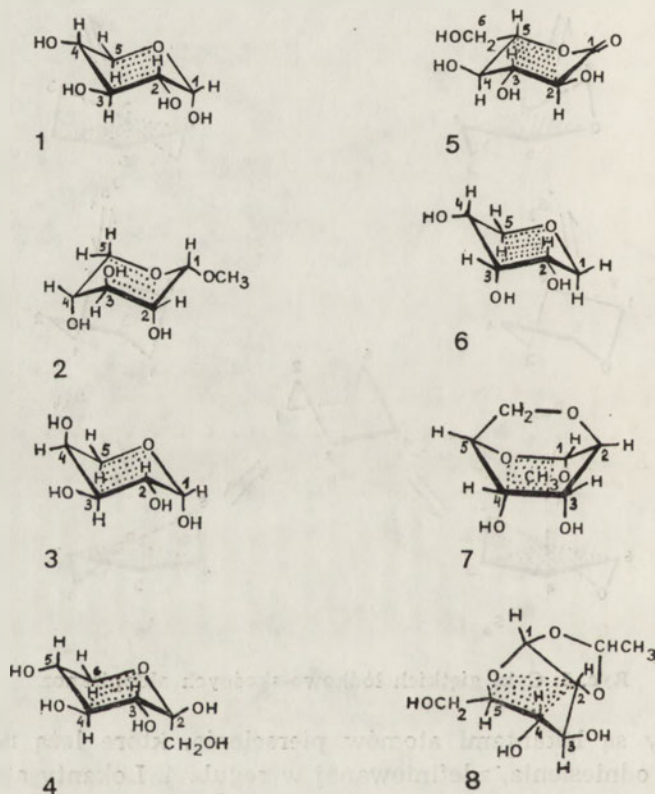
stronie płaszczyzny odniesienia, są zapisywane jako indeksy dolne po literze. W pierścieniach furanoidowym i piranoidowym tlen pierścieniowy lub inny heteroatom pierścieniowy, np. siarkę, zaznacza się jego symbolem pierwiastkowym (np. O, S). W celu zdefiniowania kierunku numeracji związków mezo, które mogą być numerowane jednym z dwu sposobów, przyjmuje się, że należą do serii D.

4. Płaszczyznę odniesienia każdego z kształtów pierścienia wybiera się w następujący sposób:

(Uwaga: niektóre relacje koplarności wskazane w poniższych regułach są prawdziwe wyłącznie w przypadku pierścieni idealnych o jednolitych kątach i długościach wiązań).

Pierścienie sześciocłonowe

Konformacja krzesłowa (*chair*). Płaszczyznę odniesienia określają dwa równoległe boki pierścienia wybrane tak, aby najniższy numerowany atom

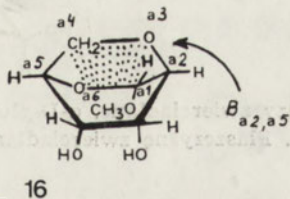
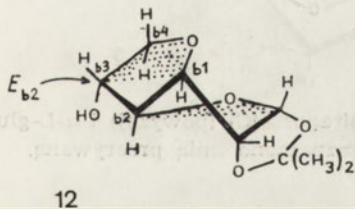
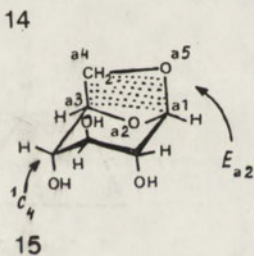
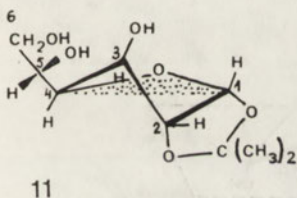
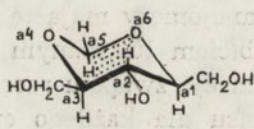
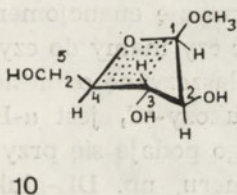
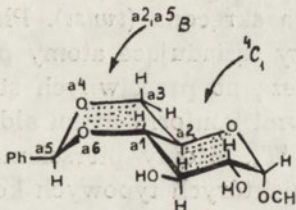
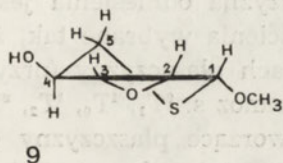


Ryc. 2. Konformacja pięcio- i sześciocłonowych form pierścieniowych monosacharydów. Przykłady: 1. α -D-ksylopiranoza- 4C_1 ; 2. Metylo- α -D-ksylopiranozyd- 1C_4 ; 3. β -L-arabinopiranoza- 4C_1 ; 4. β -D-ksylo-heksulopiranoza- 5C_2 ; 5. L-glukono-1,5-lakton- 1C_4 ; 6. 1,5-anhydrorybitol- 4C_1 ; 7. Metylo-2,6-anhydro- α -D-altropiranozyd- $^{2,5}B$; 8. 1,2-O-etylideno- α -D-glukopiranoza- 1S_3 ; 9. Metylo-2,3-anhydro-5-tio- β -L-likspiranozyd-

węgla w pierścieniu był egzoplanarny (przykłady (1)—(6) i (13)—(15)). Możliwymi konformacjami aldopiranoz są: 4C_1 i 1C_4 (odpowiadające kolejno konformacjom Reeves'a C1 i 1C).

Konformacja łodziowa (*boat*). Płaszczyznę odniesienia określają dwa „boki” łódki (przykłady (7), (13), (16)). Możliwymi konformacjami aldopiranoz są: 1,4B , $B_{1,4}$, 2,5B , $B_{2,5}$, 0,3B i $B_{0,3}$.

