

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

POSTBAH 35(1-2)  
(1-200) (1989)

1989

tom 35 nr 1-2

PL ISSN 0032-5422



PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy biochemii” publikuje artykuły z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Objętość 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, jeśli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawianiem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 25 odbitek swego artykułu.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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

**Strona 1, tytułowa,** obejmuje imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuły pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i 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 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 (I).

Redakcja prosi autorów o zwracanie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu, a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz 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

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 35 ZESZYT 1-2  
1989

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 35 (1-2)  
(1-200) (1989)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>



## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: M. Gumińska (*Kraków*)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumieli (*Warszawa*)

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

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

## REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

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

## ZASTĘPCY REDAKTORA NACZELNEGO

G. Palamarczyk

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

B. Czartoryska

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

## SEKRETARZ REDAKCJI

M. Szyszko

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

## CZŁONKOWIE REDAKCJI

E. Czuryło (*Warszawa*), M. Garstka (*Warszawa*)

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1989

Nakład 1690 (1600 + 90)	Oddano do składania 28.II.1989 r.
Ark. wyd. 16,0, ark. druk. 12,5	Podpisano do druku w grudniu 1989 r.
Papier offset. kl. III, 70 g 70 × 100	Druk ukończono w styczniu 1990 r.
Zam. nr 283/12/89	Cena zł 480,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej w Warszawie

## Z HISTORII BIOCHEMII

STELLA NIEMIERKO<sup>\*)</sup>

### Z historii siedemdziesięcioletniej działalności<sup>\*\*)</sup>

#### Instytutu Biologii Doświadczalnej imienia Marcelego Nenckiego

#### The Nencki Institute of Experimental Biology: seventy years of activity

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, mieszczący się w dużym gmachu przy ul. Pasteura 3 w Warszawie, liczy obecnie ponad 340 pracowników, w tym około 130 pracowników naukowych. Wiele jednak czasu upłynęło, i wymagało pracy kilku pokoleń naukowych, nim Instytut stał się tak dużą i znaną placówką badawczą.

Trudno jest dokładnie podać datę powstania Instytutu. Myśl o utworzeniu placówki poświęconej badaniom doświadczalnym w zakresie biologii powstała wkrótce po śmierci Marcelego Nenckiego (1847—1901). Pragnieniem Jego licznych uczniów i współpracowników było uczczenie pamięci ich Nauczyciela przez nadanie Jego imienia polskiej placówce, w której rozwijano by choćby niektóre kierunki badawcze Jego ogromnej spuścizny naukowej.

Marceli Nencki<sup>\*\*\*)</sup> urodził się w Boczkach koło Sieradza. Gimnazjum ukończył w Piotrkowie Trybunalskim. Udział w Powstaniu Styczniowym uniemożliwił Mu wstęp na Uniwersytet Warszawski, przeniósł się więc do Krakowa, gdzie rozpoczął studia w zakresie filozofii i filologii klasycznej. Wkrótce jednak okazało się, że i w Galicji, będącej wówczas pod zaborem austriackim, nie czuł się bezpieczny.

Zmuszony do opuszczenia Polski kontynuował studia w Berlinie. Jednak przerwał wybrany kierunek studiów i zafascynowany naukami przyrodniczymi, być może pod wpływem swych przyjaciół młodych medyków, wstąpił na Wydział Lekarski z mocnym postanowieniem prowadzenia w przyszłości badań procesów chemicznych zachodzących w organizmie żywym. W związku ze swymi planami naukowymi Nencki pogłębiał studia w zakresie chemii, pracując pod

<sup>\*)</sup> prof. dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

<sup>\*\*)</sup> Najważniejsze źródła

1. Grzelakowska-Sztabert B. (1972), *Intern. J. Biochem.* 3, 125—137.
2. Pięćdziesiąt lat działalności Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego. 1918—1968. Red. Adler H. Warszawa, 1968, PWN ss. 184.
3. Niemierko S. (1987), *Acta Bioch. Polon.* 34, 239—252.
4. Zieliński K. (1978), *Nauka Polska* 19, 33—80.

<sup>\*\*\*)</sup> Szejczerowa A., 1977, Marceli Nencki, str. 137, Interpress, Warszawa.

kierunkiem słynnego chemika Adolfa Bayera. Jeszcze jako student Nencki, wraz ze swym przyjacielem Otto Szultzenem, opublikował wyniki badań nad powstawaniem mocznika oraz nad budową kwasu moczowego. W roku 1870 Nencki otrzymał stopień doktora medycyny na podstawie pracy na temat „Utlenianie związków aromatycznych w ustroju zwierzęcym”. W 1872 r. objął stanowisko asystenta w Zakładzie Patologii Uniwersytetu w Bernie (Szwajcaria); w r. 1877 zaproponowano Mu objęcie Katedry Chemii Lekarskiej, specjalnie dla Niego utworzonej. Warto nadmienić, że Katedry Chemii Fizjologicznej istniały wówczas tylko w Strasburgu, kierował nią znakomity Hoppe-Seyler, i w Warszawie, gdzie kierownikiem był profesor Bolesław Fudakowski. W ciągu osiemnastu lat Nencki prowadził w Bernie intensywną działalność badawczą, dydaktyczną i organizacyjno-naukową. Badania Jego ceniono bardzo wysoko; wybitni badacze z całej Europy odwiedzali Jego Zakład. Nencki wykształcił wielkie grono współpracowników, wśród których było wielu Polaków, otaczał ich szczególnie troskliwą opieką. Niektórzy z nich po uzyskaniu przez Polskę niepodległości objęli katedry uniwersyteckie. Pomimo wielu sukcesów naukowych w Szwajcarii, Nencki zgodził się zorganizować i objąć kierownictwo Działu Chemii w nowopowstałym Instytucie Medycyny Eksperymentalnej w Petersburgu. Warunki, które Mu proponowano, były wyjątkowo nęcące: nowy gmach, wybudowany według własnych Jego planów; wyposażenie pracowni— wspaniałe jak na owe czasy; możliwość zabrania ze sobą współpracowników z Berna; swoboda w wyborze tematyki badawczej; współpraca z Iwanem Piotrowiczem Pawłowem, wybitnym fizjologiem rosyjskim, Dyrektorem Instytutu; brak obciążeń dydaktycznych ze studentami. Wszystko to sprawiło, że dziesięcioletni okres pracy badawczej Nenckiego w Petersburgu okazał się niezwykle owocny. Niestety zmarł przedwcześnie, w wieku 54 lat.

Imponującą spuściznę naukową Nenckiego opracowali jego najbliżsi współpracownicy, Nadieżda Sieber-Szumowa i Jan Zaleski, w postaci dwóch tomów, każdy po ponad osiemset stron pod wspólnym tytułem „Opera Omnia”; zawierają one własne prace Nenckiego oraz prace Jego licznych uczniów.

Badania Nenckiego, prowadzone w drugiej połowie XIX wieku, wyprzedzały znacznie dotychczasowe statyczne podejście do problemów biochemicznych. Nenckiego pasjonowały zagadnienia dynamiki procesów chemicznych zachodzących w organizmie, powstawania niektórych składników ustroju — można Go więc zaliczyć do protagonistów nowoczesnej biochemii.

Zagadnienia opracowywane przez Nenckiego i Jego współpracowników były bardzo różnorodne. Nie miejsce tu omawiać szczegółowo Jego osiągnięcia. Ograniczę się więc do wskazania głównych kierunków badawczych. Szereg zagadnień interesowało Nenckiego przez całe Jego życie; np. utlenianie kwasów aromatycznych, budowa puryn, a zwłaszcza kwasu moczowego. Do ważnych osiągnięć Nenckiego należy wykazanie, że mocznik nie jest preformowany w cząsteczce białka, lecz powstaje z aminokwasów i że procesowi temu towarzyszy wiązanie dwutlenku węgla. We współpracy z I. P. Pawłowem wykazał on, że



miejszem powstawania mocznika jest wątroba. Ogromną sławę przyniosły Nenckiemu wyniki własnych badań i młodego biochemika polskiego, pracującego wówczas w Anglii Leona Marchlewskiego. Badania te wyraźnie wskazywały na pokrewieństwo chemiczne dwóch biologicznie ważnych barwników: hemoglobiny i chlorofilu. Poważny był też wkład Nenckiego w zagadnienia syntezy kwasów tłuszczowych, który później doprowadził Knoopa do wyjaśnienia dróg utlenienia kwasów tłuszczowych. Nencki nie ograniczał się do zagadnień teoretycznych: w razie potrzeby włączał się do pracy, która przynosiła bezpośredni pożytek, jak np. zwalczanie księgosuszu u bydła na południu Rosji. Wiele pracy poświęcił Nencki badaniom farmakologicznym, był jednym z pionierów mikrobiologii biochemicznej.

Nencki nigdy nie pracował w Polsce, utrzymywał jednak ze swoją Ojczyzną bliskie kontakty: był członkiem Akademii Umiejętności w Krakowie, doktorem honoris causa Uniwersytetu Jagiellońskiego, członkiem wielu towarzystw naukowych m.in. Towarzystwa Lekarskiego Krakowskiego, wygłaszał w Polsce referaty jak np. ostatni jego słynny odczyt w r. 1900 na Zjeździe Lekarzy i Przyrodników w Krakowie (p. str. 23). Odczyt ten powszechnie uważa się za testament naukowy Nenckiego. Ogłaszał także artykuły w czasopismach polskich. Nencki czuł się Polakiem. Zgodnie z Jego wolą pochowany został w Warszawie.

Ze względu na warunki polityczne Polski początek XX wieku był bardzo trudny dla rozwoju Nauki Polskiej. Wszelkie starania warszawskich sfer naukowych, chcących uczcić pamięć Nenckiego przez stworzenie Towarzystwa Jego imienia, którego celem byłoby popieranie rozwoju nauk ścisłych i stosowanych — niestety nie udawały się na skutek zakazów władz rosyjskich. Dopiero ruchy rewolucyjne 1905 r. zmieniły nieco sytuację: wcześniej odrzucane zabiegi warszawskich członków Polskiej Akademii Umiejętności doczekały się pomyślnego zakończenia i w 1907 r. zarejestrowano Towarzystwo Naukowe Warszawskie (TNW). Skupiało ono głównie wykładowców i byłych wychowanków Szkoły Głównej. Jednym z celów Towarzystwa było tworzenie własnych pracowni naukowych, wśród nich Pracowni, które były załączkiem przyszłych zakładów Instytutu imienia Marcelego Nenckiego. TNW utrzymywało się z fundacji społecznych, trudności finansowe były więc ogromne. Dlatego też wielkie znaczenie miał dokonany w 1909 r. zapis Nadzieży Sieber-Szumowej, długoletniej współpracownicy M. Nenckiego. Zapis ten w kwocie 50.000 rubli przeznaczony był dla przyszłego Instytutu. Także w gmachu przy ul. Śniadeckich 8, obecnej siedzibie Instytutu Matematycznego PAN, darze Józefa Potockiego dla TNW, przewidziano lokal dla Instytutu. Jednakże dopiero po odzyskaniu przez Polskę niepodległości kierownicy zakładów biologicznych TNW mogli ponowić starania o utworzenie Instytutu im. Marcelego Nenckiego, które zostały zaaprobowane. Rok 1918 można więc uważać za początek działalności Instytutu.

Pierwszym Dyrektorem Instytutu został Kazimierz Białaszewicz. Dzięki Jego szerokiej wiedzy, energii, zdolnościom organizacyjnym i oddaniu wszystkich

swych sił dla dobra rozwoju Nauki Polskiej Instytut w krótkim czasie stał się przodującą placówką w zakresie doświadczalnych nauk biologicznych, która przyciągała do współpracy, bardziej lub mniej ściślej, badaczy z całej Polski.

Kazimierz Białaszewicz urodził się w 1882 r. w Suwałkach. Po ukończeniu gimnazjum wstąpił na Uniwersytet Warszawski gdzie studiował zoologię. Jeszcze jako student wykonał pracę z zakresu histogenezy hydry, pracę tę nagrodzono złotym medalem. W 1905 r. za udział w walkach rewolucyjnych został wyrzucony z Uniwersytetu i musiał opuścić Warszawę, podobnie jak ponad 40 lat wcześniej Nencki. Dwa lata spędził w Niemczech pracując w różnych laboratoriach biologicznych. Później studiował w Uniwersytecie Jagiellońskim pod kierunkiem świętego biologa prof. Emila Godlewskiego, jra. Tam Białaszewicz doktoryzował się na podstawie pracy z dziedziny fizjologii wzrostu płazów. Już wtedy zainteresowania Białaszewicza skierowane były na procesy metabolizmu w tkankach zwierzęcych — główny problem większości Jego prac. Przez parę lat pracował jako asystent w Zakładzie Zoologii Uniwersytetu w Saratowie. W 1913 r. powrócił do Warszawy i objął stanowisko asystenta w Pracowni Fizjologii Zwierząt przy TNW kierowanej przez Jana Sosnowskiego, której kierownictwo objął w 1916 r. po habilitacji w Uniwersytecie Jagiellońskim. Pracownia ta była załącznikiem późniejszego Zakładu Fizjologii Instytutu Nenckiego. Tak więc od r. 1913 aż do końca swego życia (1943) Kazimierz Białaszewicz był związany z Instytutem, któremu oddał całą swą pasję życiową. Od r. 1918 Białaszewicz był kierownikiem Zakładu Fizjologii tworzącego się Instytutu im. Nenckiego. W r. 1920 został mianowany profesorem Fizjologii Zwierząt na Uniwersytecie Warszawskim. Była to pierwsza w Polsce Katedra Fizjologii na Wydziale Nauk Przyrodniczych, również i w innych krajach Europy było ich wówczas niewiele.

Zakład Fizjologii Zwierząt U.W. przez wiele lat korzystał z pomieszczeń Zakładu Fizjologii Instytutu Nenckiego przy ul. Śniadeckich 8. Także gdy w 1934 r. otrzymał własny lokal przy ul. Wawelskiej w budynkach Instytutu Radowego — związek między Instytutem a zakładem uniwersyteckim był bardzo ścisły, ponieważ Zakład Fizjologii Instytutu został przeniesiony do tego samego budynku, w najbliższym sąsiedztwie obecnego gmachu Instytutu im. Marcellego Nenckiego.

Zakłady Instytutu ze względu na trudną sytuację finansową nie mogły zatrudnić licznego personelu. Największy z Zakładów — Zakład Fizjologii — liczył nie więcej niż 6 do 8 osób stałego personelu. Kierownik Zakładu nie pobierał gaży z Instytutu, lecz tylko z Uniwersytetu Warszawskiego. Pozostali pracownicy, to wolontariusze. Wśród nich liczną grupę stanowili studenci, a także osoby, które zarabiały w inny sposób, głównie jako nauczyciele. Ich pasją życiową były badania doświadczalne, stwarzało to szczególną atmosferę, tak bardzo sprzyjającą wytężonej pracy naukowej.

Zadanie jakie stawiał sobie Instytut od początku „było skupienie w jego tonie grona specjalistów w zakresie najważniejszych działań biologii”<sup>\*)</sup>. Liczba

<sup>\*)</sup> Instytut imienia Nenckiego przy Towarzystwie Naukowym Warszawskim. 1920—1927. Organizacja, Działalność, Środki, Warszawa, 1928.



zakładów zmieniała się, zarówno ze względów finansowych jak i ze względów personalnych. Jedne musiały ulec likwidacji lub czasowemu zawieszeniu. Bez przerwy do wybuchu II Wojny Światowej funkcjonowały: Zakład Fizjologii pod kierunkiem Kazimierza Białaszewicza, Zakład Biologii Ogólnej — kierownik Romuald Minkiewicz. Zakład Morfologii Doświadczalnej, kierowany przez Jana Dembowskiego, utworzony został w 1927 r., jego działalność została zawieszona w 1934 r. ze względu na objęcie przez J. Dembowskiego Katedry Biologii na Uniwersytecie Stefana Batorego w Wilnie. Zakład Biometrii pod kierunkiem Jerzego Sława-Neymana powstał w 1928 r.. Działalność tego zakładu rozwijała się w ścisłej współpracy z placówkami z poza Instytutu podejmującymi zblizoną tematykę naukową. Zakład Neurobiologii objął po śmierci prof. E. Flataua prof. K. Orzechowski.

Głównym tematem badawczym Zakładu Biologii była analiza przystosowań czynnych ustroju jako całości do środowiska. Badania doświadczalne dotyczyły różnych przystosowań. W zakresie morfologicznych na pierwszy plan wybijały się klasyczne prace Stanisławy Dembowskiej nad morfodynamiką aparatu rzęskowego *Stylonychia* w czasie regeneracji. Przystosowania fizjologiczne opracowywali m.in. Jan i Stanisława Dembowski. Badali oni wpływ różnych czynników na pobieranie pokarmu przez wymoczki, wpływ różnego kształtu kropli na ruchy orzęsków, wpływ światła barwnego na szybkość podziałów tych pierwotniaków. Trzecią grupę zagadnień obejmowały przystosowania etologiczne, pod którymi należy rozumieć procesy psychofizjologiczne (w rozumieniu z lat dwudziestych) — a więc instynkty, pamięć, orientację przestrzenną, stosunki z innymi organizmami, jak symbioza, naśladownictwo itp.. Są to głównie prace Romualda Minkiewicza i współpracowników nad rozpoznawaniem i pamięcią kształtów oraz barw. Inne prace dotyczyły zagadnień etologicznych, które i znacznie później opracowywano w Instytucie Nenckiego np.: budowa domków przez larwy chruszka, zagadnienia symbiozy, rytmy biologiczne. W Zakładzie Biologii wprowadzano też nowe metody badań, jak np. barwienie przyżyciowe. Część wymienionych zagadnień opracowywanych przez Jana i Stanisławę Dembowski weszła później do tematyki Zakładu Morfologii Doświadczalnej.

Nieco więcej uwagi poświęcę problematyce Zakładu Fizjologii, ponieważ z niego powstały po wojnie dwa duże Zakłady Instytutu: Zakład Biochemii i Zakład Neurofizjologii. Tematyka Zakładu, wprowadzona przez Białaszewicza i kontynuowana przez Jego uczniów, dotyczyła zagadnień przemiany materii i energii z punktu widzenia porównawczego. W szczególności badano metabolizm różnych składników ciała w czasie głodu u przedstawicieli wielu gatunków zwierząt, zarówno kręgowych jak i bezkręgowych. Cały cykl prac poświęcono zagadnieniom biochemii rozwoju, ze szczególnym uwzględnieniem procesów zachodzących w czasie wzrostu i metamorfozy u owadów. Przemianę mineralną badano z różnych punktów widzenia: skład mineralny jaj, mięśni i cieczy ciała zwierząt morskich w zależności od składu mineralnego środowiska, w którym hodowano zwierzęta; przemiany mineralne w czasie głodu, chłonicie składników mineralnych w jelicie psa i steku kury. W zakresie fizjologii mięśni badano

przepuszczalność mięśni dla elektrolitów; rolę tłuszczów w pracy mięśnia, ciepło spalania mięśnia. Oddzielny kierunek badawczy, wprowadzony przez Kazimierza Białaszewicza w latach trzydziestych, to fizjologia pracy fizycznej u człowieka. Profesor Białaszewicz opracował szczegółowo metodykę badań ergometrycznych, wymiany oddechowej, przy czym cały szereg aparatów był Jego własnego pomysłu.

W latach trzydziestych tematyka badawcza Zakładu Fizjologii poszerzyła się dzięki wprowadzeniu zagadnień z fizjologii układu nerwowego i wyższych czynności nerwowych. Tematyką tą zajmowali się Liliana Lubińska oraz Jerzy Konorski i Stefan Miller. Był to jeszcze jeden przykład otwartości profesora Białaszewicza na nowe zagadnienia — chętnie godził się na prowadzenie badań nie będących w zasięgu Jego bezpośrednich zainteresowań — pod warunkiem jednak, że prace są pożyteczne dla rozwoju nauki.

Szereg osób mających związek z Zakładem Fizjologii Instytutu objęło jeszcze przed wojną kierownicze stanowiska w różnych placówkach naukowych (np. Mieczysław Bogucki, Bolesław Gutowski, Stanisław Przyłęcki, Witold Rawita-Witanowski). Tę listę można poszerzyć nazwiskami bezpośrednich uczniów Kazimierza Białaszewicza, którzy po wojnie zajęli szereg poważnych stanowisk (Michał Laskowski, Stella Niemierko, Włodzimierz Niemierko, Alina Perlberg-Szumlewicz, Bronisław Zawadzki, Genowefa Szwejkowska), również kilka osób które przed wojną miały zaawansowane prace magisterskie lub ukończone wywodzą się z Zakładu Fizjologii Zwierząt U.W. (Maria Dydyńska, Zofia Kiernik-Zielińska, Paulina Włodawer, Marian Rybicki). Jedną z ważnych działalności naukowych Zakładu Fizjologii były zebrania naukowe, w których poza stałymi pracownikami, brali udział również studenci, wykonujący prace doktorskie, jak i szereg osób z poza Instytutu. Te zebrania, cieszące się dużą frekwencją, można uważać na załączek Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, którego głównym organizatorem i pierwszym Przewodniczącym był Profesor Białaszewicz. Znow więc Instytut odegrał ważną rolę w integracji życia naukowego w Polsce. Należy podkreślić, że Polskie Towarzystwo Fizjologiczne skupiało nie tylko fizjologów, lecz również biochemików, farmakologów itp. Wśród członków założycieli PTBiochem. jest wielu dawnych członków Towarzystwa Fizjologicznego.

Prócz Zakładów naukowych Instytut posiadał Stacje terenowe. Było to zgodne z celami Instytutu im. Nenckiego zrzeszania biologów polskich różnych specjalności. Stacje miały swoją własną problematykę, ale służyły one również jako miejsce badań dla szerokich rzesz biologów. Prowadzono tam również kursy szkoleniowe dla studentów i młodych pracowników naukowych. Jak bardzo ważną rolę dla rozwoju biologii w Polsce stanowiły Stacje Instytutu może służyć spis nazwisk ludzi, którzy przewijali się przez Stacje, znajdujący się w sprawozdaniach z działalności Instytutu. Stacji było trzy. Stacja Hydrobiologiczna na Wigrach, kierowana przez Alfreda Lityńskiego od r. 1920, Stacja Morska w Helu, Kierownik — Mieczysław Bogucki i wreszcie Stacja Potamologiczna nad Prypecią, prowadzona przez młodego biologa, Jerzego Wiszniewskiego, roz-



poczynająca działalność tuż przed II Wojną Światową. Ponadto Instytut posiadał Centralną Bibliotekę w Warszawie, dostępną dla każdego, któremu księgozbiór był potrzebny. Biblioteka prowadziła szeroką wymianę czasopism z zagranicą. Księgozbiór jej został znacznie powiększony przez prywatną bibliotekę Nenckiego, którą Instytut Medycyny Eksperymentalnej w Petersburgu ofiarował Instytutowi. Biblioteka Instytutu była największą biblioteką biologiczną w Polsce, tuż przed wojną liczyła 30 000 woluminów. Była wzorowo prowadzona i cieszyła się zasłużonym uznaniem.

Od samego początku swego istnienia Instytut prowadził ożywioną działalność wydawniczą. Początkowo wydawał „Prace Instytutu im. Nenckiego” (od r. 1921/1922). Od r. 1926 zaczęło wychodzić Archiwum Hydrobiologii i Rybactwa pod redakcją Alfreda Lityńskiego i Mieczysława Boguckiego, od 1928 r. Instytut zaczął wydawać *Acta Biologiae Experimentalis*. Redaktorem i inicjatorem tego czasopisma był profesor Białaszewicz. W „Acta” drukowano prace z całej Polski, warto nadmienić, że już wówczas prace ogłaszane były nie tylko w języku polskim, lecz również w języku angielskim, francuskim i niemieckim.

Na zakończenie tego rysu dziejów Instytutu przed II Wojną Światową warto podkreślić rzecz trudną do opisanie lecz bardzo ważną — to jest atmosferę, jaka panowała w Instytucie. Atmosfera rzetelnej pracy naukowej, której inne sprawy były podporządkowane. Stosunki koleżeńskie, które sprawiały, że sukcesy jednych były radością pozostałych, a zmartwienia — wspólnymi zmartwieniami. Każdy pracownik czuł się dumny, że jest pracownikiem Instytutu im. Nenckiego.

Niestety, przyszła wojna i Instytut podzielił los wszystkich placówek naukowych i kulturalnych: praktycznie cały dobytek materialny albo został zniszczony w czasie oblężenia Warszawy, albo w czasie Powstania Warszawskiego. Biblioteka Instytutu, jego duma, poszła z dymem, aparatura albo zabrana przez Niemców albo zniszczona pomimo usilnych starań garstki byłych pracowników. Pozostały tylko cudem uratowane niektóre książki z dawnym Exlibrisem Instytutu, mające już teraz wartość historyczną. Ale jak zwykle przy takich kataklizmach, największe straty — to ludzie. Ludzie, którzy zginęli bądź zamordowani przez hitlerowców, bądź zabici przez kule, bądź zmarli śmiercią przedwczesną ze względu na wyniszczające warunki bytowania. Spośród pracowników Instytutu nie doczekali końca wojny: Kazimierz Białaszewicz, Natan Balsam, Maks Chejfec, Olga Krauze, Zygmunt Koźmiński, Alfred Lityński, Stefan Miller, Romuald Minkiewicz, Halina Rosenberg, Stanisław Sumiński, Witold Rawita-Witanowski, Jerzy Wiszniewski, Mirosław Zieliński i inni.

Natychmiast po wojnie grono byłych pracowników Instytutu podjęło starania odbudowy Instytutu. Pierwsze kroki poczynili w Moskwie profesor Jan Dembowski, który w czasie wojny sprawował funkcję attaché kulturalnego w Ambasadzie Polskiej w Moskwie, Stanisława Dembowska, Jerzy Konorski i Liliana Lubińska, (którzy wojnę przeżyli w Związku Radzieckim, pracując w Zakładzie Fizjologii w Suchumi). Wiosną 1945 r. po powrocie do Polski Konorskiego i Lubińskiej powstał Komitet Organizacyjny, do którego należały początkowo 4 osoby — Jerzy Konorski, Liliana Lubińska, Stella Niemierko i



Włodzimierz Niemierko; po powrocie do Kraju, jesienią 1947 r. dołączyli się Jan i Stanisława Dembowski. Pierwszą sprawą było ustalenie tymczasowej siedziby Instytutu. Ze względu na zniszczenia w Warszawie było niemożliwe nawet myśleć o Stolicy. Wybrano więc Łódź, która była praktycznie nie zniszczona. Organizowano tam Uniwersytet i Rektor Profesor Tadeusz Kotarbiński zaproponował Katedrę Fizjologii Zwierząt mojemu mężowi, Włodzimierzowi Niemierce, a Jerzemu Konarskiemu — Katedrę Neurofizjologii. Było to bardzo ważne, ponieważ zdawaliśmy sobie sprawę, że jednym z najważniejszych zadań stojących przed nami — jest przygotowanie młodych kadr naukowych, których brak był oczywisty. Ogrom trudu, który stał przed nami mógłby nawet przerażać: ze świetnie prosperującej placówki nie zostało dosłownie nic. Trzeba było zaczynać od początku. Jednakże był to okres niezwyklego entuzjazmu, który ogarniając prawie wszystkich pomagał w urzeczywistnieniu spraw wydających się niemożliwymi do wykonania. Nie było wówczas rozbudowanej biurokracji i jeden drugiemu starał się pomóc. W stosunkowo krótkim czasie otrzymano gmach przy ul. Południowej 66, po adaptacji mógł już on służyć za siedzibę Instytutu, w którym miały funkcjonować trzy zakłady: Biochemii (Kierownik Profesor Włodzimierz Niemierko), Biologii (Kierownik Profesor Jan Dembowski) i Neurofizjologii (Kierownik Profesor Jerzy Konorski). Jeszcze za czasów pierwszej przejściowej siedziby Instytutu w Łodzi przy ul. Kopernika 65 staraliśmy się najróżniejszymi sposobami o aparaturę (m.in. dary z UNRRA, UNESCO i Zw. Radzieckiego), a także próbując zamawiać prostsze urządzenia u najróżniejszych rzemieślników lub kupować poniemieckie (a może polskie?) aparaty, których Niemcy nie zdążyli wywieźć. Instytut podlegał wówczas Wydziałowi Nauki Ministerstwa Oświaty; TNW nie istniało jeszcze. Do Instytutu, rozpoczynającego swą działalność, zaczęli się zgłaszać jego dawni pracownicy: Genowefa Szwejkowska, Antoni Wojtczak, Aniela Szwejczerowa — przedwojenna bibliotekarka, która nie tylko zgodziła się zorganizować Bibliotekę Instytutu zupełnie od nowa, lecz zajmowała się wieloma sprawami biurowymi. Każdy robił wtedy to co było potrzebne. Zjawili się też dawni magistranci profesora Białaszewicza (Maria Dydyńska, Zofia Kiernik-Zielińska, Paulina Włodawer), rozpoczynali oni stopniowo pracę w Instytucie w Zakładzie Biochemii. Ponadto angażowano młodzież studencką z U.Ł., która studiując jednocześnie pomagała przy organizacji Instytutu i stopniowo zaczynała pracę doświadczalną. W Zakładzie Biochemii pracowali: Czesław Kurowski, Lech Wojtczak, Anna Wojtczak, Irena Kąkol, Witold Drabikowski. Personel techniczny właściwie nie istniał. Trzeba było więc samemu uczyć młode, pojętne i manualnie sprawne osoby; do takich należała np. Maria Bednarek. Stopniowo Zakład zaczynał funkcjonować i przygotowywaliśmy się intensywnie do pracy doświadczalnej. Podobnie działało się w dwóch pozostałych Zakładach Instytutu, którego Dyrektorem od 1948 r. był profesor Dembowski.

Problematyka Instytutu od początku działalności powojennej obejmowała zagadnienia współzależności budowy i funkcji oraz mechanizmów regulacyjnych na poziomie subkomórkowym, komórkowym oraz całego organizmu. Główny

trzon badań pozostał dotychczas ten sam. Zmieniło się natomiast i zmienia się ustawicznie wraz z postępami w nauce i możliwościami technicznymi podejście do rozwiązywania problemów oraz ich wybór, które bądź ze względów poznawczych, bądź z punktu widzenia użyteczności wydają się ważne. Rozwój pracy w znacznym stopniu zależał od warunków lokalowych, wyposażenia w aparaturę, zwiększenia kadry naukowej i nawiązania stosunków z placówkami zagranicznymi. To wszystko mogło nastąpić dopiero po otrzymaniu przez Instytut nowego budynku. Budowę jego rozpoczęto w Warszawie przy ul. Pasteura 3. W r. 1952 nowopowstała Polska Akademia Nauk przejęła Instytut jako jedną z pierwszych swych placówek. Dyrektorami Instytutu po Janie Dembowskiem byli: Włodzimierz Niemierko (1961—1967), Jerzy Konorski (1968—1973) i Kazimierz Zieliński od r. 1973. Zakłady Instytutu stopniowo przenosiły się do Warszawy w latach 1953—1955. W pracach związanych z organizacją Instytutu brało już bardzo czynny udział również następne pokolenie naukowe Instytutu.

W nowym gmachu Instytutu w Warszawie utworzony został w 1953 r. Zakład Hydrobiologii Eksperymentalnej (Kierownik Romuald Klekowski). W latach 1951—1961 do Instytutu, zgodnie z jego tradycjami, należała także Stacja Hydrobiologiczna w Mikołajkach przyjęta następnie przez Instytut Ekologii PAN, podobnie jak i Zakład Hydrobiologii w r. 1974. W latach 1955—1961 w skład Instytutu wchodził także Zakład Psychologii (Kierownik Eugeniusz Geblewicz), który przeszedł potem do U.W.

W dalszym ciągu opracowania przedstawię jedynie w głównych zarysach tematykę obecnie działających Zakładów Instytutu, poświęcając nieco uwagi Zakładowi Biochemii.

Problematyka badawcza Zakładu Biochemii, we wczesnym okresie powojennym, dotyczyła w pierwszym rzędzie biochemii owadów. Była to kontynuacja badań Kazimierza Białaszewicza i Włodzimierza Niemierki. Opracowywano metabolizm fosforowy, lipidowy, azotowy, węglowodanowy, jak również fosforylację oksydacyjną w różnych okresach życia i stanach fizjologicznych u mola woskowego, a później i jedwabnika. Wprowadzano nowe metody badawcze m.in. cytochemiczne. Otrzymano szereg ważnych wyników, niektóre zdobyły rozgłos światowy. Wprowadzono pracę zespołową, dawniej nie stosowaną w Instytucie. Dała ona bardzo dobre wyniki: przyspieszenie postępów w rozwiązywaniu zagadnień i nawiązywanie dobrych stosunków koleżeńskich, z których Instytut służył. W miarę powiększania kadry naukowej poza biochemią owadów, rozpoczęto badania w zakresie biochemii mięśni i białek mięśniowych, które w latach późniejszych rozwinęły się bardzo dobrze pod kierunkiem przedwcześnie zmarłego Witolda Drabikowskiego. Duże osiągnięcia zdobyto w zakresie biochemii lipidów (cykl prac Włodzimierza Niemierki i Pauliny Włodawer ze współpracownikami). Badania fosforylacji oksydacyjnej stopniowo doprowadziły do badań bioenergetycznych zespołu profesora Lecha Wojtczaka. Profesor Zofia Zielińska wprowadziła do Zakładu technikę hodowli narządów przeżywających, a profesor Aleksandra Przełęcka różne metody cytologiczne, w tym



mikroskopii elektronowej. Trudno w dość krótkim artykule uwzględnić cały długoletni dorobek Zakładu Biochemii. Wydaje się ważnym, że tworzenie nowych pracowni, podejmowanie nowych zagadnień następowało w miarę potrzeb Zakładu, przygotowania personelu naukowego, często zagranicą, wyposażenia aparaturowego. Na początku lat 60-tych stworzono Pracownię Neurochemiczną (Kierownik Stella Niemierko), która początkowo zajmowała się zagadnieniem transportu w aksonie. Badania we współpracy z Lilianą Lubińską dały ciekawe, szeroko cytowane wyniki. Zakład Biochemii w końcu lat 60-tych podzielił się na dwa Zakłady: Biochemii Komórki (Kierownik Zofia Zielińska) i Układu Nerwowego i Mięśni (Kierownik Witold Drabikowski). Obecnie istnieje Zakład Biochemii Komórki (Kierownik Barbara Grzelakowska-Sztabert) i Zakład Biochemii Mięśni (Kierownik Hanna Strzelecka-Gołaszewska). W każdym z nich jest kilka pracowni. Główne kierunki badawcze Zakładów Biochemii to różne aspekty bioenergetyki, metabolizmu i czynności enzymatycznych na poziomie subkomórkowym, w komórkach normalnych i nowotworowych. M.in. są to badania bioenergetyki mitochondriów (Lech Wojtczak); regulacja metabolizmu (Anna Wojtczak); regulacja biosyntezy fosfolipidów (Józef Zborowski); metabolizm folianów i antyfolianów w komórkach normalnych i nowotworowych oraz wpływ poliamin na ekspresję genów w cyklu komórkowym (Barbara Grzelakowska-Sztabert); syntaza tymidylanowa jako enzym docelowy w chemoterapii (Wojciech Rode). Badania biochemii mięśni dotyczą białek kurczliwych, białek regulujących procesy skurczu oraz właściwości błon mięśni i niektórych tkanek niemięśniowych. W szczególności bada się zależność pomiędzy strukturą i funkcją miozyny i aktyny oraz różne aspekty interakcji tych dwóch białek (Hanna Strzelecka-Gołaszewska); mechanizmy zależnej od wapnia regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych i gładkich oraz procesy regulacji ruchliwości w komórkach niemięśniowych (Renata Dąbrowska); strukturę i funkcję białek transportujących wapń (Jacek Kuźnicki). Ponadto prowadzi się prace nad budową chemiczną i metabolizmem niektórych składników błon komórkowych mięśni. Wreszcie prowadzone są badania nad rolą lekkich łańcuchów miozyny w mięśniach szkieletowych w procesach skurczu mięśniowego (Irena Kąkol). Badania z neurochemii obejmują zagadnienia odnowy po uszkodzeniach mózgu, roli gangliozydów i czynników neurotropowych po uszkodzeniach struktur limbicznych (Barbara Oderfeld-Nowak) oraz wpływu deprywacji ocznej na układy neuroprzekaznikowe (Jolanta Skangiel-Kramska). W wydzielonej Pracowni Metabolizmu Białek (Anna Puka) bada się wpływ różnych czynników, m.in. zmian w unerwieniu na ultrastrukturę i metabolizm mięśni szkieletowych.

Zakład Biologii Komórki (Maria Jerka-Dziadosz) ma tradycyjnie za obiekt doświadczeń głównie pierwotniaki. Ważniejsze problemy badań to: ruchy ameboidalne i płynięcie cytoplazmy (Andrzej Grębecki); wpływ jonów na zjawiska wrażliwości komórki (Stanisław Dryl); aspekty strukturalne cytoszkieletu w doświadczalnie zmienionej morfogenezie (Maria Jerka-Dziadosz); badania układów ruchliwych u pierwotniaków (Leszek Kuźnicki); funkcjonalne



aspekty struktury błon komórkowych i okolicy subplazmatycznej (Aleksandra Przełęcka). Stosuje się nowoczesne metody, m.in. mikromanipulacyjne, cytochemiczne, mikroskopowo-elektronowe, immunocytochemiczne, biochemiczne, elektrofizjologiczne, kinematograficzne.