Konformacja skośna (*skew*). Każda forma skośna ma dwie potencjalne płaszczyzny odniesienia, zawierające trzy sąsiadujące atomy oraz pozostały nieprzylegający atom. Płaszczyzna odniesienia jest tak wybrana, aby egzoplanarnym był albo atom najniżej numerowany w pierścieniu, albo



5H_8 ; 10. Metylo- β -D-arabinofuranozyd- E_2 ; 11. 1,2-O-izopropylideno- β -L-idofuranaza- 3T_2 ; 12. 3,6-anhydro-1,2-O-izopropylideno- α -D-glukofuranaza- 3T_2 ; 13. Metylo-4,6-O-(S)-benzylideno- α -D-glukopiranozyd- 4C_1 (posiadający nietypową konfigurację przy benzylidenującym atomie węgla); 14. 2,4-O-metylenorybitol- ${}^4C_{a1}$; 15. 1,6-anhydro- β -D-glukopiranoza- 1C_4 ; 16. Metylo-2,6-anhydro- α -D-altropiranozyd- 2,5B .

w kolejności atom z numerem następnym (przykład (8) i Ryc. 1). Możliwe konformacje aldopiranoz to: 1S_3 , 3S_1 , 1S_5 , 5S_1 , 0S_2 , 2S_0 . (Symbole te są pokrewne symbolom oznaczającym konformacje łodziowe; np. 1S_5 , leży między 1A i $B_{2,5}$ w cyklu giętkich form pokazanych na Ryc. 1).

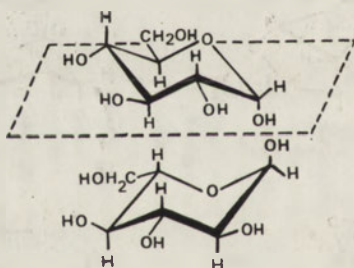
Konformacja pół-krzesłowa (*half-chair*). Płaszczyznę odniesienia definiują cztery sąsiadujące atomy koplarnarne (przykład 9). Możliwymi konformacjami aldopiranoz są: 0H_1 , 1H_0 , 1H_2 , 2H_1 , 2H_3 , 3H_2 , 3H_4 , 4H_3 , 4H_5 , 5H_4 , 5H_0 i 0H_5 .

Pierścienie pięcioczłonowe

Konformacja kopertowa (*envelope*). Płaszczyznę odniesienia określają cztery sąsiadujące koplarnarne atomy (przykład (10), (12) i (15)). Możliwe konformacje aldofuranoz to: 1E , E_1 , 2E , E_2 , 3E , E_3 , 4E , E_4 , 0E i E_0 .

Konformacja skręcona (*twist*). Płaszczyzna odniesienia jest zdefiniowana przez trzy sąsiadujące atomy pierścienia wybrane tak, że egzoplarnarne atomy leżą po przeciwnych stronach płaszczyzny (przykłady (11) i (12)). Możliwymi konformacjami aldofuranoz są: 0T_1 , 1T_0 , 1T_2 , 2T_1 , 2T_3 , 3T_2 , 3T_4 , 4T_3 , 4T_0 i 0T_4 . Atomy pierścienia tworzące płaszczyznę odniesienia w przypadku niektórych typowych konformacji podano w Tabeli 1.

5. Ponieważ symbole określające konformację enancjomerów są różne (np. Ryc. 2), jest rzeczą ważną, aby określić czy mamy do czynienia z formą D czy L. Enancjomery mają tę samą płaszczyznę odniesienia i należy pamiętać, że odbiciem lustrzanym α -D-glukozy- 4C_1 jest α -L-glukoza- 1C_4 (Ryc. 3). Konformację związku racemicznego podaje się przy pomocy odpowiedniego zapisu dla każdego enancjomeru, np. DL-glukoza- 4C_1 (D), 1C_4 (L).



Ryc. 3. Obrazy zwierciadlane. α -D-glukopiranoza- 4C_1 (powyżej) i α -L-glukopiranoza- 1C_4 (poniżej). Płaszczyznę zwierciadlaną zaznaczono linią przerywaną.

6. W pierścieniu innym niż pierścień piranoidowy lub furanoidowy rodzimego cukru, pierścieniowy atom węgla o najniższym numerze według konwencjonalnej nomenklatury węglowodanowej można oznaczyć jako a1. Pozostałe atomy pierścienia, łącznie z wszystkimi heteroatomami, oznaczają się konsekwentnie jako a2, a3 itd., zaczynając od odpowiedniej części ma-

Tabela 1

Atomy pierścienia tworzące płaszczyny odniesienia

Typ cukru	Konformacja	Atomy płaszczyny odniesienia	Powyżej płaszczyny	Poniżej płaszczyny	Oznaczenie	Przykład
Aldopiranoza	krzesłowa	C-2, C-3, C-5, O-5	C-4	C-1	⁴ C ₁	1)
Aldopiranoza	krzesłowa	C-2, C-3, C-5, O-5	C-1	C-4	¹ C ₄	2)
Aldopiranoza	łodziowa	O-5, C-1, C-3, C-4	C-2, C-5	—	^{2,3} B	7)
Aldopiranoza	łodziowa	C-2, C-3, C-5, O-5	—	C-1, C-4	<i>B</i> _{1,4}	nie pokazano
Aldopiranoza	skośna	C-2, C-4, C-5, O-5	C-1	C-3	¹ S ₃	8)
Aldopiranoza	skośna	C-1, C-3, C-4, C-5	C-2	O-5	² S ₀	nie pokazano
Aldopiranoza	półkrzesłowa	C-1, C-2, C-3, C-4	C-5	S-5	⁵ H ₅	9)
Aldopiranoza	półkrzesłowa	O-5, C-1, C-2, C-3	C-4	C-5	⁴ H ₅	nie pokazano
Aldofuranoza	kopertowa	O-4, C-1, C-3, C-4	—	C-2	<i>E</i> ₂	10)
Aldofuranoza	kopertowa	C-1, C-2, C-4, O-4	C-3	—	³ E	nie pokazano
Aldofuranoza	skrętowa	C-1, O-4, C-4	C-3	C-2	³ T ₂	11)
Aldofuranoza	skrętowa	C-3, C-4, O-4	C-2	C-1	² T ₁	nie pokazano

cierzystego łańcucha węglowodanowego lub pierścienia, który jest częścią pierścienia rozważanego (przykłady (12)—(16)). Jeżeli jest więcej takich pierścieni, to pierścień, który jest związany z najniższym lokantem w macierzystym łańcuchu, powinien otrzymać numerację -a, następny pierścień numerację -b, i tak dalej.