Zakład Neurofizjologii (Bogusław Żernicki) stosując podejście międzydyscyplinarne, metody elektrofizjologiczne, behawioralne, anatomiczne, psycho-fizjologiczne, neurochemiczne, etologiczne bada organizację mózgu i jego plastyczność u zwierząt dorosłych i w czasie rozwoju. Największy z Zakładów Instytutu posiada 11 pracowni, których nazwy ilustrują kierunki badawcze: Percepcji wzrokowej (Bogusław Żernicki); Układów Aferentnych (Remigiusz Tarnecki); Psychofizjologii (Wanda Budohoska); Obronnych Odruchów Warunkowych (Kazimierz Zieliński); Układu Limbicznego (Elżbieta Fonberg); Etologii (Piotr Korda); Neuroanatomii (Anna Kosmal); Fizjologii Pamięci (Irena Łukaszewska); Neurochemii (Barbara Oderfeld-Nowak).

Poza zakładami Instytut posiada Bibliotekę, liczącą 60.000 woluminów oraz dwie Pracownie Środowiskowe: Mikroskopii Elektronowej (Elżbieta Wyroba) oraz Hodowli Komórek i Tkanek (Leszek Kaczmarek) i kilka pracowni usługowych, w tym Komputerowa, Izotopowa oraz Warsztat Mechaniczny i Szklarski.

Instytut wydaje czasopisma w języku angielskim: wznowione po wojnie „Acta Biologiae Experimentalis” zmieniono w r. 1970 na Acta Neurobiologiae Experimentalis (Redaktor Bogusław Żernicki) i Acta Protozoologica (Redaktorzy: Stanisław Dryl i Stanisław Kazubski).

Na zakończenie warto się zastanowić, co z dawnego przedwojennego Instytutu zachowało się do dni dzisiejszych? Wydaje się, że pomimo tylu lat, które dzielą nas od „dawnego” Instytutu, kataklizmów dziejowych, ogromnych strat ludzkich, zmiany pokoleń, zmiany przynależności (TNW, Ministerstwo Oświaty, PAN), Instytut im. M. Nenckiego nie tylko nadal żyje, lecz się wspaniale rozwinął, zachowując swoją indywidualność — placówki poświęconej podstawowym badaniom doświadczalnym w dziedzinie biologii. Jest to placówka otwarta na postępy wiedzy, na nowe techniki badawcze. Instytut nadal stara się o integrację biologów, m.in. przez koordynację planów badawczych, wydawanie czasopism, udostępnianie pracowni środowiskowych, urządzenie zebrań, organizację sympozjów krajowych i międzynarodowych. Stara się, współpracując z ośrodkami zagranicznymi i kształcąc nowe kadry naukowe — propagować Naukę Polską. Wiele prac obecnie prowadzonych ma swoje korzenie w dawnych, nawet przedwojennych badaniach.

Wydaje mi się, że warto tu przytoczyć kilka myśli Marcelego Nenckiego, które wciąż aktualne, mogą służyć jako drogowskaz dzisiejszym i przyszłym pracownikom Instytutu Jego imienia. „...,Z czasem i to, co nam prawie do osiągnięcia wydawało się niemożliwym, wpadło w nasze ręce, lecz my, dążąc ciągle naprzód już inne trudniejsze do wypełnienia mamy życzenia. Nie wątpię, że te zamiary przez nowe pokolenia badaczy zostaną osiągnięte, że nasi następcy znowu będą mieli cele, których my nie przeczuwamy... Zadań, czekających na

rozwiązanie jest nieskończona ilość i pojedynczy badacz ... widzi jak jedne pokolenia po drugich dalej kroczyć i pracować muszą, a końca badań nie ujrzą. Za to wiedza nasza będzie coraz obszerniejsza i głębsza, a korzyść praktyczna ... coraz większa”\*)

Z okazji Jubileuszu Instytutu im. M. Nenckiego wpłynęło do Redakcji naszego Kwartalnika kilkanaście artykułów z różnych dziedzin biochemii. Pierwsze trzy publikujemy już w tym zeszycie. Następne ukażą się w zeszytach monotematycznych poświęconych regulacyjnej funkcji procesów fosforylacji białek (zeszyt 2, tomu 35, 1989) i transportowi przez błony biologiczne (zeszyt 3, tomu 35, 1989).

---

\*) M. Nencki, 1900, Przegląd Lekarski XXXIX, Nr. 31.

## ARTYKUŁY

Pamięci profesora Włodzimierza Niemierki  
– w siedemdziesięciolecie Instytutu im. Nenckiego  
pracę tę poświęcają autorzy

JOLANTA BARAŃSKA\*, JÓZEF ZBOROWSKI\*\*

### Biosynteza i transport kwasu fosfatydowego w komórkach zwierzęcych

### Biosynthesis and transport of phosphatidic acid in animal cells

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Biosynteza kwasu fosfatydowego
- III. Transport kwasu fosfatydowego w układach modelowych błon sztucznych oraz naturalnych *in vitro*
  - III-1. Transport spontaniczny
  - III-2. Transport przy udziale białka przenoszącego
- IV. Transport kwasu fosfatydowego *in vivo*
- V. Kwas fosfatydowy jako jonofor

#### Contents

- I. Introduction
- II. Biosynthesis of phosphatidic acid
- III. Transport of phosphatidic acid *in vitro* in model systems of artificial and natural membranes
  - III-1. Spontaneous transport
  - III-2. Protein-mediated transport
- IV. Transport of phosphatidic acid *in vivo*
- V. Phosphatidic acid as ionophor

#### I. Wstęp

Kwas fosfatydowy jest fosfolipidem występującym zarówno w komórkach organizmów eukariotycznych jak i prokariotycznych jedynie w ilościach śladowych. Jest on jednak związkiem kluczowym w biosyntezie złożonych lipidów we wszystkich organizmach żywych (patrz artykuły przeglądowe [1, 2]). Ulegając defosforylacji do diacyloglicerolu jest prekursorem fosfatydylocholinoi, fosfatydyloetanoloaminy i triacyloglicerolu, a reagując z CTP przekształca się w CDP-diacyloglicerol, który jest prekursorem takich fosfolipidów jak fosfaty-

\*<sup>1</sup> Dr hab., \*\*<sup>2</sup> doc. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



dyloinozytol i fosfatydyloglicerol; z tego ostatniego powstaje następnie kardiolipina — specyficzny fosfolipid wewnętrznej błony mitochondrialnej.

W związku z kluczową rolą jaką kwas fosfatydowy odgrywa w syntezie lipidów wydają się być istotne nie tylko badania dotyczące jego przekształceń metabolicznych, lecz także i takie, które dotyczą jego transportu pomiędzy strukturami komórkowymi. Obecny artykuł zajmuje się wybranymi zagadnieniami z zakresu biosyntezy kwasu fosfatydowego w komórkach zwierzęcych, oraz jego transportem *in vitro* i *in vivo*. Omawia także, wydające się autorom ciekawe, nowe doniesienia dotyczące roli kwasu fosfatydowego jako jonoforu jonów wapnia.

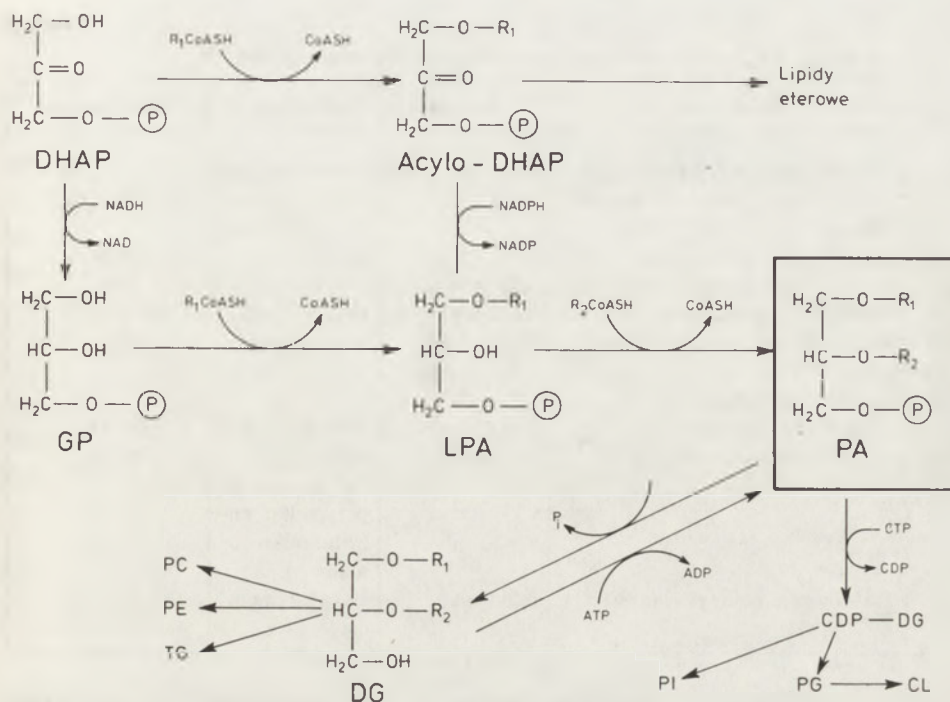
## II. Biosynteza kwasu fosfatydowego

W komórkach zwierzęcych kwas fosfatydowy jest głównie syntetyzowany poprzez estryfikację sn-glicero-3-fosforanu lub fosforanu dihydroksyacetonu. Estryfikacja sn-glicero-3-fosforanu, po raz pierwszy opisana przez Kornberga i Pricera w 1953 r [3] jest procesem dwuetapowym (Ryc. 1). Pierwszą reakcją estryfikacji katalizuje acylotransferaza sn-glicero-3-fosforanu (EC.2.3.1.15) wykorzystująca głównie długołańcuchowe nasycone acylowe pochodne CoA, estryfikację drugą — acylotransferaza 1-acylo-sn-glicero-3-fosforanu (EC.2.3.1.51) wykorzystująca wyłącznie nienasycone estry CoA [4, 5]. Powstające w ten sposób określone cząstki kwasu fosfatydowego (rodzaje molekularne) nie determinują jednak w pełni składu kwasów tłuszczowych innych fosfolipidów tkankowych [6].

Funkcja fosforanu dihydroksyacetonu jako akceptora długołańcuchowych acylowych pochodnych CoA została wykazana w późnych latach 60-tych [7, 8]. Syntezę acylowej pochodnej fosforanu dihydroksyacetonu katalizuje specyficzna acylotransferaza (EC.2.3.1.42). Związek ten jest prekursorem lipidów eterowych ale może być także zredukowany przy udziale NADPH do 1-acylo-sn-glicero-3-fosforanu (kwas lizofosfatydowy), z którego w wyniku kolejnej acylacji tworzy się kwas fosfatydowy (Ryc. 1).

Ponadto, kwas fosfatydowy może powstawać poprzez fosforylację L-1,2-di-acylo-glicerolu przy udziale ATP, w reakcji katalizowanej przez kinazę diacyloglicerolową (EC. 2.7.1.31) [9], ryc. 1. Enzym ten występuje zarówno w błonach jak i we frakcji rozpuszczalnej wątroby [10], czy mózgu [11, 12]. W mózgu (zarówno w endoplazmatycznym retikulum jak i we frakcji rozpuszczalnej) [11, 12], a szczególnie w błonach erytrocytów (ghosts) [13], aktywność tego enzymu znacznie przekracza aktywność acylotransferazy sn-glicero-3-fosforanu, co wskazuje na jego znaczenie.

W odróżnieniu od kinazy diacyloglicerolowej, acylotransferazy sn-glicero-3-fosforanu i fosforanu dihydroksyacetonu są w komórkach zwierzęcych wyłącznie enzymami błonami. Początkowo sądzono, że acylotransferaza fosforanu dihydroksyacetonu, w zależności od rodzaju tkanki, występuje bądź w



Ryc. 1. Główne drogi biosyntezy kwasu fosfatydowego.

Szlak I: GP, sn-glicero-3-fosforan; LPA, 1-acylo-sn-glicero-3-fosforan (kwas lizofosfatydowy); PA, kwas fosfatydowy. Szlak II: DHAP, fosforan dihydroksyacetonu; Acylo-DHAP, acylowa pochodna fosforanu dihydroksyacetonu; LPA, PA, jak wyżej. Szlak III: DG, diacyloglicerol; PA, jak wyżej. Inne skróty: PC, fosfatydylocholina; PE, fosfatydyloctanoloamina; TG, triacyloglicerol; CDP-DG, CDP-diacyloglicerol; PI, fosfatydyloinozytol; PG, fosfatydyloglicerol; CL, kardiolipina.

mitochondriach [14, 15] bądź w endoplazmatycznym retikulum [16], jednakże dokładniejsze badania Jo n e s a i H a j r y [17—19] wykazały, że enzym ten jest zlokalizowany w peroksysomach. Aktywność jego jest bowiem ściśle skorelowana z aktywnością urykazy, enzymu „znacznikowego” peroksysomów.

W mikrosomach głównym produktem acylacji sn-glicero-3-fosforanu jest kwas fosfatydowy [20, 21], podczas gdy w mitochondriach są nimi kwas lizofosfatydowy i fosfatydowy [21, 22]. Skład kwasów tłuszczowych mitochondrialnego i mikrosomalnego kwasu fosfatydowego różni się między sobą [23]. W mitochondriach acylotransferaza sn-glicero-3-fosforanu występuje w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [24—27]. Według Pullmana i wsp. [27] mikrosomalne i mitochondrialne acylotransferazy sn-glicero-3-fosforanu są izoenzymami. Ich właściwości określone dla enzymów tkanki wątrobowej zestawiono w Tabeli 1.

Jak widać z Tabeli 1, acylotransferazy mikrosomalna i mitochondrialna różnią się między sobą specyficznością względem wykorzystywanych estrów długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, inną odpowiedzią na działanie temperatury, enzymów proteolitycznych, czynników reagujących z grupami SH,

Tabela 1

Acylotransferazy sn-glicero-3-fosforanu w subfrakcjach komórek wątroby

Lp.	Właściwość	Mikrosomy	Mitochondria	Piśmiennictwo
1.	Specyficzność względem nasyconych i nienasyconych długocząściowych estrów CoA	brak specyficzności	wykorzystywane są wyłącznie estry nasycone	[5, 21, 22, 27—30]
2.	Optimum pH	7,0	6,6—8,5	[28]
3.	$K_m$ względem glicero-3-fosforanu	0,33 mM	0,18 mM	[29]
4.	Wpływ N-etylmaleimidu (NEM)	inaktywuje	brak wpływu	[28, 30, 31]
5.	Trawienie enzymami proteolitycznymi	inaktywuje	brak wpływu	[31]
6.	Wpływ temperatury			
	a) przetrzymywanie w 4°C	inaktywuje	brak wpływu	[28, 29]
	b) przetrzymywanie w 15°C	inaktywuje	mniejszy wpływ niż w przypadku enzymu mikrosomalnego	[28, 29]
7.	Traktowanie polimyksyną B	inaktywuje	słaba stymulacja	[31]

a także polimyksyny B. Wykazują też odmienną pozorną stałą  $K_m$  względem sn-glicero-3-fosforanu oraz różne optima pH.

W ostatnich latach zajęto się również kwestią asymetrycznego rozmieszczenia acylotransferaz w płaszczyźnie poprzecznej błony mikrosomalnej i mitochondrialnej. W badaniach użyto enzymów proteolitycznych [31—33]. Okazało się, że pronaza, tripsyna, bromelaina i papaina hamowały aktywność enzymu mitochondrialnego tylko wówczas, gdy struktury te poddawano uprzednio działaniu detergentów, takich jak dezoksycholan lub Triton X-100. W przypadku acylotransferazy mikrosomalnej, enzymy proteolityczne hamowały jej aktywność niezależnie od obecności detergentów [31]. Wyniki te wskazywałyby, że centrum aktywne mikrosomalnej acylotransferazy znajduje się po cytoplazmatycznej stronie błony, podczas gdy enzym mitochondrialny jest eksponowany po stronie wewnętrznej błony zewnętrznej mitochondrium. Jednakże późniejsze badania tych autorów [33] nie wskazują jednoznacznie na taką lokalizację enzymu mitochondrialnego. W zależności bowiem od środowiska i jego siły jonowej enzym był lub nie był hamowany przez proteazy, co zdaniem autorów sugeruje, że jest on umieszczony prostopadle w stosunku do płaszczyzny poprzecznej błony. Natomiast enzym katalizujący następną reakcję acylacji, t.j. acylotransferaza l-acylo-sn-glicero-3-fosforanu, a ściślej jego centrum aktywne, znajduje się najpewniej po wewnętrznej stronie zewnętrznej błony mitochondrialnej (informacja prywatna uzyskana na XIV Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym, Praga, 1988).

Porównując udział ilościowy acylotransferaz sn-glicero-3-fosforanu występujących w mitochondriach i endoplazmatycznym retikulum w syntezie kwasu



fosfatydowego w różnych tkankach u różnych zwierząt wykazano, że w wątrobie szczura, królika i wołu, mitochondrialne acylotransferazy odpowiadają za 50% produkcji tego związku w komórce [22, 29, 34]. W narządach takich jak serce, nerka, nadnercze [34], a także w tkance tłuszczowej [35], tylko 10% komórkowego kwasu fosfatydowego jest produkowane w mitochondriach. Udział mitochondrialnej acylotransferazy w wątrobie świnki morskiej [36] i komórkach nowotworowych raka Ehrlicha [34] jest jeszcze mniejszy. Biorąc to pod uwagę można wnosić, że mitochondria tkanek o niskich zdolnościach do syntezy kwasu fosfatydowego otrzymują go z endoplazmatycznego retikulum na drodze transportu. Podobnie, kwas fosfatydowy musi być transportowany z zewnętrznej błony mitochondrialnej do błony wewnętrznej tych organelli, gdzie zachodzi synteza kardiolipiny. Możliwe mechanizmy transportu kwasu fosfatydowego zachodzące w komórkach zwierzęcych są przedstawione w następnych rozdziałach niniejszego artykułu.

### III. Transport kwasu fosfatydowego w układach modelowych błon sztucznych oraz naturalnych *in vitro*

Transport fosfolipidów w komórkach organizmów żywych jest od dłuższego czasu obiektem specjalnego zainteresowania badaczy. W latach 70-tych wyizolowano z frakcji cytoplazmatycznej komórek wielu tkanek zwierząt, a także roślin, rozpuszczalne białka posiadające zdolność wiązania i przenoszenia fosfolipidów pomiędzy błonami (patrz artykuły przeglądowe w Postęпах Biochemii [37, 38]). Lipidy mogą być jednak również, choć wielokrotnie wolniej, transportowane bez udziału białek przenoszących. Zjawisko to nosi nazwę transportu spontanicznego.

#### III-1. Transport spontaniczny

Spontaniczny transport lipidów jest od kilku ostatnich lat przedmiotem intensywnych badań. Na podstawie dotychczasowych danych postuluje się istnienie dwóch od siebie niezależnych mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces, a mianowicie transport:

- 1) jako wynik kolizji dwóch błon: dawcy i biorcy [39, 40],
- 2) jako wynik przejścia fosfolipidu w postaci monomeru lub micelli z błony dawcy do błony biorcy w procesie dyfuzji przez fazę wodną [41—50].

Mechanizm pierwszy zakłada, że błony naturalne lub sztuczne wchodzi na pewien okres w ścisły kontakt pomiędzy sobą. Kontakt ten powoduje znaczne zmniejszenie lub prawie zupełne zniknięcie przylegającej do części grup polarnych fosfolipidów izolującej warstwy wody, przez co zostaje ułatwione wyjście cząsteczki lipidu z jednego rodzaju błony i wnikięcie do drugiego rodzaju. Możliwa jest także fuzja błon, zachodząca również na krótki okres czasu, w którym to fosfolipidy z dwóch błon wymieniają się, a następnie rozchodzą w obu

blonach w wyniku dyfuzji lateralnej. Natomiast mechanizm drugi zakłada wyjście monomeru z błony dawcy i dyfuzję przez fazę wodną, aż do przypadkowego spotkania i wniknięcia do błony akceptorowej.

Oba mechanizmy mają swoich zwolenników, jednakże najnowsze badania przemawiają za prawdziwością mechanizmu drugiego. Badania kinetyczne wykazały bowiem, że w przypadku równego stężenia obu błon, dawcy i biorcy, reakcja przejścia monomeru lipidu przez fazę wodną jest reakcją pierwszego rzędu [45, 46]. Należy zatem sądzić, że czynnikiem ograniczającym w procesie transportu jest wyjście cząsteczki z błony do fazy wodnej a nie wejście do błony akceptorowej [45, 46]. Przeprowadzono również inne, proste doświadczenia pozwalające na rozróżnienie między obu mechanizmami. W doświadczeniach tych inkubowano stałą ilość błon dawcy z wzrastającymi stężeniami błon biorcy. W przypadku kolizji błon transport fosfolipidów byłby wprost proporcjonalny do dodanych ilości błon akceptorowych, a w przypadku dyfuzji fosfolipidów stężenie tych błon byłoby bez wpływu na transport. Doświadczenia prowadzone w układach błon sztucznych wykazały brak wpływu stężenia błon biorcy na transport, co wskazuje na prawdziwość drugiego mechanizmu [43, 44, 46].

Spontaniczny transport monomerów kwaśnych fosfolipidów przez fazę wodną został również wykazany przez grupę belgijską [47, 48, 50] w pomysłowych doświadczeniach, w których wykorzystano metodę swobodnej przepływowej elektroforezy (*free-flow electrophoresis*). W doświadczeniach tych używano dwóch rodzajów pęcherzyków liposomalnych, jednych o ładunku obojętnym zbudowanych z fosfatydylocholine oraz drugich zbudowanych z fosfatydylocholine i [ $^3\text{H}$ ]-fosfatydyloglicerolu [47]. Pęcherzyki pierwszego rodzaju były w polu elektrycznym inertne, podczas gdy drugie wędrowały do anody. Po zmieszaniu razem, w czasie inkubacji, liposomy zawierające początkowo wyłącznie fosfatydylocholinę stawały się coraz bardziej naładowane, podczas gdy pęcherzyki drugiego rodzaju były coraz mniej ujemne. Obserwacje te potwierdzało także przemieszczenie piętna. Po czterech godzinach inkubacji populacja pęcherzyków stała się homogenna. Doświadczenie to świadczy o stopniowym przechodzeniu fosfatydyloglicerolu przez fazę wodną do liposomów zawierających początkowo wyłącznie fosfatydylocholinę. Gdyby transport odbywał się drogą kolizji można byłoby spodziewać się wielu różnych populacji pęcherzyków liposomalnych już od pierwszych minut inkubacji. De Cuyper i w.s.p. [47, 48, 50] badali ponadto zdolność i innych fosfolipidów do przemieszczania się pomiędzy sztucznymi błonami. Najwydajniejszy ich transport zachodził, gdy błona dawcy posiadała ładunek ujemny, a błona biorcy ładunek obojętny. Wśród wszystkich fosfolipidów, których transport badano, kwas fosfatydowy był transportowany z największą wydajnością, a jego przejście zależało od pH środowiska. Mianowicie w pH 4,5—7,0, w którym kwas fosfatydowy jest cząsteczką jednoujemną, jego połowiczny czas przejścia wynosił 150 min, w pH poniżej 4,5, w którym nie jest on zdysocjowany, a więc silnie związany błoną, kilka godzin; natomiast w pH powyżej 7, w którym kwas fosfatydowy tworzy anion dwoujemny, co prawdopodobnie zwiększa jego hydrofilność, jego poło-



wiczny czas przejścia stawał się bardzo szybki (poniżej 10 min). Badania te wskazują na rolę hydrofilowej grupy fosfolipidów w transporcie spontanicznym. Poprzednio zwracano uwagę jedynie na rolę hydrofobowej części fosfolipidów [43, 51], przypuszczając nawet, że budowa ich części polarnej (hydrofilowej) jest mniej istotna [51].

Wszystkie powyżej przedstawione badania były prowadzone na błonach sztucznych. S t u h n e - S e k a l e c i S t a n a c e v [52] wykazali jednak znaczny transport kwasu fosfatydowego w nieobecności rozpuszczalnych białek cytoplazmatycznych między frakcją mikrosomalną a mitochondrialną wątroby świnki morskiej. Podobny transport był obserwowany przez B a r a ń s k ą i W o j t c z a k a [53] między frakcją mikrosomalną (dawca) a mitochondrialną (biorca) wątroby szczura. W czasie 1 godz., w środowisku o wysokiej sile jonowej (100 mM KCl), spontaniczny transport radioaktywnego, [<sup>32</sup>P] kwasu fosfatydowego wynosił od 20 do 30%, podczas gdy podobny, bez udziału białek transportujących, transport fosfatydylocholine wynosił 2,5%. Transport kwasu fosfatydowego nie był wprost proporcjonalny do zwiększającego się stężenia błon akceptorowych, co wskazuje na mechanizm dyfuzji tego fosfolipidu przez fazę wodną.

### III-2. Transport przy udziale białek przenoszących

Rozpuszczalne białka frakcji cytoplazmatycznej charakteryzują się różnym stopniem specyficzności wobec transportowanych fosfolipidów [37, 38, 54, 55]. Oprócz białek specyficznie przenoszących fosfolipidy, np. fosfatydyloinozytol czy fosfatydylocholinę, są także niskocząsteczkowe białka niespecyficzne przenoszące większość fosfolipidów, a także cholesterol i glikolipidy [56]. Białko takie zostało po raz pierwszy oczyszczone i opisane przez B l o j a i Z i l v e r s m i t a w 1977 r [57]. Oprócz wątroby szczura występują one także i w innych tkankach.

Niskocząsteczkowe białka, których obecność wykazano w cytoplazmie wątroby wołu [58] i świnki morskiej [52] testowane były również pod względem zdolności do transportu kwasu fosfatydowego i zdolność tę wykazywały. B a r a ń s k a i W o j t c z a k [59] wykazali zależność transportu kwasu fosfatydowego (z frakcji mikrosomalnej do mitochondriów wątroby szczura) od obecności białka przenoszącego jedynie w niskiej sile jonowej środowiska. W wysokiej sile jonowej (100 mM KCl), transport spontaniczny kwasu fosfatydowego był natomiast tak duży, że dodatek frakcji cytoplazmatycznej zawierającej niespecyficzne białko transportujące fosfolipidy nie wpływał już na przejście kwasu fosfatydowego pomiędzy błonami. Zdolność do transportu i wiązania kwasu fosfatydowego posiadało jedynie niespecyficzne białko cytoplazmatyczne. Białka rozpuszczalne w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, oraz wnętrza mitochondrium (matriks) nie były do tego zdolne [59].

Zestawiając dane dotyczące biosyntezy i transportu *in vitro* kwasu fosfatydowego można przyjąć, że fosfolipid ten syntezowany po cytoplazmatycznej stronie endoplazmatycznego retikulum może być przenoszony do innych



struktur komórkowych (mitochondria). Transport przebiega przy udziale białka przenoszącego, a także bez jego udziału w wyniku transportu spontanicznego. Występująca w komórkach *in vivo* siła jonowa jest dostatecznie wysoka aby sądzić, że za przejście kwasu fosfatydowego pomiędzy błonami jest odpowiedzialny w znacznej mierze transport spontaniczny. W mitochondriach kwas fosfatydowy jest syntetyzowany po wewnętrznej stronie błony zewnętrznej, a w przestrzeni międzybłonowej nie stwierdzono białek przenoszących. Można więc przypuszczać, że transport kwasu fosfatydowego z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej, konieczny dla syntezy kardiolipiny, zachodzi bądź drogą dyfuzji monomeru poprzez fazę wodną, bądź dyfuzji lateralnej w miejscu zetknięcia się obu błon mitochondrialnych.

#### IV. Transport kwasu fosfatydowego *in vivo*

Prace przedstawione w tym rozdziale pochodzą z jednego tylko laboratorium. Jest to laboratorium amerykańskie, kierowane przez P a g a n o, w którym do badań transportu fosfolipidów wewnątrz żywej komórki zastosowano unikalną metodę. Polega ona na inkubacji komórek hodowanych w jednowarstwowych kulturach z liposomami zawierającymi fluorescencyjne analogi fosfolipidów [60]. Fosfolipidowe analogi wnikają do błony plazmatycznej komórek, a następnie przechodzą do różnych struktur subkomórkowych. Piętnowanie w czasie różnych struktur subkomórkowych, będące wynikiem przemieszczenia fosfolipidów, oglądano we fluorescencyjnym mikroskopie (high resolution fluorescence microscopy) i fotografowano. Do badań używano fibroblastów chomika a fluorescencyjne analogi fosfolipidów zawierały w miejscu jednego z łańcuchów kwasów tłuszczowych podstawnik fluorescencyjny  $C_6$ -NBD. Skrót ten oznacza kwas N-(4-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazolo)aminokapronowy. Liposomy zbudowane były bądź z  $C_6$ -NBD-kwasu fosfatydowego, bądź z innych  $C_6$ -NBD-fosfolipidów i zawierały ponadto pewną ilość znakowanej rodaminą fosfatydyloetanolaminy. Inkubację prowadzono 30—60 min w temp.  $2^\circ C$ , aby zapobiec endocytozie. Następnie komórki odmywano od zewnętrznego medium i inkubowano dalej, bez liposomów, w temp.  $37^\circ C$  w czasie 1 godz. W tak przeprowadzonym doświadczeniu można wyróżnić 3 stadia przejść fosfolipidu:

- 1) przejście fosfolipidu z liposomu do błony plazmatycznej komórki,
- 2) translokacja fosfolipidu poprzez błonę plazmatyczną,
- 3) transport fosfolipidu wewnątrz komórki.

Przejście fosfolipidu z liposomów do błony plazmatycznej przebiegało drogą dyfuzji monomeru fosfolipidu przez fazę wodną (transport spontaniczny). Świadczy o tym fakt, że w błonie komórek fibroblastów nie znajdowano znakowanej rodaminą fosfatydyloetanolaminy, która winna również się tam znajdować, gdyby transport odbywał się zgodnie z mechanizmem kolizji [61, 62].

W przypadku gdy komórki fibroblastów inkubowano w temp.  $2^\circ C$  z liposomami zawierającymi fluorescencyjne analogi fosfatydylocholino [61, 64],

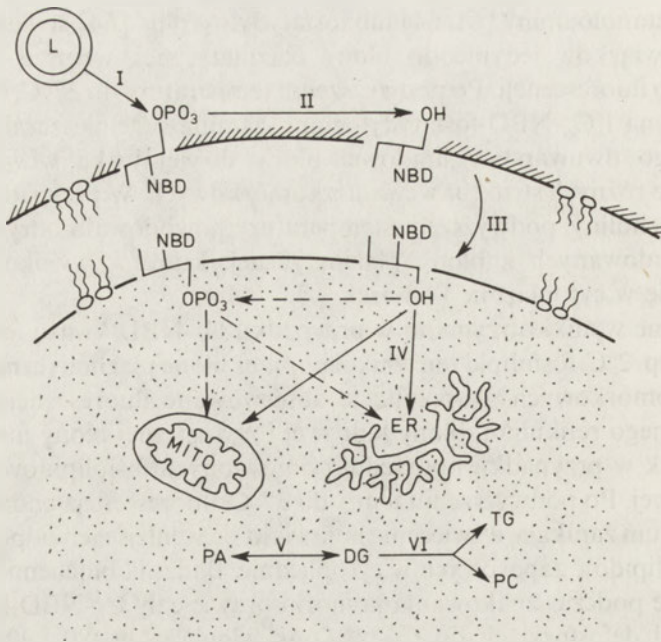
fosfatydyloetanolaminy [61, 64] lub fosfatydyloseryny [64] stwierdzano przejście tych związków jedynie do błony plazmatycznej, wewnątrz komórki nie wykazywało fluorescencji. Po podwyższeniu temperatury do 37°C, C<sub>6</sub>-NBD-fosfatydyloseryna i C<sub>6</sub>-NBD-fosfatydyloetanolamina przemieszczały się z listka zewnętrznego dwuwarstwy lipidowej błony do jej listka wewnętrznego, a następnie do różnych struktur wewnątrzkomórkowych. W przypadku C<sub>6</sub>-NBD-fosfatydylocholina, podwyższenie temperatury powodowało odrywanie pęcherzyków zbudowanych z błony plazmatycznej, które w wyniku endocytozy pojawiały się w cytoplazmie komórek.

Odmienne wyniki otrzymano w przypadku C<sub>6</sub>-NBD-kwasu fosfatydowego [65]. W temp. 2°C, fosfolipid ten wnikał przez błonę plazmatyczną do struktur wewnątrzkomórkowych. W rezultacie obserwowano fluorescencję błon endoplazmatycznego retikulum, błony jądrowej i zewnętrznej błony mitochondrialnej, a nie jak w przypadku poprzednio omówionych fosfolipidów tylko błony plazmatycznej. Po podwyższeniu temp. do 37°C, fluorescencja endoplazmatycznego retikulum zanikała, a świecenie pojawiało się w miejscach odpowiadającym kropelkom lipidów zapasowych w cytoplazmie. Badania biochemiczne [66, 67] wykazały, że podczas znakowania komórki prawie cały C<sub>6</sub>-NBD-kwas fosfatydowy ulegał defosforylacji do C<sub>6</sub>-NBD-diacyloglicerolu (80—90%), który w temp. 37°C przekształcał się dalej w C<sub>6</sub>-NBD-triacylglicerol i C<sub>6</sub>-NBD-fosfatydylocholinę.

Dla zbadania bliżej mechanizmu wnikania kwasu fosfatydowego do komórki fibroblastów użyto [62] także innych fluorescencyjnych analogów kwasu fosfatydowego, a mianowicie analogu nie poddającego się defosforylacji (a więc związku, z którego nie może powstawać diacyloglicerol) oraz analogu, który ulegał defosforylacji, ale nie mógł być ponownie re-fosforylowany (budowa tych analogów, patrz [62]). Badania prowadzono w temp. 2°C. Analog fluorescencyjny kwasu fosfatydowego nie podlegający hydrolizie do diacyloglicerolu wnikał do błony plazmatycznej komórek, ale nie ulegał translokacji w płaszczyźnie poprzecznej tej błony i nie przechodził do wnętrza komórki. Kiedy z kolei inkubowano komórki z analogiem ulegającym defosforylacji do diacyloglicerolu, ale nie poddającym się ponownej re-fosforylacji stwierdzono znakowanie fluorescencyjne błon struktur subkomórkowych. W tych samych warunkach liposomalna C<sub>6</sub>-NBD-fosfatydylocholina nie wnikała do wnętrza komórek. Poddanie tych ostatnich komórek działaniu fosfolipazy C (odszczepiającej fosforylocholinę i prowadzącej do powstania C<sub>6</sub>-NBD-diacyloglicerolu) powodowało wzrastającą w czasie fluorescencję błon wewnątrzkomórkowych [62].

Na podstawie tych danych zaproponowano hipotezę dotyczącą przebiegu transportu kwasu fosfatydowego w komórce fibroblastów ([62], ryc. 2). Zakłada on co następuje: kwas fosfatydowy wnika do błony plazmatycznej komórki, jej zewnętrznego listka (I), gdzie ulega defosforylacji do diacyloglicerolu (II); przez błonę przemieszcza się diacyloglicerol (III); następnie diacyloglicerol z wewnętrznego listka błony plazmatycznej przechodzi do cytoplazmy i struktur wewnątrzkomórkowych na drodze dyfuzji (transport spontaniczny), lub przy





**Ryc. 2.** Wnikanie i transport kwasu fosfatydowego oraz jego metabolitów w komórce, wg [64]. Szczegółowy opis rycin w tekście artykułu. L-liposomy; MITO-mitochondria; ER-endoplazmatyczne retikulum; PA,kwas fosfatydowy; DG, diacyloglicerol; TG, triacyloglicerol; PC, fosfatydylocholina.

udziale niespecyficznego białka transportującego fosfolipidy (IV). W endoplazmatycznym retikulum diacyloglicerol ulega dalszym przekształceniom do triacyloglicerolu i/lub fosfatydylocholini (VI). Może on także ulegać re-fosforylacji do kwasu fosfatydowego będącego po ponownej hydrolizie źródłem diacyloglicerolu (V). Linią przerywaną na schemacie zaznaczono szlaki przekształceń możliwe, ale nie wykazane doświadczalnie, a mianowicie fosforylację diacyloglicerolu do kwasu fosfatydowego w wewnętrznym listku dwuwarstwy lipidowej błony plazmatycznej i jego transport do wnętrza komórki.

Powyzsza hipoteza postuluje zatem, że formę transportową kwasu fosfatydowego stanowi diacyloglicerol. Związek ten, w odróżnieniu od kwasu fosfatydowego, łatwo przemieszcza się w płaszczyźnie poprzecznej błony plazmatycznej komórek fibroblastów. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych badaczy dotyczących translokacji\* fluorescencyjnego analogu kwasu fosfatydowego w błonie erytrocytów. Związek ten, podobnie jak fosfatydylocholina, a w odróżnieniu od fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy, ulega translokacji bardzo wolno [68]. Natomiast endogeny diacyloglicerol jest szybko przemieszczany w błonach ludzkich erytrocytów [69].

\* Przemieszczanie się fosfolipidu z listka zewnętrznego dwuwarstwy lipidowej błony do jej listka wewnętrznego nosi nazwę w angielskiej terminologii "flip — flop".



Na podstawie przedstawionych doświadczeń można wnosić, że kwas fosfatydowy syntetyzowany po stronie cytoplazmatycznej endoplazmatycznego retikulum może być także w warunkach *in vivo* transportowany do innych błon. W mitochondriach, kwas fosfatydowy syntetyzowany po wewnętrznej stronie błony zewnętrznej mógłby być transportowany jedynie do błony wewnętrznej tych organelli. Ażeby natomiast przemieścić się poprzez błonę zewnętrzną i być „wyeksportowany” do innych struktur subkomórkowych, być może, musi ulec najpierw defosforylacji do diacyloglicerolu. Ponieważ jednak w wielu tkankach zarówno endoplazmatyczne retikulum jak i mitochondria syntetyzują kwas fosfatydowy, jest możliwe, że nie zachodzi w ogóle potrzeba jego transportu pomiędzy tymi strukturami. Wyjątkiem byłyby komórki (patrz rozdział I), w których synteza mitochondrialnego kwasu fosfatydowego jest niska.