PIŚMIENNICTWO

1. Schwarz J. C. P., (1973), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 505—508.

SPRAWOZDANIE

XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

18—20 wrzesień 1984, Olsztyn

XX Zjazd P.T. Biochemicznego poświęcony był tematowi: „Biochemia w produkcji białek żywności”.

Znamiennym jest fakt, że tematyka biochemii żywności wystąpiła dopiero po raz drugi w 20-letniej historii zjazdów P.T. Biochemicznego. W Zjeździe uczestniczyło ok. 330 członków i sympatyków Towarzystwa. W imieniu przynajmniej części uczestników wyrażam opinię, że konfrontacja podstawowych problemów biochemii ogólnej z badaniami ukierunkowanymi praktycznie była bez wątpienia pożyteczna dla rozwoju biotechnologii żywności.

Obrady Zjazdu toczyły się w pięciu sekcjach tematycznych:

1. Białka pochodzenia roślinnego. Organizator: prof. Andrzej Rejowski.
2. Białka pochodzenia zwierzęcego. Organizatorzy: prof. Waław Minakowski i prof. Jerzy Strzeżek.
3. Biotechnologia białek. Organizatorzy: prof. Władysław Damicz i doc. Jerzy Dziuba.
4. Regulacja i zaburzenia metabolizmu białek i aminokwasów. Organizator: prof. Mariusz Żydowo.
5. Plakaty różne.

Wykład inauguracyjny pt. „Geny transferowych kwasów rybonukleinowych i ich transkrypcja u eukariotów” wygłosił prof. J. Pawełkiewicz.

Poza tym na Zjeździe przedstawiono 7 referatów, wygłoszono 79 komunikatów i zaprezentowano 173 doniesienia w formie plakatowej.

Sekcja poświęcona białkom pochodzenia roślinnego obejmowała takie problemy jak: wpływ regulatorów wzrostu, herbicydów, inhibitorów i nawożenia mineralnego na biosyntezę białek roślinnych oraz charakterystyka wartości żywieniowej ziaren zbóż w zależności od składu jakościowego i ilości obecnych w nich białek. W tej sekcji wygłoszono dwa referaty. Prof. J. Kączkowski omówił „Nowe aspekty i metody badania białek zapasowych ziarna zbóż”, a prof. A. Rejowski i prof. K. Kulka przedstawili zagadnienie „Syntezy białek w nasionach i jej regulacja”.

Tematyka sekcji białek pochodzenia zwierzęcego dotyczyła przede wszystkim charakterystyki różnych enzymów hydrolitycznych obecnych w plazmie nasienia buhaja i koguta, płynie nadjądrzy knura oraz w wątrobie szczura. Inne tematy dotyczyły m.in. wpływu kadmu na aktywność enzymów lizosomalnych wątroby szczurów, a także charakterystyki inhibitora trypsyny wyizolowanego z plazmy nasienia buhaja. Referat pt. „Akrosyna plemników i jej inhibitory — właściwości biochemiczne oraz funkcja w procesach rozrodu zwierząt”, którego współautorem była dr J. Torska wygłosił prof. J. Strzeżek.

W sekcji „Biotechnologia białek” mówiono na tematy: otrzymywanie i charakterystyka enzymów do celów przemysłowych (amylazy i proteazy), produkcja biomasy przy wykorzystaniu preparatów mikrobiologicznych, wpływ działania enzymów pro-

teolitycznych na wartość żywieniową białek produktów spożywczych. Dwudniowe obrady w tej sekcji poprzedziły referaty: doc. J. Dziuby „Molekularne i koloidalne aspekty micelarnej kazeiny” oraz doc. W. Bednarskiego i dr J. Kowalewskiej pt. „Otrzymywanie i zastosowanie immobilizowanych preparatów β -galaktozydazy”.

Sekcja czwarta „Regulacja i zaburzenia metabolizmu białek” tematycznie wiązała się tylko pośrednio z omówionymi sekcjami. Głównymi zagadnieniami tej sekcji były: różnice strukturalne pomiędzy kolagenem nabłonniaka i skóry, enzymatyczne modyfikacje rybosomów i białek rybosomowych przy użyciu kinaz białkowych izolowanych z nabłonniaka, występowanie rzadkich aminokwasów (tj. kwas cysteinowy i sulfonowe pochodne) w białku mięsaka oraz zaburzenia metabolizmu aminokwasów, w szczególności L-cysteiny, w różnych stanach chorobowych. Posiedzenie sekcji rozpoczęło od referatów prof. E. Gąsiora, pt. „Regulacja biosyntezy białka w organizmach eukariotycznych” doc. E. Wałajtys-Rode, pt. „Wrodzone wady metaboliczne aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym” oraz doc. W. Markiewicza i doc. J. Świerczyńskiego, pt. „Metabolizm glutaminy i jego regulacja w tkankach zwierząt”.

W sekcji plakatowej przedstawiono doniesienia odzwierciedlające różne kierunki badawcze uprawiane w kraju.

W podsumowaniu warto podkreślić, że ponieważ przyszłość produkcji żywności będzie się opierać na procesach biotechnologicznych, polska biotechnologia wymaga szczególnego zainteresowania. Przede wszystkim ze względu na jej małe wykorzystanie przez praktykę, a jednocześnie także ze względu na rosnący dystans wobec biotechnologii krajów o wysokiej kulturze wytwarzania i przerobu żywności. Sądzę, że Polskie Towarzystwo Biochemiczne będzie nadal otaczać metrytoryczną i organizacyjną opieką kierunek biochemii i biotechnologii żywności.