Reasumując, mimo intensywnych badań prowadzonych w wielu pracowniach na świecie, problem transportu kwasu fosfatydowego w komórce pozostaje nadal sprawą otwartą. Nowe światło na to zagadnienie rzucają badania dotyczące roli kwasu fosfatydowego jako jonoforu.

## V. Kwas fosfatydowy jako jonofor

Oprócz transportu spontanicznego bądź katalizowanego przez białka przenoszące, dodatkowym mechanizmem transportu polarnych cząsteczek przez hydrofobową barierę, jaką stanowi błona, byłaby możliwość wykorzystania ich zdolności jonoforowych. Pojęcie jonoforu odnosi się zazwyczaj do organicznych cząsteczek, które mogą wiązać i przenosić kationy przez błony [70]. W przypadku jednak kiedy jonofory są związkami amfifilicznymi, jakimi są fosfolipidy, kation może odgrywać rolę czynnika inicjującego transport.

Działając jako jonofor kwas fosfatydowy tworzy kompleks składający się z dwóch cząsteczek wiążących jedną cząsteczkę wapnia ośmioma wiązaniami koordynacyjnymi pochodzącymi z atomów tlenu grup fosforanowych i karbonylowych (po cztery wiązania z każdej cząsteczki kwasu fosfatydowego). Zewnętrzną warstwę kompleksu stanowi hydrofobowy pierścień składający się z czterech łańcuchów kwasów tłuszczowych umożliwiający dyfuzję poprzez hydrofobową warstwę błony.

Taką budowę kompleksu kwasu fosfatydowego z jonem wapniowym postuluje między innymi Reusch [71] opierając się na doświadczeniach, w których wytrząsała wodny roztwór zawierający radioaktywny  $^{45}\text{CaCl}_2$ , oraz zdyspersowany radioaktywny [ $^{32}\text{P}$ ]kwas fosfatydowy z rozpuszczalnikami organicznymi. Analiza fazy organicznej wykazała, że proporcja kwasu fosfatydowego do wapnia wynosiła 2:1, a zatem wzór powstałego kompleksu można przedstawić jako  $\text{Ca}(\text{PA})_2$ . Podobnie, kwas fosfatydowy wiązał i przynosił  $\text{Mn}^{2+}$ , nie reagował natomiast z jonami  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . Zastosowany tu układ fazy wodnej i organicznej można za Reusch [71] przyjąć jako prosty model

doświadczalny biologicznego układu cytoplazma-błona. Znajdujące się w fazie wodnej (cytozplazmie czy przestrzeni międzykomórkowej) monomery kwasu fosfatydowego w obecności jonów wapnia tworzą kompleks, który może łatwo wnikać i przechodzić przez błonę. W ten sposób  $\text{Ca}^{2+}$  pełni funkcję inicjującą powstanie kompleksu i może być uważany za sprawcę translokacji kwasu fosfatydowego.

Warto jednak dodać, że przejście fosfolipidu wraz z jonem wapnia z fazy wodnej do organicznej ograniczone było jedynie do kwasu fosfatydowego. Zdywersowana fosfatydylocholina bądź fosfatydyloetanoloamina nie miały właściwości tworzenia kompleksu z jonami wapnia i nie przechodziły do fazy organicznej. Natomiast w mieszaninie z kwasem fosfatydowym fosfolipidy te tworzyły kompleks z jonami  $\text{Ca}^{2+}$  i przedostawały się do warstwy organicznej w proporcji 1:1:1. Na tej podstawie, R e u s c h [71] wyciągnęła wniosek, że kwas fosfatydowy w obecności  $\text{Ca}^{2+}$  może ułatwić wnikanie do błony i innym fosfolipidom, które tworzyłyby jonoforowo działający kompleks: kwas fosfatydowy-wapń-fosfolipid.

Ta ostatnia sugestia jest kwestionowana przez B r o c k e r h o f f a i w s p. [72]. Według tych autorów jedynie dwie cząstki kwasu fosfatydowego związane z jonem  $\text{Ca}^{2+}$  mogą tworzyć cząsteczkę jonoforu. Badacze ci używali jednak innego modelu doświadczalnego. Prowadzili doświadczenia na zbudowanych z różnych fosfolipidów liposomach, w których wnętrzu zamknięty był barwny związek arsenazo III, posiadający zdolność wiązania jonu wapnia. Tak zbudowane liposomy inkubowano z podanym zewnątrz  $\text{Ca}^{2+}$ , a następnie badano jego przejście do wnętrza. Podobny model doświadczalny był używany w badaniach grupy holenderskiej dotyczących między innymi wpływu różnych kwasów tłuszczowych obecnych w cząsteczce kwasu fosfatydowego na tworzenie kompleksu  $\text{Ca}(\text{PA})_2$  i jego właściwości [73].

B r o c k e r h o f f i w s p. [72] wykazali, że jedynie znajdujący się w błonie liposomów kwas fosfatydowy tworzył jonofor dla jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i pozwalał im na wejście do wnętrza pęcherzyka. Zależność transportu wapnia od pH środowiska pozwala przypuszczać, że największe zdolności jonoforowe posiada kompleks dwuujemny  $(\text{Ca}(\text{PA})_2)^{-2}$  występujący w fizjologicznym pH. Inkubacja liposomów zbudowanych z kwasu fosfatydowego z dodatkiem innych fosfolipidów np. fosfatydylocholina, powodowała tworzenie kompleksu: kwas fosfatydowy-wapń-fosfatydylocholina, który nie wykazywał jednak właściwości jonoforowych.

Przedstawione powyżej badania wskazują na rolę kwasu fosfatydowego w wiązaniu i przenoszeniu  $\text{Ca}^{2+}$ . Najciekawsze z nich wydają się jednak sugestie wskazujące na ułatwienie przejścia przez błonę kwasu fosfatydowego wtedy, gdy występuje on w postaci kompleksu z  $\text{Ca}^{2+}$ .

W poprzednim rozdziale przedstawiono dane świadczące o nikłych możliwościach transportowych *in vivo* cząsteczki kwasu fosfatydowego przez błonę bez jego uprzedniej defosforylacji. Być może utworzenie kompleksu z  $\text{Ca}^{2+}$

stanowi drogę alternatywną. Badania związane z jonoforową funkcją kwasu fosfatydowego są nowe. Najbliższe lata przyniosą napewno rozwiązanie tego interesującego problemu.

Autorzy składają serdeczne podziękowanie dr R. E. Pagano oraz American Society of Biological Chemists Inc. za zgodę na reprodukcję ryciny zamieszczonej w artykule jako Ryc. 2.

Artykuł otrzymano 29 lipca 1988 r.  
Zaakceptowano do druku 7 września 1988 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bell R.M., Coleman R.A., (1980), *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 459—487.
2. Brindley D.N., Sturton R.G. (1982), w *Phospholipids*, red. Hawthorne, J. N. i Ansell G. B., *New Comprehensive Biochemistry*, t. 4, str. 179—207. Elsevier, Amsterdam.
3. Kornberg A., Pricer W.E. jr., (1953), *J. Biol. Chem.*, **204**, 345—357.
4. Yamashita S., Numa S., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 565—573.
5. Yamashita S., Hosaka K., Numa S., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3490—3492.
6. Zborowski J., Sarzała M.G., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 23—34.
7. Hajra A.K., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3458—3465.
8. Hajra A.K., (1968), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 929—935.
9. Hokin M.R., Hokin L.E., (1959), *J. Biol. Chem.* **234**, 1381—1386.
10. Kanoh H., Åkesson B., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **85**, 225—232.
11. Bishop H.H., Strickland K.P. (1989), *Lipids* **15**, 285—291.
12. Lapetina E.G., Hawthorne J.N., (1971), *Biochem. J.*, **122**, 171—179.
13. Hokin L.E., Hokin M.R., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 470—483.
14. Hajra A.K., Agranoff B.W., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1617—1622.
15. Hajra A.K., Agranoff B.W., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3542—3543.
16. Hajra A.K., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3458—3465.
17. Jones C.L., Hajra A.K., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1138—1143.
18. Jones C.L., Hajra A.K., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10896—10900.
19. Jones C.L., Hajra A.K., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8289—8295.
20. Lloyd-Davies K.A., Brindley, D.N., (1975), *Biochem. J.*, **152**, 39—49.
21. Daae L.N.W., (1972), *FEBS Lett.*, **27**, 46—48.
22. Bremer J., Bjerve K.S., Borreback B., Christiansen R., (1976), *Mol. Cell. Biochem.*, **12**, 113—125.
23. Bjerve K.S., Daae L.N.W., Bremer J., (1976), *Biochem. J.*, **158**, 249—254.
24. Stoffel W., Schiefer H.G., (1968), *Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem.*, **349**, 1017—1026.
25. Zborowski J., Wojtczak L., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 73—84.
26. Daae L.N.W., Bremer J., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 92—104.
27. Monroy G., Rola F.H., Pullman M.E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6884—6894.
28. Haldar D., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 1494.
29. Nimmo H.G., (1979), *Biochem. J.*, **177**, 283—288.
30. Yamada K., Okuyama H., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 409—420.
31. Carroll A.M., Morris P.E., Grosjean C.D., Anzalone T., Haldar D., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 17—25.
32. Nimmo H.G., (1979), *FEBS Lett.*, **101**, 262—264.
33. Hesler C.B., Carroll M.A., Haldar D., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7452—7456.
34. Haldar D., Tso W.-W., Pullman M.E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4502—4509.



35. Saggerson E.D., Carpenter C.A., Cheng C.H.K., Sooranna S.R., (1980), *Biochem. J.*, **190**, 183—189.
36. Davidson J.B., Stancev N.Z., (1974), *Can. J. Biochem.*, **52**, 936—939.
37. Zborowski J., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 541—557.
38. Zborowski J., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 101—109.
39. Kremer J.M.H., Kops-Werkhoven M.M., Pathmamanoharan C., Guzman O.L.J., Wiersema P.H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **471**, 177—188.
40. Barsukov L.I., Victorov A.V., Vasilenko I.A., Evistigneeva R.P., Bergelson L.D., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 153—168.
41. Martin F.J., MacDonald R.C., (1976), *Biochemistry*, **15**, 321—327.
42. Papahadjopoulos D., Hui S., Vail W.J., Poste G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **448**, 245—264.
43. Duckwitz-Peterlein G., Eilenberger G., Overath P., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **469**, 311—325.
44. Roseman M.A., Thompson T.E., (1980), *Biochemistry*, **19**, 439—444.
45. Nichols J.W., Pagano R.E., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2783—2789.
46. Mc Lean L.R., Phillips M.C., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2893—2900.
47. De Cuyper M., Joniau M., Dangreau H., (1983), *Biochemistry*, **22**, 415—420.
48. De Cuyper M., Joniau M., Engberts J.B.F.N., Sudholter E.J.R., (1984), *Colloids Surface*, **10**, 313—319.
49. Mc Lean L.R., Phillips M.C. (1984), *Biochemistry*, **23**, 4624—4630.
50. De Cuyper M., Joniau M., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **814**, 374—380.
51. Massey J.B., Hickson D., She H.S., Sparrow J.T., Via D.P., Gotto A.M.Jr., Pownall H.J., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **794**, 274—280.
52. Stuhne-Sekalec L., Stanacev N.Z., (1980), *Canad. J. Biochem.*, **58**, 1082—1090.
53. Barańska J., Wojtczak L., (1988), *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**, 301—308.
54. Kader J.C., Douady D., Mazliak P., (1982), w *Phospholipids*, red. Hawthorne J.N., Ansell G.B., New Comprehensive Biochemistry, t. 4, str. 279—311, Elsevier, Amsterdam.
55. Helmkamp G.M.Jr., (1986), *J. Bioenerg. Biomembr.*, **18**, 71—91.
56. Crain R.C., Zilversmit D.B., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 37—48.
57. Bloj B., Zilversmit D.B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1613—1619.
58. Crain R.C., Zilversmit D.B., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1433—1439.
59. Barańska J., Wojtczak L., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 24—31.
60. Pagano R.E., Sleight R.G., (1985), *Science*, **229**, 1051—1057.
61. Struck D.K., Pagano R.E., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5404—5410.
62. Pagano R.E., Longmuir K.J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1909—1916.
63. Sleight R.G., Pagano R.E., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 742—751.
64. Martin O.C., Pagano R.E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 5890—5898.
65. Pagano R.E., Longmuir K.J., Martin O.C., Struck D.K., (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 872—877.
66. Pagano R.E., Longmuir K.J., Martin O.C., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2034—2040.
67. Pagano R.E., Longmuir K.J., (1983), *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 157—161.
68. Zachowski A., Fellman P., Devaux P.F., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **815**, 510—514.
69. Allan D., Thomas P., Michell R.H., (1978), *Nature*, **276**, 289—290.
70. Pressman B.C., (1983), *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 501—530.
71. Reusch R.N., (1985), *Chem. Phys. Lipids*, **37**, 53—67.
72. Chauhan A., Chauhan V.P.S., Brockerhoff H., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **938**, 353—360.
73. Smaal E.B., Mandersloot J.G., de Kruijff B., de Gier J., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **816**, 418—422.

RENATA JASIŃSKA\*, JÓZEF ZBOROWSKI\*\*

## Biosynteza i transport fosfolipidów w komórkach drożdży

### Biosynthesis and transport of phospholipids in yeast cells

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Rozmieszczenie i metabolizm fosfolipidów w błonach komórek drożdży
  - II-1. Frakcje subkomórkowe i fosfolipidowy skład błon
  - II-2. Drogi biosyntezy fosfolipidów w komórkach drożdży i ich regulacja
  - II-3. Lokalizacja głównych enzymów szlaków metabolicznych fosfolipidów w komórce
- III. Mechanizmy transportu fosfolipidów w komórkach drożdży
  - III-1. Transport fosfolipidów z udziałem białek transportujących
  - III-2. Transport fosfolipidów drogą dyfuzji lateralnej
  - III-2. Pęcherzyki lipidowe jako forma transportu

#### Contents

- I. Introduction
- II. Localization and metabolism of phospholipids in the membranes of yeast cells
  - II-1. Subcellular fractions and phospholipid composition of the membranes
  - II-2. Pathways for the synthesis of phospholipids and their regulation in yeast cells
  - II-3. Localization of the main enzymes of phospholipid biosynthesis in the cell
- III. The mechanisms involved in the transport of phospholipids in yeast cells
  - III-1. Phospholipid transport with the aid of phospholipid transfer proteins
  - III-2. Translocation of phospholipids by lateral diffusion process
  - III-3. Vesicles as a form for phospholipid transport

Wykaz stosowanych skrótów: PS — fosfatydyloseryna, PE — fosfatydyloetanolamina, PC — fosfatydylocholina, PI — fosfatydyloinozytol, CL — kardiolipina, PA — kwas fosfatydowy

#### I. Wstęp

We wszystkich żywych organizmach większość procesów biochemicznych i biofizycznych zachodzących w komórce zależy od budowy i funkcjonowania błon. Każda błona biologiczna charakteryzuje się określonym, często specyficznym

\* Mgr, \*\* doc. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

nym, składem strukturalnych fosfolipidów i białek, których wzajemne interakcje warunkują właściwości fizykochemiczne i biologiczne.

Biosynteza różnych klas fosfolipidów zachodzi w oddzielnych przedziałach subkomórkowych. I tak, w komórkach ssaków podstawowe fosfolipidy: fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloetanoloamina (PE), fosfatydyloseryna (PS) i fosfatydyloinozytol (PI) są syntetyzowane w endoplazmatycznym retikulum [1], a tylko niektóre, jak kardiolipina (CL) w mitochondriach [1, 2]. Te ostatnie organelle zawierają jednak PE i PC jako swoje podstawowe fosfolipidy. Pozostaje nadal kwestią otwartą wyjaśnienie, w jaki sposób odbywa się przemieszczanie tych fosfolipidów prowadzące do utrzymania ich stałego składu w błonach mitochondriów.

Oprócz badań zmierzających do wyjaśnienia i zrozumienia złożoności organizacji błon wyższych organizmów eukariotycznych prowadzone są doświadczenia z użyciem komórek drożdży piekarniczych, *Saccharomyces cerevisiae*. Wyniki tych badań dotyczące lipidowej komponenty błon są przedmiotem niniejszego artykułu.

## II. Rozmieszczenie i metabolizm fosfolipidów w błonach komórek drożdży

### II-1. Frakcje subkomórkowe i fosfolipidowy skład błon

Jednym z warunków umożliwiających badanie metabolizmu fosfolipidów w komórkach drożdży było uzyskanie czystych frakcji subkomórkowych [3]. Oprócz typowego preparatu mikrosomalnego używano frakcji wzbogaconych w szorstkie endoplazmatyczne retikulum (charakteryzujące się aktywną inkorporacją UDP-N-acetylo[U-<sup>14</sup>C]glukozyaminy) i gładkie endoplazmatyczne retikulum (enzym znacznikowy: reduktaza NADPH-cytochrom EC 1.6.2.4) [3]. Znana jest też metoda subfrakcjonowania mitochondriów drożdży [4]. Stopień czystości otrzymanych frakcji określano stosując enzymatyczne testy „znacznikowe”, elektroforezę w żelu poliakryloamidowym i kontrolę za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Z mitochondriów po ich rozfrakcjonowaniu uzyskano: frakcję zawierającą fragmenty błony wewnętrznej (enzym znacznikowy: oksydaza cytochromu c, EC 1.9.3.1); frakcję zawierającą fragmenty błony zewnętrznej (enzym oraz białko znacznikowe: 3-monooksygenaza kinureninowa, EC 1.14.13.9; poryna A — 29 kDa polipeptyd); frakcję odpowiadającą przestrzeni międzybłonowej (enzym oraz białko znacznikowe: peroksydaza cytochromu c, EC 1.1.1.1.5; cytochrom b<sub>2</sub>), a także frakcję odpowiadającą matriks mitochondrialnej (enzym znacznikowy:hydrataza fumaranowa, EC 4.2.1.2).

Maksymalna kontaminacja badanych frakcji fragmentami innych błon wynosiła od 0.1 do 10%, z wyjątkiem frakcji zewnętrznej błony mitochondrialnej zanieczyszczonej w 25% frakcją odpowiadającą przestrzeni międzybłonowej.

Procentowa zawartość głównych fosfolipidów w stosunku do ich całkowitej ilości jest w różnych błonach (błony plazmatyczne, mitochondria, endoplazma-

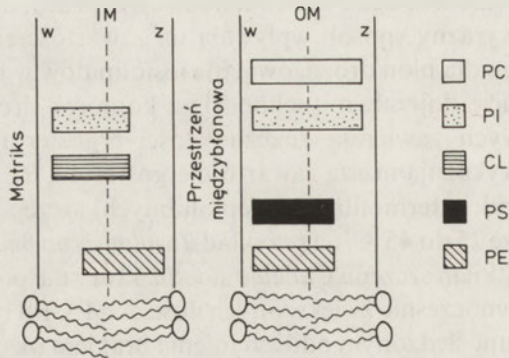


tyczne retikulum) komórek szczepu dzikiego *Saccharomyces cerevisiae* podobna i przedstawia się następująco: PC (34—41%), PE (19—34%), PI (8—26%), PS (3—10%) [5]. Kardiolipina (CL), fosfolipid charakterystyczny dla wewnętrznej błony mitochondrialnej (13%), jest obecna również w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (5%), a także w nieznacznym procencie w innych błonach.