Henryk Kostyra

PRZEWODNIK PO BIBLIOTEKACH

W niniejszym numerze podajemy Szanownym Czytelnikom kolejną informację o lokalizacji podstawowych międzynarodowych czasopism biochemicznych w poszczególnych ośrodkach akademickich (kompletne roczniki z lat 1981—83). Potrzebę takiej informacji oraz wybór podanych w Tabeli czasopism uzasadniliśmy poprzednio (*Postępy Biochemii*, 1982, 28, 163—164). Tabela nie obejmuje lat 1984—85, bowiem szereg bibliotek dopiero teraz otrzymuje zaległe numery czasopism.

T.W.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z przyjemnością zawiadamia, że w roku 1985 przyznano nagrody za wyróżniające się osiągnięcia w dziedzinie Biochemii.

Nagroda im. Włodzimierza Mozolowskiego — dla młodych biochemików, za prezentacje prac na XXI Zjeździe PTBioch. w Krakowie — wrzesień 1985 r.

- Józef Czyrski, praca pt. „Płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) z krwi ludzkiej, bydłowej i świńskiej” — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.
- Hanna Jańska, praca pt. „Izolacja i charakterystyka dwóch form molekularnych kwasnej fosfatazy wątroby sumy” — Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego.
- Jan Potempa, praca pt. „Comparison of immunological and elastolytic properties of horse leucocyte proteinases” — Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.
- Jacek Leluk, prace pt.: „Nowa rodzina inhibitorów proteinaz serynowych z nasion Cucurbitaceae. Badania porównawcze”, „Zastosowanie immobilizowanego inhibitora trypsyny z nasion cukinii do oczyszczania trypsynopodobnych proteinaz z preparatu Pronase” i „Zastosowanie edestyny do badania aktywności proteinaz i ich inhibitorów” — Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego.
- Przemysław Wojtaszek, prace pt. „Przeciwciiała skierowane na czynnik elongacyjny EF-1 z łubinu żółtego, *Lupinus luteus* L” i „Interakcje tRNA i EF-1 z rybosomem eukariotycznym” — Zakład Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Nagroda im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł ogłoszony w 30-tym roczniku *Postępów Biochemii*:

- Andrzej Chimiak, praca pt. „Siderofory — nośniki jonu żelazowego” — Zakład Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej.

Nagroda im. Jakuba Karola Parnasa — za najlepszą pracę doświadczalną w dziedzinie biochemii wykonaną w Polsce w 1984 roku.

- Witold Filipowicz, Magdalena Konarska, Kazimierz Tyc i Hans J. Gross, praca pt. „Multiple ribosome binding to the 5'-terminal sequence of Tobacco mosaic virus RNA. Assembly of an SOS ribosome — in RNA complex at the AUU codon”, ogłoszenia w *Eur. J. Bioch.*, vol. **140**, 503—511, 1984 — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Prezes
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
prof. dr hab. Kazimierz Zakrzewski

RECENZJE

Multiple Forms of Enzymes. 1. Leonor-Michaelis-Symposium Weimar, GDR 13—15. November 1980.

red. **D. W. Scheuch, R. J. Haschen, E. Hofmann**

VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin
Berlin, 1982, 250 str., 112 ilustr., 46 tab.

Książka zawiera prace prezentowane na międzynarodowym sympozjum poświęconym pamięci Leonora Michaelisa, które odbyło się w Weimarze w listopadzie 1980 roku. Sympozjum to zgromadziło badaczy reprezentujących badania zarówno podstawowe jak i stosowane (diagnostyka kliniczna), zajmujących się zjawiskiem występowania form izoenzymatycznych w warunkach fizjologicznych i w patologii.

Książkę otwiera praca poświęcona historii życia i badań Leonora Michaelisa. Następnie prezentowane są trzy prace przeglądowe, poświęcone kolejno: wysokiej swoistości diagnostycznej wynikającej z zastosowania analizy izoenzymatycznej, podstawom naukowym analizy izoenzymatycznej stosowanej w celach diagnostycznych i metodom kinetycznym umożliwiającym oznaczanie aktywności izoenzymatycznych. Pozostałe 22 prace mają charakter oryginalnych prac doświadczalnych, poświęconym różnym aspektom zjawiska występowania form izoenzymatycznych.

Książka jest bardzo starannie wydana. Polecić ją można wszystkim enzymologom, a zwłaszcza tym, którzy zajmują się diagnostyką kliniczną.

Wojciech Rode

Martin Luckner

Secondary Metabolism in Microorganism, Plants and Animals

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1984, str. 576, 338 ilustr., 80 tab.

Biochemicznym wyrazem specjalizacji komórek organizmów żywych jest metabolizm pośredni (ang. secondary metabolism), jego substraty i produkty oraz ich heterogenność u mikroorganizmów, roślin i zwierząt.

Zagadnienia te są treścią recenzowanej książki, jej drugiego wydania, uzupełnionego i powiększonego w porównaniu z wydaniem pierwszym z 1969 roku. Książka Martina Lucknera, profesora farmacji na Uniwersytecie Marcina Lutra w Halle jest interesującym studium biochemii porównawczej ograniczonym do przemian pośrednich. Metabolizm ogólny (cykl Krebsa, glikoliza itp.) zalicza bowiem Luckner do przemian, które są wspólne dla organizmów żywych. W sześciu rozdziałach Autor omawia kolejno: metabolizm pośredni w aspekcie ogólnym, metodykę badań, najważniejsze grupy metabolitów pośrednich, następnie ich strukturę, biosyntezę i degradację u mikroorganizmów, roślin i zwierząt. Specjalny rozdział poświęcony jest

znaczeniu metabolizmu pośredniego i jego produktów dla organizmów żywych w aspekcie detoksykacji, przekazywania sygnałów oraz w relacjach ekologicznych. Rozdział ostatni zajmuje się znaczeniem metabolizmu pośredniego dla człowieka i omawia substancje stosowane celem uatrakcyjnienia pożywienia, jako leki, narkotyki oraz te, które znalazły zastosowanie w przemyśle.

Poszczególne rozdziały kończą noty bibliograficzne ułatwiające zainteresowanemu czytelnikowi uzyskanie dodatkowych informacji. Omawiana książka stanowi zwięzły lecz wyczerpujący i uwzględniający najnowsze osiągnięcia podręcznik biochemii porównawczej.

Secondary metabolism in mikroorganism, plants and animals dedykował Autor specjalizującym się w biologii, biochemii, medycynie, chemii organicznej, farmacji i rolnictwie studentom i naukowcom zarówno w ośrodkach akademickich jak i w przemyśle, przy założeniu, iż posiadają oni podstawowy zasób wiedzy biologicznej i chemicznej.

Alicja Laskowska

Grundlagen der Biopharmazie

Siegfried Pfeifer, Peter Pfliegel, Hans-Huber Borchert

VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin
Berlin, 1984, str. 352

Przedstawiona do recenzji książka jest wspólnym dziełem trzech pracowników naukowych, których nazwiska zaliczane są do światowej czołówki w dziedzinie biofarmacji.

We wstępie Autorzy podkreślają, że książka ta może być szczególnie przydatna farmaceutom, lekarzom, farmakologom i biologom w interesujących ich bowiem dyscyplinach naukowych aspekty biofarmaceutyczne odgrywają coraz większą rolę i są włączane do programów europejskich studiów uniwersyteckich.

Książka zawiera 352 strony, 138 pozycji obejmujących fotografie, rysunki, tabele i wykresy. Ponadto w każdym rozdziale podane są liczne wyliczenia matematyczne preparatów farmakokinetycznych oraz wzory. Bibliografia obejmuje 262 pozycje piśmiennictwa światowego z uwzględnieniem pozycji najnowszych (1983 i 1984 r.).

Treść książki obejmuje trzy podstawowe zagadnienia, tj. farmakokinetykę, biodostępność i biotransformację ujmując całościowo i nowocześnie wszystkie zagadnienia związane z biofarmacją. Omawia więc związki między fizycznymi a fizykochemicznymi właściwościami substancji leczniczych i form leku a morfologiczno-fizjologicznymi właściwościami organizmu i wpływem tych czynników na losy leków w ustroju tj. wchłanianie, dystrybucję, biotransformację i wydalanie. Z tego względu jest to pozycja bardzo wartościowa, szczególnie przydatna dla farmaceutów i lekarzy uzyskujących stopnie specjalizacji zawodowej z farmakologii i farmacji klinicznej, ale może być użyteczna także dla osób z innych grup zawodowych i dziedziny nauk przyrodniczych.

Aleksander Czestawski i Anna Pitura

**H. Zühlke, H. Bibegel, H. Seipelt,
Pathobiochemie in Pathophysiologie des Kohlenhydratstoffwechsels unter besonderer
Berücksichtigung des Diabetes mellitus**

**VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin
Berlin, 1984, wyd. I, 139 str., 50 ilustr., 23 tab.**

W części wstępnej książka zawiera omówienie podstawowych przemian węglowodanów, ich roli w organizmie jako źródła energii, substancji zapasowych, składników budulcowych różnych tkanek (polisacharydy) i związków pełniących specyficzne funkcje (mukopolisacharydy, heparyna), a także mechanizmy regulacji tych procesów. Wyczerpująco przedstawiono regulację rozpadu i syntezy glikogenu poprzez system kaskadowej fosforylacji białek enzymatycznych, stymulowanej przez cykliczne AMP pod wpływem adrenaliny i glukagonu. W opisie mechanizmów regulacji glikolizy i glukoneogenezy nie zostały uwzględnione najnowsze dane dotyczące roli 2,6-bisfosfofruktozy i jej wpływu na aktywność fosfofruktokinazy, a także regulacji aktywności enzymów produkujących i rozkładających ten związek. Nie podano również nawet wstępnej informacji o roli fosforylacji kinazy pirogronjanej w regulacji syntezy i rozpadu glukozy. Wskazane byłoby, aby przy ewentualnym tłumaczeniu książki uzupełniono tę lukę.

Wiele wiadomości zawiera recenzowana pozycja na temat efektu działania hormonów na homeostazę węglowodanów w ustroju ze szczególnym uwzględnieniem biosyntezy, wydzielania i mechanizmu działania insuliny.

Druga, obszerniejsza część książki jest poświęcona patobiochemii i patofizjologii metabolizmu węglowodanów. Przedstawiono klasyfikację rodzajów cukrzycy oraz komplikacje metaboliczne towarzyszące tej chorobie. W tej części książki szczególnie starannie są opracowane schematy obrazujące złożone zależności metaboliczne w tkankach w przebiegu różnych postaci cukrzycy. Podano również podstawowe testy laboratoryjne pomagające w diagnostyce cukrzycy. Szereg informacji dotyczy zaburzeń przemian galaktozy, fruktozy, mannozy, glikogenu, mukopolisacharydów, a także glikoprotein i glikolipidów.

Omawiana książka jest dobrym źródłem informacji dla osób zajmujących się regulacją procesów metabolicznych oraz patobiochemią i patofizjologią przemian węglowodanów, zwłaszcza dla lekarzy i studentów medycyny, przeto warto wydać jej polski przekład. Bibliografia książki zawiera 43 pozycje monograficzne i 85 prac doświadczalnych opublikowanych do roku 1982.

Elżbieta Wałajtys-Rode

KOMUNIKAT

Komisji Słownictwa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

W zamieszczonej poniżej tabeli podano zmiany i uzupełnienia, a także korektę ostatnio dostrzeżonych błędów w „Słowniku zalecanych i zwyczajowych nazw enzymów”, który ukazał się w numerze 1 tomu 31 kwartalnika Postępy Biochemii (rocznik 1985) oraz jako odrębne wydawnictwo. Komisja uprzejmie prosi o naniesienie poprawek w posiadanym egzemplarzu Słownika.