Skład podłoża wzrostowego i warunki hodowli drożdży, takie jak natlenienie i temperatura, w wyraźny sposób wpływają na zawartość ergosterolu (sterolu charakterystycznego dla błon drożdżowych) i fosfolipidów w błonach mitochondrialnych. Całkowicie dojrzałe mitochondria z komórek drożdży rosnących w warunkach tlenowych zawierają znaczne ilości ergosterolu [6]. Natomiast promitochondria wykazują niższą zawartość ergosterolu, PE i CL, a wyższą PI, PS i PC. Mitochondria termofilnych (cieplolubnych) szczepów drożdży rosnących w temperaturze 25 do 45°C, na przykład *Torulopsis bovina*, są bardzo bogate w CL (25%), z wyjątkiem szczepu *Candida slooffii*, który nie posiada w ogóle tego fosfolipidu przy równocześnie zwiększonych ilościach PI, PS i PA [7]. Szczep ten charakteryzuje się upośledzonym oddychaniem i brakiem oksydazy cytochromu c, której aktywność zależy od obecności CL. W mutantach „petite” z upośledzonym oddychaniem [8] obserwowano podobne zmiany w składzie fosfolipidów, chociaż zawartość CL nie była w nich aż tak zredukowana, jak u szczepu *C. slooffii*. Mitochondria szczepów psychrofilnych (wilgociolubnych) rosnących w temperaturze -2 do +20°C, takich jak *Leucosporidium frigidum* i *Leucosporidium nivalis*, wykazują zwiększoną PE (43%) w stosunku do oznaczonej w mitochondriach komórek szczepu dzikiego. Sugeruje się, że grupa aminowa PE tworzy wiązania wodorowe z polarnymi cząsteczkami wody uniemożliwiając w ten sposób powstawanie w błonach punktów zamarzania. Używając do badań szczepu *S. uvarum* rosnącego na podłożu bez inozytolu zaobserwowano zmiany w fosfolipidowym składzie obydwu błon mitochondrialnych i obniżenie stosunku masy fosfolipidów do masy białek o około 12—14%. Jest to spowodowane zmniejszeniem ilości PI i CL, a tylko częściowym zwiększeniem zawartości pozostałych fosfolipidów [9]. W innej pracowni wykazano, że stosunek masy fosfolipidów do masy białek zmienia się nieznacznie w obydwu błonach mitochondrialnych auktotrofa drożdży *ino 1—16* (H o h e n g a s s e r i w s p ó ł p r., dane niepublikowane, cytowane w/g [5]) rosnącego na podłożu bez inozytolu. W mitochondriach tego auktotrofa zmniejszenie zawartości PI jest kompensowane zwiększeniem ilości PE.

Procentowa zawartość steroli w zewnętrznej i wewnętrznej błonie mitochondrialnej *S. cerevisiae* jest odmienna w stosunku do oznaczonej w komórkach innych organizmów. Badania wykonane przy użyciu preparatów błonowych izolowanych z komórek auktotrofów wyselekcjonowanego szczepu drożdży *erg 11-sp 3* (H o h e n g a s s e r i w s p ó ł p r., dane niepublikowane, cytowane w/g [5] z mutacją prowadzącą do znacznego obniżenia zawartości steroli (25—30% w stosunku do kontroli) wykazały, że ilość ergosterolu w wewnętrznej błonie mitochondrialnej jest zdecydowanie większa niż w błonie zewnętrznej. Zastosowane ostatnio [10, 11] metody enzymatycznej degradacji fosfolipidów przez

fosfolipazy i chemicznej modyfikacji za pomocą kwasu trinitrobenzenosulfonowego (TNBS) (patrz artykuł przeglądowy [12]) umożliwiły stwierdzenie asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej obydwu błon mitochondrialnych. Wyniki tych badań ilustruje rycina 1.



**Ryc. 1.** Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów w błonach mitochondriów komórek drożdży [9, 10]. Objaśnienia skrótów: IM — błona wewnętrzna; OM — błona zewnętrzna; w — listek wewnętrzny dwuwarstwowy lipidowej błony; z — listek zewnętrzny; PC — fosfatydylocholina; PI — fosfatydyloinozytol; CL — kardiolipina; PS — fosfatydyloseryna; PE — fosfatydyloctanoloamina.

Odmienność obydwu błon mitochondrialnych wykazano badając ich płynność przy użyciu sondy fluorescencyjnej, difenylheksatrienu. Błona zewnętrzna charakteryzująca się niższym współczynnikiem ergosterol/fosfolipidy (0, 021) i wyższym współczynnikiem fosfolipidy/białka (1, 20) wykazuje niższą anizotropię (a więc większą ruchliwość lipidów) w stosunku do błony wewnętrznej charakteryzującej się znacznie wyższym współczynnikiem ergosterol/fosfolipidy (0, 070) [10].

## II-2. Drogi biosyntezy fosfolipidów w komórkach drożdży i ich regulacja

Szlaki metaboliczne głównych fosfolipidów w komórkach drożdży przedstawiono na rycinie 2. Droga biosyntezy PS w komórkach drożdży wyróżnia je spośród innych organizmów eukariotycznych. Fosfolipid ten syntetyzowany jest z wykorzystaniem CPD-DG jako pośrednika zarówno w mikrosomach jak i mitochondriach [13, 14]. Potwierdzono to w badaniach *in vitro* z użyciem [<sup>32</sup>P]-CDP-DG i zimnej L-seryny [15], podobnie jak w komórkach innych grzybów i bakterii [16—21]. Natomiast w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych, PS syntetyzowana jest głównie w reakcjach wymiany zasady zachodzących z udziałem endogennych PC i PE oraz L-seryny (Ryc. 2, patrz artykuł przeglądowy [12]). W komórkach zwierzęcych PS może powstawać również w reakcji wykorzystującej kwas 1, 2-diacylglicerolopirofosfatydowy [22] (Ryc. 2). Jest on substratem enzymu, wrażliwego na inhibitory grup -SH, przenoszącego resztę wolnej L-seryny. Czy reakcja ta zachodzi w komórkach



drożdży nie jest wiadomo. Ostatnio stwierdzono [23], że mikrosomy wątroby szczura wykorzystują CDP-S jako pośrednik do biosyntezy różnych rodzajów molekularnych PS (Ryc. 2). Oznacza to, że w wytworzonej już inną drogą PS następuje wymiana kwasów tłuszczowych w wyniku przemian odmiennych niż powszechnie spotykane reakcje deacylacji przy udziale fosfolipaz i reacylacji przy udziale specyficznych acylotransferaz. Czy w biosyntezie PS komórek drożdży, podobnie jak w organizmach wyższych może być wykorzystywana CDP-S zgodnie z zaproponowaną przez Infantego hipotezą [24] pozostaje kwestią otwartą.

PE i PC są syntetyzowane w endoplazmatycznym retikulum komórek drożdży głównie drogą opisaną przez Kennedy'ego z udziałem odpowiadających im CDP-pochodnych [13, 14], analogicznie jak w komórkach wielu bakterii. W komórkach Eukarionta wyższych ewolucyjnie oprócz szlaku wymienionego powyżej PE i PC mogą powstawać w wyniku reakcji wymiany zasad [12]. W mitochondriach komórek drożdży, podobnie jak u wyższych Eukarionta, zachodzi dekarboksylacja PS do PE. Stopniową metylację PE, tak samo jak u organizmów wyższych ewolucyjnie, katalizują enzymy obecne w frakcji mikrosomalnej.

CL syntetyzowana jest *de novo* w mitochondriach drożdży [14], tak jak w komórkach zwierzęcych z CDP-DG w sekwencji reakcji podanych na rycinie 2. Natomiast PI powstaje w mitochondriach i mikrosomach drożdży [25], podczas gdy w komórkach ssaków tylko w mikrosomach.

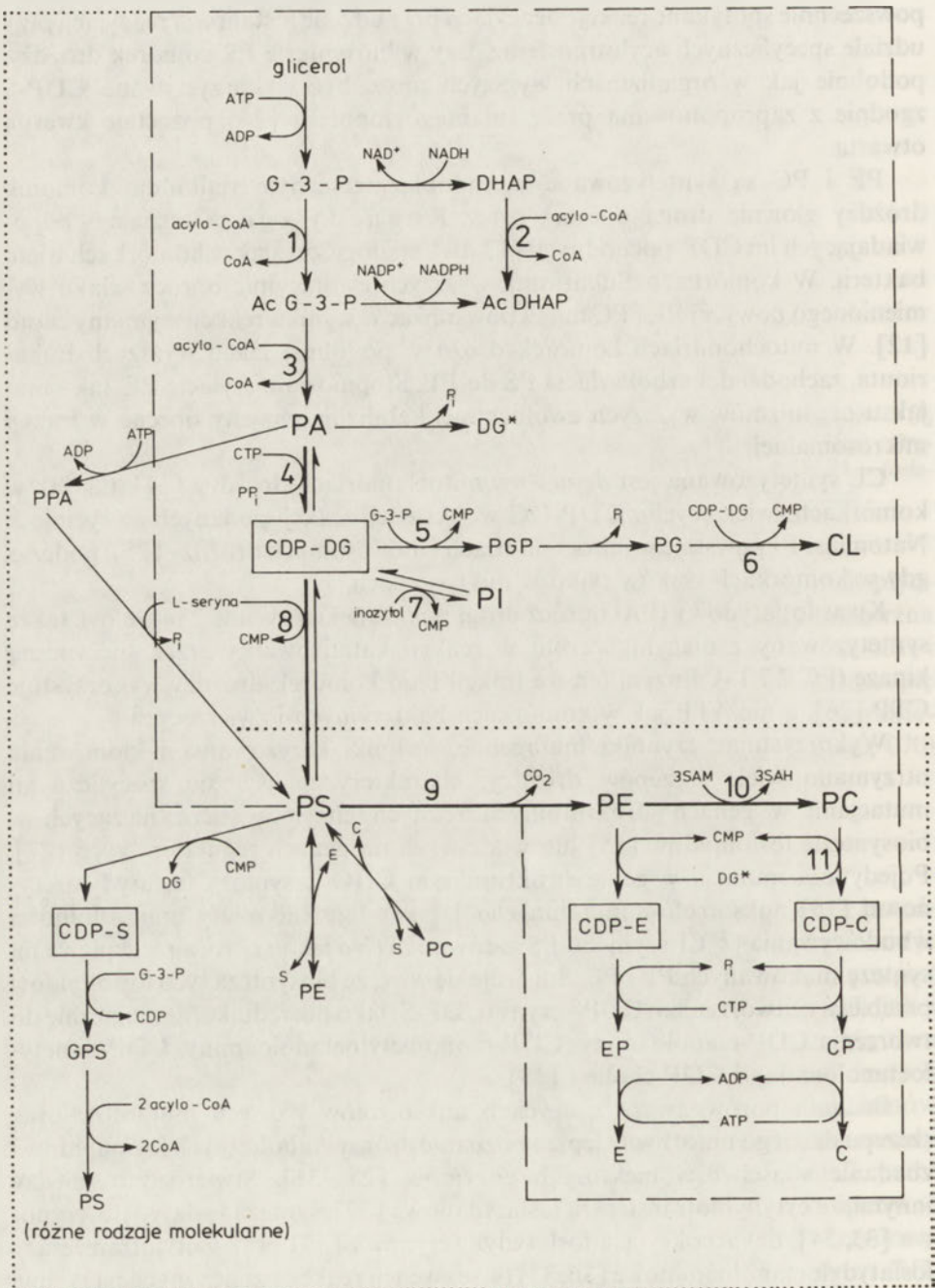
Kwas fosfatydowy (PA) oprócz drogi pokazanej na rycinie 2 może być także syntetyzowany z diacyloglicerolu w reakcji katalizowanej przez specyficzną kinazę (EC 2.7.1.-). Enzym ten we frakcji błon komórek drożdży wykorzystuje CTP [26], a nie ATP jak w komórkach bakteryjnych i zwierzęcych.

Wykorzystując czynniki mutagenne, techniki krzyżowania i klonowania otrzymano wiele szczepów drożdży, charakteryzujących się specyficznymi mutacjami w genach strukturalnych różnych enzymów uczestniczących w biosyntezie fosfolipidów [15] lub właściwych im genach regulatorowych [27]. Pojedyncza mutacja w genie strukturalnym CHO 1 syntazy fosfatydyloserynowej [15] auktrotrofów mutanta *cho 1* powoduje całkowity brak zdolności wbudowywania [<sup>14</sup>C]seryny do PS zarówno *in vivo* jak *in vitro*, a nie wpływa na syntezę znakowanych PE i PC. Sugeruje się więc, że biosynteza tych fosfolipidów przebiega z utworzeniem CDP-seryny (CDP-S) jako pośrednika, analogicznie do tworzenia CDP-etanolaminy, CDP-monometyloetanoloaminy, CDP-dimetyloetanoloaminy i CDP-choliny [15].

Badania porównawcze z użyciem auktrotrofów różnych mutantów oraz szczepu dzikiego umożliwiły lepsze poznanie dróg metabolicznych fosfolipidów i zbadanie właściwości niektórych enzymów [28—31]. Stwierdzono między innymi, że cytydyliotransferaza fosfatydanowa [32], syntaza fosfatydyloserynowa [33, 34], dekarboksylaza fosfatydyloserynowa [35] oraz metylotransferazy fosfatydyloetanoloaminowe [36, 37] (w sekwencji reakcji oznaczonych na rycinie 2 grubymi strzałkami) są regulowane kompleksowo [38]. W komórkach szczepu



dzikiego hodowanych na podłożu wzrostowym wzbogaconym w wolne aminoalkohole: etanolaminę, L-serynę i jej strukturalne analogi D-serynę, glicynę, L-cysteinę enzymy te ulegają represji (jednocześnie obniża się ich aktywność)



Ryc. 2. Objasnienie na str. 35

tylko w obecności inozytoli lub derepresji w jego nieobecności. Sama L-seryna dodana do podłoża nie powoduje w błonach tych komórek zmiany składu fosfolipidowego. Nieobecność jednego z aminoalkoholi w podłożu i dodanie inozytoli powoduje częściową represję omawianych wyżej enzymów. W tych warunkach inozytol podany wraz z etanolaminą, choliną [34, 39] lub L-seryną [38] nie wpływa na aktywność enzymu 3-fosfatydylotransferaza CDP-diacyloglicerol — inozytol (EC 2.7.8.11). W obecności inozytoli ulega natomiast represji w komórkach szczepu dzikiego syntaza *mio*-inozytolo-1-fosforanowa (EC 5.5.1.4) [40]. Produkt jej reakcji po zdefosforylowaniu służy do syntezy PI. W celu wyjaśnienia mechanizmu działania inozytoli na aktywność enzymów syntezy PS, PE i PC wyselekcjonowano kilka mutantów regulatorowych biosyntezy inozytoli. Są to szczepy: *ino 2*, *ino 4* — wykazujące uszkodzenie genów *INO 2*, *INO 4*, których natywne produkty stymulują ekspresję syntazy *mio*-inozytolo-1-fosforanowej oraz szczep *opi 1* — z uszkodzonym genem *OPI 1*, produkty którego hamują ekspresję tego enzymu. W komórkach omawianych mutantów, enzymy szlaku biosyntezy PC wykorzystujące CDP-DG jako substrat wyjściowy (rycina 2, droga oznaczona grubymi strzałkami) nie są regulowane. Sugeruje się, że represja enzymów przez inozytol wraz z L-seryną zależy od syntezy inozytoli. Ani inozytol ani L-seryna, ani ich mieszanina nie wpływają bezpośrednio na aktywność oczyszczonych do homogenności enzymów [38]: cytydyliotransferazy fosfatydanowej (Kelly i Carman, cytowane według [38]), syntazy fosfatydoserynowej [41] i 3-fosfatydylotransferazy CDPdiacyloglicerol-inozytol [42]. Zastosowanie techniki immunoblotingu z użyciem poliklonalnych przeciwciał wykazało, że inozytol wraz z L-seryną regulują syntezę wymienionych enzymów. Ekspresja genów kodujących poszczególne enzymy jest kontrolowana przez wspólny mechanizm regulatorowy [43]. W komórkach szczepu dzikiego i mutantach *ino 2*, *ino 4*, *opi 1*, *cho 1* aktywność syntazy fosfatydoserynowej jest zależna od ilości kopii określonego fragmentu mRNA [44].

**Ryc. 2.** Drogi metaboliczne fosfolipidów w komórkach drożdży. Linia przerywaną (— — — —) oznaczono drogi biosyntezy fosfolipidów w komórkach drożdży; linią kropkowaną (.....) oznaczono drogi biosyntezy fosfolipidów w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych; ramkami objęto kluczowe pośredniki w biosyntezie fosfolipidów. Skróty: G-3-P — *sn*-glicerolo-3-fosforan; DHAP — fosfodihydroksyaceton; AcDHAP — acylofosfodihydroksyaceton; AcG-3-P — monoacyloglicerol-3-fosforan; PA — kwas fosfatydowy; PPA — kwas 1,2-diacylpirofosfatydowy; DG\* — diacyloglicerol powstający w wyniku defosforylacji kwasu fosfatydowego jest wykorzystywany w biosyntezie PE i PC drogą Kennedy'ego; CDP-DG — cytydynodwufosforan diacyloglicerolu; PGP — fosfatydylglicerofosforan; PG — fosfatydylglicerol; CL — kardiolipina; PI — fosfatydylinozytol; PS — fosfatydoseryna; PE — fosfatydyltoetanolamina; PC — fosfatydylcholina; SAM — S-adenozylometionina; SAH — S-adenozylhomocysteina; CDP-E — cytydynodwufosforan etanolaminy; CDP-C — cytydynodwufosforan choliny; CDP-S — cytydynodwufosforan seryny; EP — fosforyloetanolamina; CP — fosforylocholina; E — etanolamina; S — L-seryna; C — cholina; GPS — glicerofosforyloseryna; CoA — koenzym A.

### II-3. Lokalizacja głównych enzymów szlaków metabolicznych fosfolipidów w komórce

Jak opisano w podrozdziale II-2 reakcje biosyntezy fosfolipidów zachodzą w drożdżach w endoplazmatycznym retikulum i w mitochondriach. Niektóre procesy, jak dekarboksylacja PS i synteza CL zachodzą wyłącznie w mitochondriach inne, jak reakcja metylacji PE wyłącznie w endoplazmatycznym retikulum.