Nazwy zamieszczone w Słowniku wraz z poprawkami wg niniejszego komunikatu będą traktowane jako obowiązujące aż do czasu ukazania się zrewidowanego następnego wydania Słownika, co nie nastąpi wcześniej niż za dwa lata. Propozycje nowych czy zmienionych nazw enzymów (i reguł rządzących ich nazewnictwem) będą okresowo publikowane na łamach Postępów Biochemii, ale nie staną się obowiązujące przed ukazaniem się nowego wydania Słownika.

poz. powinno być

-
- | | | |
|------|---|--------------------------|
| 115. | 5'-Acylphosphoadenosine | 5'-acylofosfoadenozynowa |
| 179. | membrane-acceptor | |
| 184. | racemase | |
| 189. | ammonia-lyase | |
| 307. | Amylopectin-1,6-glucosidase | |
| 315. | 4-androsten-3,17-dionowa | |
| 338. | enzym skreślony z rejestru (α -L-arabinofuranoside hydrolase) | |
| 459. | F(BamFI), (BamKI) z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ¹⁰³⁵ | |
| 460. | N(BamNI) z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ¹⁰³⁶ | |
| 465. | X5(BsuI) z <i>Bacillus subtilis</i> ¹⁰⁴⁸ | |
| 531. | 3,4-dioksygenaza | |
| 634. | Cholestanetriol-26-al 26-dehydrogenase | |
| 642. | enzym skreślony z rejestru | |
| 668. | chondroitinsulphatase | |
| 669. | enzym skreślony z rejestru | |
| 703. | Citrulline | |
| 705. | Clostridiopeptidase | |

716. sialyltransferase
717. CMP-*N*-acylneuraminate
736. Condensing enzyme
747. (ChuI) z *Corynebacterium...*
749. *p*-Coumarate
781. glucanotransferase
788. glucanotransferase
848. Deoxycytidylate
849. Deoxycytidylate
850. Deoxycytidylate
855. cytidyltransferase cytydylilotransferaza
887. diaminokwasów
914. Dihydrolipoamide succinyltransferase
932. 2,3-dihydroksybenzoesanowa
933. 2,3-dihydroksybenzoesanowa
987. DNA (cytozyno-5-)-metylotransferaza
1023. RNaza I z *E.coli*²⁷⁶²
1026. apyrimidinic
1075. *HpaI*
1076. *HpaII*
1077. *HphI*
1160. amonnia-lyase
1164. phospho-lyase
1188. Exopolygalacturonate
1258. fosfotrioza-liaza 1,6-bisfosforanowa
1341. enzym skreślony z rejestru
1352. glukomannanowa
1392. β -glucoside kinase
1426. glutaminiano-szczawiooctanowa
1446. enzym skreślony z rejestru
1495. Glycerophosphate
1568. serotype
1576. 3.2.1.19
1625. 2.3.1.31
1657. β -Hydroxyacyl
1658. Hydroxyacylglutathione
1661. glutathione
1681. dehydrogenaza 3- α -hydroksychoLANowa
1774. Indoleacetaldoxime
2022. 1.1.2.2.
2079. 5,10-metylenotetrahydrofolianowa
2163. NAD(P)⁺
2244. glukozylotransferaza II 1,3-oligoglukan
2289. 3-Oxoacyl-(acyl-carrier protein)
2298. 2-Oxoisovalerate
2307. enzym skreślony z rejestru
2365. 1.1.1.144
2411. carboxykinase

2414. Phosphoenolpyruvate
 2504. 2.7.1.37
 2558. dehydrogenaza polioliowa(NADP+)
 2639. (PalI) z *Providentia alcalifaciens*
 2715. pirogrono-jablczanowa
 2716. pirogrono-jablczanowa
 2717. pirogrono-jablczanowa
 2750. cytidylyltransferase
 2801. guanine-2-
 2942. 6.2.1.4
 2943. 6.2.1.5
 2959. glucosyltransferase
 2972. adenylyltransferase
 3036. pirofosfokinaza
 3039. izomeraza
 3096. Trehalosephosphate
 3152. tyrozynowa
 3169. enzym skreślony z rejestru
 3171. β -N-acetylo-D-galaktozaminylotransferaza
 3197. UDPgalacturonosyltransferase
 3198. apigenina³²¹⁸
 3208. fruktozofosforan²⁹⁵⁸
 3247. UDP-4-amino-2-acetamido-2,4,6-trideoxyglucose

Podczas druku na stronach 144 (48) i 165 (69) nastąpiły przesunięcia tekstu, które znacznie utrudniają korzystanie z tych haseł. Poniżej drukujemy prawidłowy układ słownika.

1469.	Glutathione <i>S</i> -aralkyl-transferase	2.5.1.18	<i>S</i> -aralkilotransferaza
1470.	Glutathione <i>S</i> -aryltransferase	2.5.1.13	<i>S</i> -arylotransferaza glutationowa
1471.	Glutathione <i>S</i> -aryltransferase	2.5.1.18	<i>S</i> -arylotransferaza glutationowa ¹⁴⁷⁴
1472.	Glutathione synthetase	6.3.2.3	syntetaza glutationowa
1473.	Glutathione thiolesterase	3.1.2.7	tiolesteraza glutationowa
1474.	Glutathione transferase	2.5.1.18	transferaza glutationowa
1475.	Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase	1.2.1.12	dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa
1476.	Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (NADP ⁺)	1.2.1.9	dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa (NADP ⁺)
1477.	Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (NADP ⁺) (phosphorylating)	1.2.1.13	dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa (NADP ⁺) (fosforylująca)
1478.	Glycerate dehydrogenase	1.1.1.29	dehydrogenaza glicerynianowa
1479.	Glycerate kinase	2.7.1.31	kinaza glicerynianowa
1480.	Glycerate phosphomutase	2.7.5.4	fosfomutaza glicerynianowa ⁵⁰³
1481.	Glycerate phosphomutase	2.7.5.3	fosfomutaza glicerynianowa ²⁴⁴⁸
1482.	Glycerol dehydratase	4.2.1.30	dehydrataza glicerolowa
1483.	Glycerol dehydrogenase	1.1.1.6	dehydrogenaza glicerolowa
1484.	Glycerol dehydrogenase (NADP ⁺)	1.1.1.72	dehydrogenaza glicerolowa (NADP ⁺)
1485.	Glycerol kinase	2.7.1.30	kinaza glicerolowa
1486.	Glycerol-1-phosphatase	3.1.3.21	glicerolo-1-fosfataza