Względą aktywność enzymów oraz ich rozmieszczenie w płaszczyźnie poprzecznej błon przedstawiono odpowiednio w tabeli 1 i na rycinie 3. Jak widać w tabeli 1, pewne enzymy, między innymi acylotransferazy fosforanu dihydroksyacetonu i glicerofosforanowa oraz syntaza fosfatydyloserynowa są bardziej aktywne w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, aniżeli w endoplazmatycznym retikulum. Lokalizację w płaszczyźnie poprzecznej błon (Ryc. 3) dwóch ostatnich enzymów, a także dekarboksylazy fosfatydyloserynowej i innych ustalono w wyniku proteolizy natywnych mitochondriów, mitochondriów pozbawionych błony zewnętrznej i prawidłowo zorientowanych pęcherzyków uzyskanych po fragmentacji błony zewnętrznej [3]. W przypadku pęcherzyków wskaźnikiem dla prawidłowej ich orientacji była obecność białka o względnym ciężarze molekularnym 70-kDa (jednego z 10 charakterystycznych białek błony zewnętrznej) w listku zewnętrznym dwuwarstwy lipidowej błony, wykazana przy użyciu specyficznych przeciwciał [45]. Spośród enzymów zaangażowanych w metabolizm fosfolipidów serynowych, syntazę fosfatydyloserynową zlokalizowano w listku zewnętrznym dwuwarstwy lipidowej błony zewnętrznej, a enzym dekarboksylujący w zewnętrznym listku błony wewnętrznej.

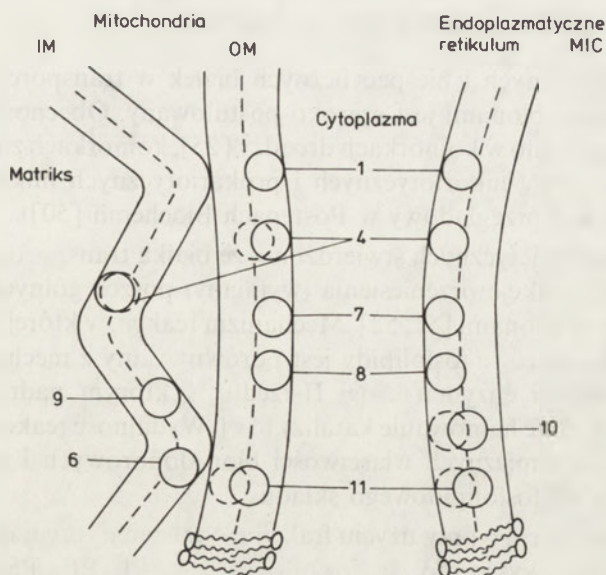
Tabela 1

Rozmieszczenie w komórkach drożdży enzymów biorących udział w syntezie fosfolipidów

Numer reakcji	Nazwa enzymu	Numer EC	Aktywność enzymu*		
			IM	OM	MIC
1.	acylotransferaza glicerofosforanowa	2.3.1.15	—	+++	++
2.	acylotransferaza fosforanu dihydroksyacetonu	2.3.1.42	—	+++	+
3.	acylotransferaza acyloglicerofosforanowa	2.3.1.—	—	+	++
4.	cytydyliltransferaza fosfatydanowa	2.7.7.41	++	++	+
5.	fosfatydylotransferaza glicerofosforanowa	2.7.8.5	+++	—	+
6.	glicerofosfotransferaza CDP-glicerolowa	2.7.8.12	+++	—	—
7.	3-fosfatydylotransferaza CDP-diacyloglicerol-inozytol	2.7.8.11	—	+++	++
8.	syntaza fosfatydyloserynowa	2.7.8.8.	—	+++	++
9.	dekarboksylaza fosfatydyloserynowa	4.1.1.65	+++	—	—
10.	metylotransferaza fosfatydyloetanoloaminowa	2.1.1.17	—	—	+++
11.	fosfotransferaza cholinowa	2.7.8.2	—	++	++

\* + + +, wysoka aktywność specyficzna; + +, średnia; +, niska; —, brak aktywności. IM — błona wewnętrzna, OM — błona zewnętrzna, MIC — endoplazmatyczne retikulum. Numery reakcji zamieszczone w pierwszej kolumnie tabeli są zgodne z podanymi na rycinie 2.





**Ryc. 3.** Wewnątrzkomórkowa i wewnątrzmitochondrialna lokalizacja enzymów syntetyzujących fosfolipidy w komórkach drożdży [3, 5]. IM — błona wewnętrzna; OM — błona zewnętrzna. Numery podane na rycinie odpowiadają zamieszczonym w tabeli 1 enzymom. W przypadku enzymów 4, 10 i 11 nie udało się w pełni określić ich lokalizacji w płaszczyźnie poprzecznej badanej błony. Być może są to białka integralne, stąd oznakowanie kółkami pełnymi i przerywanymi.

Na podstawie badań kinetycznych stwierdza się, że enzymy występujące zarówno w endoplazmatycznym retikulum jak i w mitochondriach komórek drożdży mają bardzo podobne właściwości i mogą być uważane za izoenzymy [3].

### III. Mechanizmy transportu fosfolipidów w drożdżach

W komórkach drożdży (Daum G., dane niepublikowane, cytowane według [3]) wykazano, że syntetyzowana *in vivo* w endoplazmatycznym retikulum drogą metylacji PC szybko wbudowuje się do błon mitochondrialnych. Podobnie PE powstająca drogą dekarboksylacji PS w wewnętrznej błonie mitochondrialnej szybko pojawia się w endoplazmatycznym retikulum. Te dwie obserwacje sugerują przemieszczanie się fosfolipidów w obrębie błony i między błonami (dla zapewnienia im stanu równowagi). Inne błony komórek drożdży, takie jak wakuole, jądro i błony plazmatyczne nie syntetyzują fosfolipidów. Lipidowe składniki są im dostarczane z endoplazmatycznego retikulum, mitochondriów lub obydwu organelli. Istnieją obecnie trzy hipotezy wyjaśniające przemieszczanie się fosfolipidów. Będą one omówione w kolejnych podrozdziałach.

### III-1. Transport fosfolipidów z udziałem białek transportujących

Udział specyficznych i niespecyficznych białek w transporcie fosfolipidów pomiędzy różnymi błonami jest szeroko postulowany. Obecność białek transportujących wykazano w komórkach drożdży [25], komórkach zwierzęcych [46, 47], roślinnych [48], eukariotycznych i prokariotycznych mikroorganizmach [49] (patrz artykuł przeglądowy w Postęпах Biochemii [50]).

W badaniach kinetycznych stwierdzono, że białka transportujące katalizują dwukierunkową reakcję przeniesienia (wymiany) poszczególnych fosfolipidów pomiędzy dwiema błonami [51, 52]. Mechanizm reakcji, w której substratami są donorowe i akceptorowe fosfolipidy jest porównywalny z mechanizmem dwu-substratowej reakcji enzymatycznej II-rzędu, w którym nadmiar jednego z substratów powoduje hamowanie katalizy [51]. Wydajność reakcji przeniesienia zależy od fizykochemicznych właściwości błon donorowych i akceptorowych wynikających z ich fosfolipidowego składu.

W badaniach *in vitro* przy użyciu frakcji cytoplazmatycznej otrzywanej z komórek drożdży wykazano, że fosfolipidy: PA, PI, PE, PS, PC i CL są transportowane w następującym stosunku 2,7 : 2 : 2 : 1,3 : 1 : 1 [53]. Wyizolowano i zbadano właściwości niespecyficznego cytosolowego białka transportującego PC i PI [53] (o ciężarze molekularnym 35 kDa, pl 4,6). Badając transport znakowanych pyrenem fosfolipidów z błon donorowych pęcherzyków do nieznakowanych błon pęcherzyków akceptorowych potwierdzono, że cytoplazmatyczne białko transportujące (oczyszczone 3000 razy) przenosi głównie PC, a w mniejszym stopniu PI [54]. Niskie stężenia PI hamują zależny od białka transport PC prawdopodobnie w wyniku współzawodnictwa o miejsce wiążące. Podobnie, PE, PS i PA mimo, że nie są transportowane przez to białko, hamują reakcję przeniesienia PC.

Ostatnio w innej pracowni wyizolowano i oczyszczono z komórek drożdży 2 białka transportujące o podobnym ciężarze molekularnym około 33,4 kDa, ale różniące się punktem izoelektrycznym 6,3 i 6,1 [55, 56]. Białko o pl 6,3 może ulegać ograniczonej proteolizie (degradacji ulegają niektóre reszty asparaginowe lub glutaminowe). W wyniku opisanych przemian powstaje białko o pl 6,1. Używając jako donorowych dużych, jednowarstwowych liposomów zbudowanych z PC, PE, PI i PS w stosunkach molarnych 4 : 3 : 2 : 1 i zawierających jeden z tych fosfolipidów piętnowany oraz jako akceptorowych, liposomów wielowarstwowych zbudowanych z fosfolipidów w tych samych proporcjach ale nieznakowanych, wykazano identyczną specyficzność substratową obydwu białek [56]. Ich specyficzność względem przenoszonych fosfolipidów jest następująca: PC > PE > PI > PS. Proporcjonalnie w stosunku do zawartości w liposomach donorowych przenoszone są tylko PC i PI. Widać więc, że skład liposomów donorowych i akceptorowych jest czynnikiem ograniczającym transport fosfolipidów. W przypadku obecności PE wraz z PI lub PS w wielowarstwowych pęcherzykach akceptorowych możliwe jest utworzenie mię-

dzy ich powierzchnią a białkiem kompleksu warunkującego przeniesienie fosfolipidów z liposomów donorowych.

Zdolność omawianych białek do katalizowania transportu fosfolipidów między błonami naturalnymi i sztucznymi sugeruje, że odgrywają one tę samą rolę *in vivo* w komórce.

Wykazano, że aktywność białka transportującego fosfolipidy zależy zarówno od stadium rozwoju drożdży jak i źródła metabolizowanego węgla. Aktywność białka transportującego w komórkach drożdży hodowanych na podłożu z glukozą jest znacznie niższa w stosunku do oznaczonej w komórkach hodowanych na podłożu z glicerolem (w tych samych stadiach wzrostu komórek). Być może inny skład podłoża wzrostowego, w tym obecność mleczanu [53], bądź glukozy lub glicerolu [55, 56], jest przyczyną odmiennych właściwości izolowanych w różnych pracowniach białek transportujących fosfolipidy.

Obserwowany *in vitro* spontaniczny transport fosfolipidów pomiędzy błonami zachodzi wolniej niż przy udziale białka transportującego. Wykazano jednak [57], że strukturalny analog PC, fosfatydylopropylo-N,N-dimetyloetanolamina, która nie jest transportowana przez białko transportujące fosfolipidy przemieszcza się szybciej *in vivo* między endoplazmatycznym retikulum a mitochondriami niż wskazuje na to jej wolny transport spontaniczny *in vitro*.

### III-2. Transport fosfolipidów drogą dyfuzji lateralnej

W mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej komórek drożdży (a także w matriks) (D a u m G., dane niepublikowane cytowane według [5]) nie stwierdzono obecności białka transportującego fosfolipidy. Oprócz transportu spontanicznego inną możliwością przenoszenia fosfolipidów jest dyfuzja lateralna w płaszczyźnie poprzecznej w miejscu kontaktowym. Wykazano występowanie przejściowych (joining) i stałych (tight junction) miejsc kontaktowych pomiędzy obiema błonami mitochondrialnymi [45]. Używając w doświadczeniach *in vitro* znakowanej seryny i stosując metodę lokalizacji fosfolipidów przy użyciu TNBS odnajdowano nowosyntetyzowaną radioaktywną PS w wewnętrznym listku zewnętrznej błony natywnych mitochondriów [58]. Fosfolipid ten przenoszony jest następnie do błony wewnętrznej, gdzie ulega dekarboksylacji do PE. Utworzoną PE znajdowano w listku zewnętrznym błony zewnętrznej, co świadczy o przechodzeniu lipidu przez miejsca "tight junction". W przypadku mitochondriów poddanych warunkom szoku osmotycznego [59] radioaktywna PE pojawia się we fragmentach błony zewnętrznej (obecność których wykazano stosując przeciwciała przeciwko porynie A) ściśle przylegających do błony wewnętrznej. Używając tego samego materiału biologicznego stwierdzono, że wchodzące w skład pęcherzyków liposomalnych znakowane PC i PI przemieszczają się bez udziału białka transportującego przez błonę zewnętrzną w miejscach "tight junction" do błony wewnętrznej [59].



Pozamitochondrialny transport fosfolipidów i jego mechanizm omówiony będzie w następnym podrozdziale.

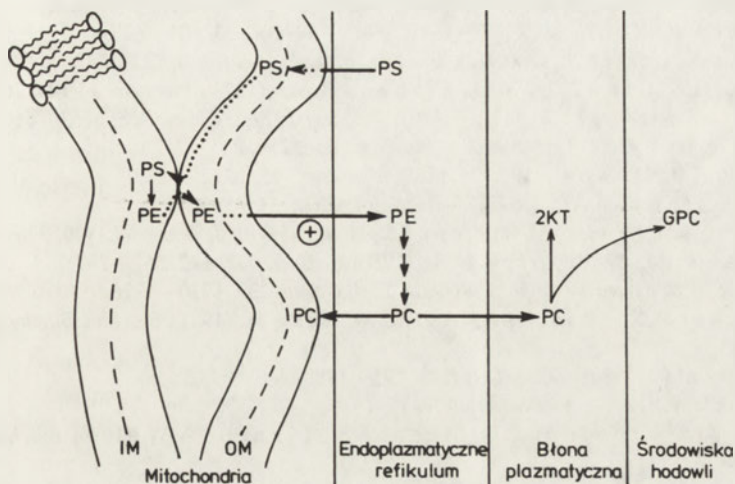
### III-3. Pęcherzyki lipidowe jako forma transportu

W doświadczeniach *in vivo* [60] przy użyciu komórek szczepu dzikiego drożdży, którym do podłoża podawano pulsowo [ $^3\text{H}$ ]serynę wykazano, że radioaktywna PS powstaje w endoplazmatycznym retikulum i mitochondriach, ale tylko w mitochondriach jest dekarboksylowana do [ $^3\text{H}$ ]PE. Suma radioaktywnej PE pojawiającej się w endoplazmatycznym retikulum i utworzonej z niej PC jest miarą przeniesienia nowosyntetyzowanej PE z miejsca syntezy do miejsca metylacji. Z kolei ilość radioaktywnej PC powstającej wyłącznie w endoplazmatycznym retikulum z podanej komórkom [metylo- $^3\text{H}$ ] metioniny umożliwiła określenie wydajności transportu tego fosfolipidu do mitochondriów.

Badając transport fosfolipidów w komórkach drożdży wyjaśniono, że jest to proces zależny od energii [60]. Po krótkiej, 10 min inkubacji komórek z radioaktywną seryną, choliną bądź metylometioniną hamowano przepływ elektronów w łańcuchu oddechowym podając mieszaninę  $\text{CN}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{N}_3^-$  (w stężeniach 5 mM każdy) i kontynuując inkubację w czasie do 90 min. Wykazano, że ilość radioaktywnej PS, w przypadku podanej znakowanej seryny, zwiększa się w czasie zarówno w mitochondriach jak i mikrosomach. Jest to trudne do wytłumaczenia biorąc pod uwagę, że w komórkach drożdży nie zachodzi reakcja wymiany seryny. Równocześnie ilość piętnowanej PE w mitochondriach wzrasta, gdyż dekarboksylaza fosfatydyloserynowa nie wymaga dostarczania energii (ATP). Natomiast zawartość PE w mikrosomach utrzymuje się na stałym poziomie, co świadczy o zablokowaniu jej przemieszczania się między organelami w komórce. Dodanie mieszaniny  $\text{CN}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{N}_3^-$  hamując syntezę PC w endoplazmatycznym retikulum. Z obniżenia specyficznej radioaktywności mikrosomalnej PC i równoległego zwiększenia mitochondrialnej PC, autorzy [60] wnioskują o przeniesieniu tego fosfolipidu między organelami w warunkach zablokowanego mitochondrialnego łańcucha oddechowego.

W komórkach drożdży, podobnie jak w wyższych Eukarionta, fosfolipidy obecne w błonach plazmatycznych pochodzą z błon wewnątrzkomórkowych. W badaniach *in vivo* [60] komórki mutanta drożdży *sec 18* [61] (charakteryzującego się wytwarzaniem dużych pęcherzyków błonowych zawierających białka i lipidy) i odpowiadającego im szczepu dzikiego (*S. cerevisiae* X 2810-1 A) hodowano w obecności [ $^3\text{H}$ ]I. Wykazano, że przeniesienie komórek z temperatury permissywnej (23°C) do restrykcyjnej (37°C) hamuje przepływ pęcherzyków uczestniczących w sekrecji białek, ale nie wpływa na transport fosfolipidów: PC i PI do błon plazmatycznych. Ich przejście z przedziałów wewnątrzkomórkowych do błon plazmatycznych mierzy się pośrednio metodą oznaczania uwalnianych, do podłoża, znakowanych glicerofosfosfocholiny i glicerofosfoinozytolu. Te fosfodiestry powstają w wyniku deacylacji PC i PI katalizowanej przez fosfolipazę B ( $\text{A}_1$ ) obecną w warstwie zewnętrznej błony

plazmatycznej [62]. Ponieważ radioaktywność odnajdowana w podłożu hodowlanym pochodzi ze znakowanych PC i PI obecnych w błonach plazmatycznych, można wnioskować o przeniesieniu tych fosfolipidów z błon wewnątrzkomórkowych (miejsca syntezy) do błon plazmatycznych (miejsca ich deacylacji).



**Ryc. 4.** Międzybłonowy transport fosfolipidów w komórkach drożdży [59, 60]. Za pomocą ⊕ oznaczono zależny od ATP transport pęcherzyków zawierających PE z donorowych błon mitochondrialnych. Linia kropkowaną oznaczono transport fosfolipidów w obrębie warstwy monomolekularnej w miejscu "tight junction" (dyfuzja lateralna) lub w dwuwarstwie (angielski termin: flip-flop). KT — kwasy tłuszczowe; pozostałe oznaczenia jak na rycinach 1 i 2.

Na podstawie przedstawionych wyżej wyników, a także innych zaproponowano następujący schemat transportu fosfolipidów w komórkach drożdży [59, 60] (Ryc. 4). Zakłada on zależne od energii przemieszczanie się PE pomiędzy zewnętrzną błoną mitochondrialną a endoplazmatycznym retikulum. Transport innych fosfolipidów (PS, PC) pomiędzy błonami odbywa się przy udziale białek transportujących bądź drogą dyfuzji lateralnej. Transport PE za pośrednictwem pęcherzyków lipidowych wydaje się być jedyną z możliwych dróg, biorąc pod uwagę niezależność od energii (ATP) funkcjonowania białek transportujących fosfolipidy w komórce.

Artykuł otrzymano 8 lipca 1988 r.  
Zaakceptowano do druku 7 września 1988 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Dennis E.A., Kennedy E.P., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 263—267.
2. Hostetler K.Y., van den Bosch H., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 380—386.
3. Kuchler K., Daum G., Paltauf F., (1986), *J. Bacteriol.*, **165**, 901—910.
4. Daum G., Böhni P.C., Schatz G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13028—13033.
5. Daum G., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 1—42.