2100.	Methylthiophosphoglycerate phosphatase	3.1.3.14	fosfataza metylotiofosfoglicerynianowa
2101.	<i>N</i> -Methyl-2-oxoglutaramate hydrolase	3.5.1.36	hydrolaza <i>N</i> -metylo-2-okso-glutaramanowa
2102.	<i>Metridium</i> proteinase A	3.4.21.3	proteinaza A z <i>Metridium</i>
2103.	Mevaldate reductase	1.1.1.32	reduktaza mewaldanowa
2104.	Mevaldate reductase (NADPH)	1.1.1.33	reduktaza mewaldanowa (NADPH)
2105.	Mevalonate kinase	2.7.1.36	kinaza mewalonianowa
2106.	Mexicanain	3.4.99.14	meksykańaina
2107.	Microbial carboxyl proteinases	3.4.23.6	bakteryjne proteiny karboksylowe
2108.	Microbial metalloproteinases	3.4.24.4	bakteryjne metaloproteiny
2109.	Microbial RNase I	3.1.27.3	bakteryjna RNaza ²⁷⁶⁸
2110.	Microbial RNase II	3.1.27.1	bakteryjna RNaza II ²⁷⁶⁷
2111.	Microbial serine proteinases	3.4.21.14	bakteryjne proteiny serynowe
2112.	<i>Micrococcal</i> endonuclease	3.1.31.1	endonukleaza z <i>Micrococcus</i>
2113.	<i>Micrococcus caseolyticus</i> neutral proteinase	3.4.24.4	proteinaza obojętna z <i>Micrococcus caseolyticus</i>
2114.	Mixed-function oxidase	1.14.14.1	oksydaza o mieszanej funkcji ¹²⁹⁵
2115.	Monoacylglycerol kinase	2.7.1.94	kinaza monoacyloglicerolowa
2116.	Monoacylglycerol lipase	3.1.1.23	lipaza monoacyloglicerolowa
2117.	Monoamine oxidase	1.4.3.4	oksydaza monoaminowa ²⁵¹
2118.	Monobutyrase	3.1.1.1	monobutyraza ⁵⁶⁰
2119.	Monodehydroascorbate reductase (NADH)	1.6.5.4	reduktaza monodehydroaskorbinianowa (NADH)
2120.	Monoglyceride acyltransferase	2.3.1.22	acylotransferaza monoglicerydowa ¹⁰²
2121.	Monophenol monooxygenase	1.14.18.1	monooksygenaza monofenolowa
2122.	Monophosphatidylinositol phosphodiesterase	3.1.4.10	fosfodiesteraza monofosfatydylinozytolowa
2123.	<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (<i>MnnI</i>)	3.1.23.20	(<i>MnnI</i>) z <i>Moraxella nonliquefaciens</i> ¹⁰⁸³
2124.	<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (<i>MnoI</i>)	3.1.23.84	(<i>MnoI</i>) z <i>Moraxella nonliquefaciens</i> ¹⁰⁸⁴

SPIS TREŚCI

Profesor Włodzimierz Niemierko — wspomnienie	395
Artykuły:	
J. Vetulani — Neuropeptydy a neurotransmisja	401
G. Kupryszewski — Chemiczna struktura neuropeptydów	421
O. Narkiewicz, L. Nitecka — Rozmieszczenie neuropeptydów w mózgowiu i rdzeniu kręgowym	443
R. Przewłocki — Endogenne systemy opioidowe	463
Z. Herman — Działanie farmakologiczne neurotensyny, substancji P i tuft-syny	487
St. Pużyński — Neuropeptydy a patogeneza i leczenie zaburzeń psychicznych typu endogennego	509
J. Potempa, A. Dubin — Ewolucja struktury i funkcji serynowych enzymów proteolitycznych	531
B. Turyna, A. Guzdek — Nieenzymatyczna glikozylacja białek	555
J. Steczko — Zastosowanie żelazianu potasu jako analogu ortofosforanu w modyfikacji centrów aktywnych białek	569
Nowe w biochemii:	
D. Hulanicka — <i>Anty-sense RNA</i> , nowy mechanizm regulujący ekspresję genów	585
D. Hulanicka — Rekombinat RNA i jego replikacja	589
Minireviews:	
W. Sokół-Misiak — Sekwencje DNA niezbędne dla regulacji transkrypcji przez hormony glukokortykoidowe w komórkach eukariotycznych	593
Artykuły:	
B. Gołos — Translokacje chromosomalne a transformacja nowotworowa	601
E. Kalinowska — Ekspresja genów wprowadzonych do komórek ssaków metodą transfekcji	617
J. Greger — Enzymy uczestniczące w metabolizmie 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach	631
Słownictwo:	
Słownictwo monosacharydów rozgałęzionych (tłum. A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	649
Słownictwo monosacharydów nienasyconych (tłum. A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	656
Skrócenie nazwy łańcuchów oligosacharydowych (tłum. A. Gamian i E. Katzenellenbogen)	662
Słownictwo polisacharydów (tłum. A. Gamian i E. Katzenellenbogen)	672
Symbole opisujące konformację łańcuchów polisacharydowych (A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	677
Słownictwo określające konformację pięcio- i sześcioczłonowych form pierścieniowych monosacharydów i ich pochodnych (tłum. A. Gamian i E. Katzenellenbogen)	684
Sprawozdania:	
XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 18—20 wrzesień 1984, Olsztyn (H. Kostyra)	691
Przewodnik po bibliotekach (T. W.)	692
Recenzje:	
Multiple forms of Enzymes (W. Rode)	695
M. Lucker — Secondary Metabolism in Microorganism, Plants and Animals (A. Laskowska)	695
Grundlagen der Biopharmazie (A. Czesławski, A. Pitura)	696
Pathobiochemie in Pathophysiologie es Kohlenhydratstoffwechsels unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus (E. Wałajtyś-Rode)	697

POSTĘPY BIOCHEMII

September 1985

ARTICLES IN POLISH

Volume 31

Number 3—4

Professor Włodzimierz Niemierko — Obituary 395

Articles:

- J. Vetulani — Neuropeptides and neurotransmission (Dept of Biochemistry, Institute of Pharmacology, Pol. Acad. Sci, Kraków) 401
- G. Kupryszewski — Chemical structure of neuropeptides (Institute of Chemistry, University of Gdańsk) 421
- O. Narkiewicz, L. Nitecka — The distribution of neuropeptides in the brain and spinal cord (Dept of Anatomy, Medical Academy in Gdańsk) 443
- R. Przewlocki — Endogenous opioid system (Institute of Pharmacology Pol. Acad. Sci., Kraków) 463
- Z. Herman — Pharmacological action of neurotensin substance P and tuftsin (Dept Pharmacology, Silesian Schol of Medicine, Zabrze) 487
- St. Pużyński — Neuropeptides in pathogenesis and treatment of endogenous psychiatric disorders (2nd Psychiatric Clinic, Psychoneurological Institute, Warszawa) 509
- J. Potempa, A. Dubin — Structure and function of serine proteolytic enzymes (Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) 531
- B. Turyna, A. Guzdek — Nonenzymatic glycosylation of proteins (Dept of Animal Biochemistry, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) 551
- J. Steczko — Modyfication of active centres of proteins by potassium fertrate, an analogue of orthophosphate (Institute of Catalysis and Surface Chemistry Pol. Acad. Sci, Kraków) 569

News in biochemistry:

- D. Hulanicka — *Anty-sense* RNA, new regulatory mechanism of gene expression (Institute of Biochemistry and Biophysic, Pol. Acad. Sci., Warszawa) 585
- D. Hulanicka — RNA-recombinant and its replication 589

Minireviews:

- W. Sokół-Misiak — DNA sequences involved in the regulation of transcription by glukocorticoid hormones in eukaryotic cells (Institute of Genetics and Animals Breeding, Pol. Acad. Sci., Jastrzębiec) 593

Articles:

- B. Gołos — Chromosomal translocations and neoplastic transformation (Dept of Biochemistry, Institute of Hematology, Warszawa) 601
- E. Kalinowska — Expression of genes introduced into mamalian cells by transfection (Dept of Tumor Biology, Institute of Oncology, Gliwice) 617
- J. Greger — Mitochondrial enzymes participating in 2'-deoxynucleotide metabolism (Dept of General Chemistry, Institute of Physiology and Biochemistry, School of Medicine, Łódź) 631
- Nomenclature 649
- Meeting Reports 691
- Book Reviews 695

Piśmiennictwo: w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiając przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 271, 1 np.

Pispa J. P. Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181–184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

Dixon M., Weeb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 585, Langmans Green and Co., London;
Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1–58; Academic Press, London.

Załączniki: każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuły tabel i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść zaznaczając, z jakich (jakiej) pracy(ych) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rusunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzorów cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów, aby zabezpieczyć maszynopis i ilustracje przed pogięciem.

SPIS TREŚCI

Profesor Włodzimierz Niemierko — wspomnienie	395
Artykuły:	
J. Vetulani — Neuropeptydy a neurotransmisja	401
G. Kupryszewski — Chemiczna struktura neuropeptydów	421
O. Narkiewicz, L. Nitecka — Rozmieszczenie neuropeptydów w mózgowiu i rdzeniu kręgowym	443
R. Przewłocki — Endogenne systemy opioidowe	463
Z. Herman — Działanie farmakologiczne neurotensyny, substancji P i tuft-syny	487
St. Pużyński — Neuropeptydy a patogeneza i leczenie zaburzeń psychicznych typu endogennego	509
J. Potempa, A. Dubin — Ewolucja struktury i funkcji serynowych enzymów proteolitycznych	531
B. Turyna, A. Guzdek — Nieenzymatyczna glikozylacja białek	555
J. Steczko — Zastosowanie żelazianu potasu jako analogu ortofosforanu w modyfikacji centrów aktywnych białek	569
Nowe w biochemii:	
D. Hulanicka — <i>Anty-sense RNA</i> , nowy mechanizm regulujący ekspresję genów	585
D. Hulanicka — Rekombinant RNA i jego replikacja	589
Minireviews:	
W. Sokół-Misiak — Sekwencje DNA niezbędne dla regulacji transkrypcji przez hormony glukokortykoidowe w komórkach eukariotycznych	593
Artykuły:	
B. Gołoś — Translokacje chromosomalne a transformacja nowotworowa	601
E. Kalinowska — Ekspresja genów wprowadzonych do komórek ssaków metodą transfekcji	617
J. Greger — Enzymy uczestniczące w metabolizmie 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach	631
Słownictwo:	
Słownictwo monosacharydów rozgałęzionych (tłum. A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	649
Słownictwo monosacharydów nienasyconych (tłum. A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	656
Skrócenie nazwy łańcuchów oligosacharydowych (tłum. A. Gamian i E. Katzenellenbogen)	662
Słownictwo polisacharydów (tłum. A. Gamian i E. Katzenellenbogen)	672
Symbole opisujące konformację łańcuchów polisacharydowych (A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	677
Słownictwo określające konformację pięcio- i sześciocłonowych form pierścieniowych monosacharydów i ich pochodnych (tłum. A. Gamian i E. Katzenellenbogen)	684
Sprawozdania:	
XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 18—20 wrzesień 1984, Olsztyn (H. Kostyra)	691
Przewodnik po bibliotekach (T. W.)	692
Recenzje:	
Multiple forms of Enzymes (W. Rode)	695
M. Lucker — Secondary Metabolism in Microorganism, Plants and Animals (A. Laskowska)	695
Grundlagen der Biopharmazie (A. Czesławski, A. Pitura)	696
Pathobiochemie in Pathophysiologie es Kohlenhydratstoffwechsels unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus (E. Wałajts-Rode)	697