6. Paltauf F., Schatz G., (1969), *Biochemistry*, **8**, 335—339.
7. Arthur H., Watson K., (1976), *J. Bacteriol.*, **128**, 56—68.
8. Jonah M., Erwin J.A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 80—92.
9. Bednarz-Prashad J.A., Mize C.E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 4178—4186.
10. Sperka-Gottlieb C.D.M., Hermetter A., Paltauf F., Daum G., (1988), FEBS Advanced Course "Lipid Flow" Maria Alm, Austria, Abstracts.
11. Daum G., — FEBS Advanced Course "Lipid Flow" — informacja prywatna.
12. Jasińska R., Zborowski J., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 605—627.
13. Steiner S., Lester R.L. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 222—243.
14. Cobon G.S., Crowfoot P.D., Linnane A.W., (1974), *Biochem. J.*, **144**, 265—275.
15. Atkinson K., Fogel S., Henry S.A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6653—6661.
16. Sherr S., Byk C., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **239**, 243—247.
17. Larson T.J., Dowhan W., (1976), *Biochemistry*, **15**, 5212—5218.
18. Dutt A., Dowhan W., (1977), *J. Bacteriol.*, **132**, 154—165.
19. Langley K.E., Yaffe M.P., Kennedy E.P., (1979), *J. Bacteriol.*, **140**, 996—1007.
20. Carman G.M., Wieczorek D.S., (1980), *J. Bacteriol.*, **142**, 262—267.
21. Kanfer J., Kennedy E.P., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 1720—1726.
22. Pullarkat R.K., Sbaschnig-Agler M., Reha H., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **664**, 117—123.
23. Barańska J., (1988), *FEBS Lett.*, **228**, 175—178.
24. Infante J.P., (1984), *FEBS Lett.*, **170**, 1—14.
25. Cobon G.S., Crowfoot P.D., Murphy M., Linnane A.W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **441**, 255—259.
26. Szkopińska A., Nowak L., Świeżewska E., Palamarczyk G., (1988), *Arch. Biochem. Biophys.*, **266**, 124—131.
27. Kováč L., Gbelská I., Poliachová V., Šubík J., Kováčová Y., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **111**, 491—501.
28. Yamashita S., Oshima A., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 611—616.
29. Hasaka K., Yamashita S., (1980), *J. Bacteriol.*, **143**, 176—181.
30. Atkinson K.D., Jensen B., Kolat A.J., Storm E.M., Henry S.A., Fogel S., (1980), *J. Bacteriol.*, **143**, 558—564.
31. Nikawa J.-I., Yamashita S., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 420—426.
32. Homann M.J., Henry S.A., Carman G.M., (1985), *J. Bacteriol.*, **163**, 1265—1266.
33. Carson M.A., Atkinson K.D., Waechter C.J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8115—8121.
34. Klig L.S., Homann M.J., Carman G.M., Henry S.A., (1985), *J. Bacteriol.*, **162**, 1135—1141.
35. Carson M.A., Emala M., Hogsten P., Waechter C.J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6273—6297.
36. Waechter C.J., Lester R.L., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 401—410.
37. Yamashita S., Oshima A., Kawa J., Hasaka K., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **128**, 589—595.
38. Homann M.J., Bailis A.M., Henry S.A., Carman G.M., (1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 3276—3280.
39. Fischl A.S., Homann M.J., Poole M.A., Carman G.M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 3178—3183.
40. Donahue T.F., Henry S.A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7077—7085.
41. Bae-Lee M., Carman G.M., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 10857—10862.
42. Fischl A.S., Carman G.M., (1983), *J. Bacteriol.*, **154**, 304—311.
43. Henry S.A., Klig L.S., Loewy B.S., (1984), *Annu. Rev. Genet.*, **18**, 207—231.
44. Bailis A.M., Poole M.A., Carman G.M., Henry S.A., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 167—176.
45. Riezman H., Hay R., Gasser S., Daum G., Schneider G., Witte C., Schatz G., (1983), *EMBO J.*, **2**, 1105—1111.



46. Kader J.-C., Douady D., Mazliak P., (1982), w: *Phospholipids*, red. Hawthorne J. N., Ansell G. B., str. 279—311, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
47. Zilversmit D. B., (1984), w: *Methods in Enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N. O., t. 98, str. 565—573, Academic Press, New York.
48. Kader J.-C., (1985), *Chem. Phys. Lipids*, **38**, 51—62.
49. Tai S.-P., Kaplan S., (1985), *Chem. Phys. Lipids*, **38**, 41—50.
50. Zborowski J., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 101—109.
51. van den Basselaar A. M. H. P., Helmkamp G. M., Wirtz K. W. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1852—1858.
52. Helmkamp G. M., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 592—602.
53. Daum G., Paltauf F., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **784**, 385—391.
54. Szolderits G., Daum G., Hermetter A., Paltauf F., (1988), FEBS Advanced Course "Lipid Flow", Maria Alm, Austria, Abstracts.
55. Bozzato R. P., Tinker D. O., (1987), *Biochem. Cell. Biol.*, **65**, 195—202.
56. Bozzato R. P., Wooley D., Tinker D. O., (1978), *Biochem. Cell. Biol.*, **65**, 203—210.
57. Yaffe M. P., Kennedy E. P., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1497—1507.
58. Simbeni R., Paltauf F., Daum G., FEBS Advanced Course "Lipid Flow", Maria Alm, Austria, Abstracts.
59. Daum G., Paltauf F., (1988), FEBS Advanced Course "Lipid Flow", Maria Alm, Austria, (wykład).
60. Daum G., Heidorn E., Paltauf F., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **878**, 93—101.
61. Schekman R., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 243—246.
62. Kramer R., Kopp F., Niedermeyer W., Fuhrmann G. F., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 369—380.

46. Kozłowski, J. (1997) ...  
 47. Kozłowski, J. (1997) ...  
 48. Kozłowski, J. (1997) ...  
 49. Kozłowski, J. (1997) ...  
 50. Kozłowski, J. (1997) ...  
 51. Kozłowski, J. (1997) ...  
 52. Kozłowski, J. (1997) ...  
 53. Kozłowski, J. (1997) ...  
 54. Kozłowski, J. (1997) ...  
 55. Kozłowski, J. (1997) ...  
 56. Kozłowski, J. (1997) ...  
 57. Kozłowski, J. (1997) ...  
 58. Kozłowski, J. (1997) ...  
 59. Kozłowski, J. (1997) ...  
 60. Kozłowski, J. (1997) ...  
 61. Kozłowski, J. (1997) ...  
 62. Kozłowski, J. (1997) ...

ADAM GODZIK\*, GRZEGORZ BOGUTA\*\*, TOMASZ WESOŁOWSKI\*\*\*

## **Bazy danych w biochemii — zastosowanie do analizy oraz przewidywania cech i funkcji białek**

**Data bases in biochemistry — applications to analysis and prediction of protein properties and functions**

### *Spis treści*

- I. Wstęp
- II. Porównywanie sekwencji aminokwasowych białek, problem podobieństwa sekwencji
- III. Poszukiwanie zależności pomiędzy sekwencją aminokwasową a strukturą drugorzędową białek
- IV. Analiza i porównywanie struktur trzeciorzędowych białek
- V. Zastosowanie metod fizyki teoretycznej do analizy struktur białek
- VI. Uwagi końcowe

### *Contents*

- I. Introduction
- II. Comparison of protein aminoacid sequences, problem of sequence similarity
- III. Search for relations between aminoacid sequence and protein secondary structure
- IV. Analysis and comparison of tertiary protein structures
- V. Application of methods of theoretical physics to the analysis of protein structure
- VI. Concluding remarks

## **I. Wstęp**

Od kilku lat stało się możliwe konstruowanie nowych i modyfikowanie naturalnych enzymów w celu zmiany ich specyficzności czy zwiększenia stabilności lub aktywności. Zajmuje się tym nowo powstała dziedzina wiedzy, inżynieria białkowa, łącząca planowanie zmian właściwości białka z inżynierią genetyczną [1]. Dziś w tej dziedzinie, podobnie jak od kilkunastu lat w mikroelektronice, trwa intensywny wyścig naukowy, którego stawką jest opanowanie nowych technologii i łączące się z tym miliardowe zyski. Na przykład subtilizyna, enzym produkowany na skalę przemysłową i wykorzystywany w proszkach do prania, ulega denaturacji pod wpływem temperatury wyższej niż 60° C. Zwiększenie termostabilności subtilizyny, poprzez zaproponowanie

---

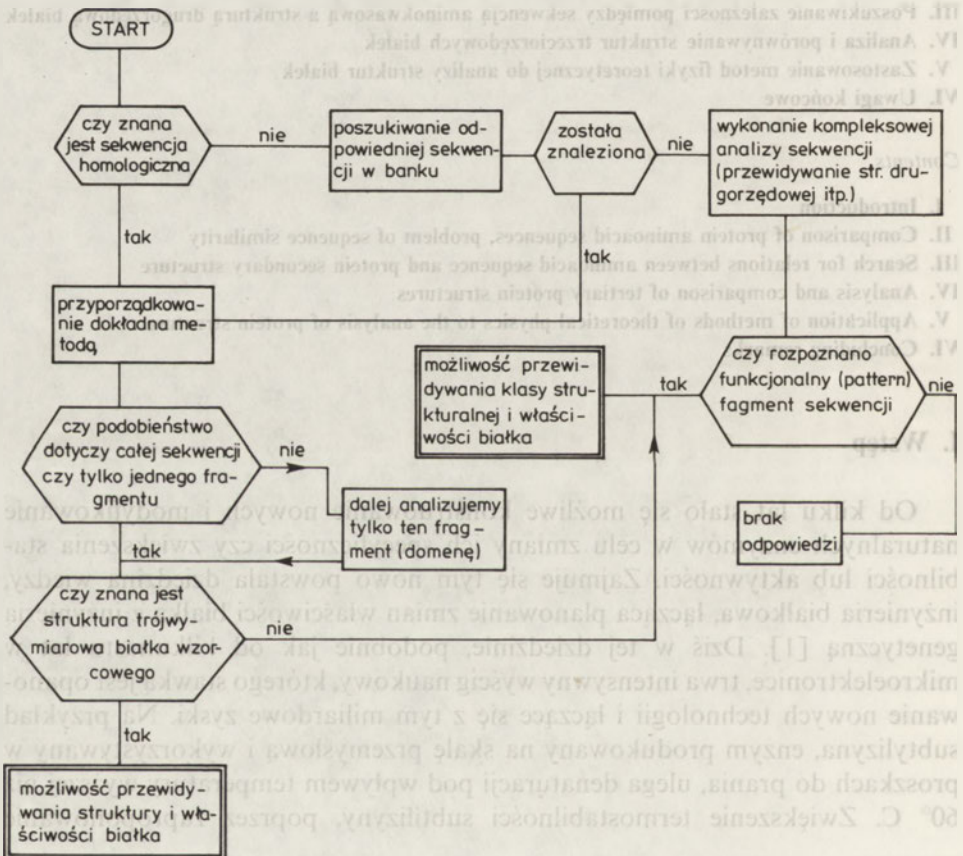
\*Mgr, \*\*dr, \*\*\*mgr, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa



odpowiednich mutacji, a następnie wprowadzenie ich do sekwencji aminokwasowej jest celem intensywnych prac kilku grup badawczych. [2].

Badania prowadzone w ostatnim trzydziestoleciu umożliwiły sformułowanie hipotezy, że sekwencja aminokwasowa białek decyduje o ich właściwościach i funkcji [3]. Dotychczas nie opracowano jednak żadnej metody przewidującej te właściwości wyłącznie w oparciu o informacje zawarte w sekwencji białka. Można sformułować ten problem w języku fizyki i rozwiązywać go przy pomocy praw obowiązujących w świecie molekularnym. Układ jest jednak niezmiernie skomplikowany, a rozwiązanie równań, które z tych praw wynikają jest niemożliwe na obecnym poziomie wiedzy i techniki komputerowej.

Współczesna biochemia zgromadziła ogromną ilość informacji o wielu białkach i analiza tych danych może dostarczyć potrzebnego narzędzia badawczego. Kiedy projektuje się mutację jakiegoś enzymu, można wykorzystać wnioski z analizy innego enzymu o podobnej funkcji, przenosząc pożądane cechy z jednego układu do drugiego. Formułuje się również wiele empirycznych reguł



Ryc. 1. Schemat postępowania przy analizie sekwencji, wzorowany na rycinie 10 z rozdziału XII książki "Nucleid acids and protein sequence analysis, a practical approach." [14].

łączących sekwencje i właściwości białek. Reguły te nie dając wyjaśnienia zadowolającego dla celów poznawczych, pozwalają jednak na przewidywanie skutków planowanych mutacji.

Analizę sekwencji białka rozpoczyna się zwykle od poszukiwania innych białek o podobnej sekwencji, które mają najprawdopodobniej analogiczne właściwości i funkcje. Gdy takie białka nie są znane, można korzystać z algorytmów przewidywania struktury drugorzędowej, identyfikacji szczególnych układów aminokwasów itd. Efektywna analiza jest możliwa jedynie wtedy, gdy informacje o sekwencjach aminokwasowych i właściwościach fizykochemicznych białek są łatwo dostępne w postaci tzw. komputerowych baz lub banków danych. Tworzeniem, a następnie stałym uaktualnieniem takich banków zajmują się wyspecjalizowane instytucje, np. National Institut of Health (NIH) i National Biomedical Research Foundation (NBRF) w Stanach Zjednoczonych oraz European Molecular Biology Laboratory (EMBL) w Europie.

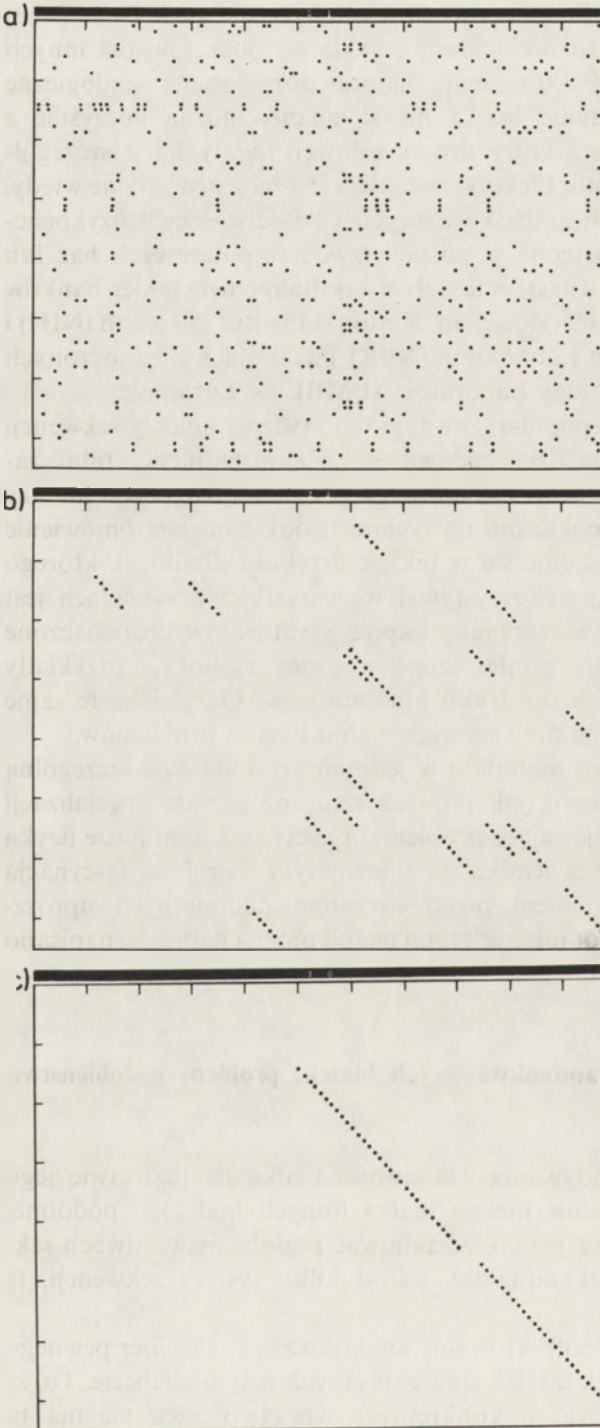
Celem tego artykułu jest spopularyzowanie teoretycznej analizy sekwencji białek jako efektywnego narzędzia badawczego. Zaprezentujemy tutaj zastosowanie rozmaitych metod do przykładowego problemu. Algorytm analizy sekwencji dowolnego białka pokazano na rycinie 1, dokładniejsze omówienie wymienionych tam metod znajduje się w tekście artykułu. Białkiem, którego sekwencję i strukturę będziemy wykorzystywali we wszystkich przykładach, jest zależne od witaminy D białko wiążące jony wapnia z jelit wołowych, oznaczone skrótem ICBP [4]. Wszystkie zamieszczone w pracy rysunki i przykłady pochodzą z przygotowywanych do druku prac autorów. Oczywiście te same techniki mogą być zastosowane przy rozwiązywaniu innych problemów.

Zebranie tak różnorodnego materiału w jednym artykule daje szczególną perspektywę — pozwala zobaczyć, jak poprzez sztuczne granice specjalizacji przebijają się autentyczne, pasjonujące problemy. Fascynacja nimi może fizyka zaprowadzić do biochemii, biochemika do informatyki. Niech ta fascynacja będzie naszym usprawiedliwieniem przed zarzutem nadmiernych uproszczeń — na temat każdej ze wspomnianych tutaj metod można napisać (i napisano już) niejedną monografię.

## **II. Porównywanie sekwencji aminokwasowych białek, problem podobieństwa sekwencji**

Pierwszym etapem przewidywania właściwości białka na podstawie jego sekwencji może być odnalezienie innego białka (innych białek) o podobnej strukturze pierwszorzędnej. Jak jednak zdefiniować podobieństwo dwóch sekwencji aminokwasowych i jak odnaleźć, wśród kilku tysięcy sekwencji, tę podobną do analizowanej?

Pierwszą możliwością jest potraktowanie aminokwasów jako liter pewnego alfabetu i porównywanie białek tak jak słów zapisanych w tym alfabetcie. To, że jakaś litera oznacza aminokwas o konkretnych właściwościach nie ma tu



**Ryc. 2.** Graficzne przedstawienie macierzy podobieństwa (similarity matrix) sekwencji białek ICBP i PaV. Kolumny indeksowane są kolejnymi aminokwasami PaV, wiersze aminokwasami ICBP. Na przecięciu wiersza i kolumny rysujemy kropkę gdy odpowiednie aminokwasy są identyczne. Liczby  $n_1$  i  $n_2$  podane w górnej ramce to tzw. filtry, identyczność aminokwasów traktowana jest jako nieprzypadkowa, gdy wśród  $n_1$  sąsiadów (z obu stron) danego aminokwasu występuje  $n_2$  identyczności.

a.  $n_1 = 0$ ,  $n_2 = 1$  (nie ma filtrowania); b.  $n_1 = 2$ ,  $n_2 = 3$ ; c.  $n_1 = 9$ ,  $n_2 = 6$ .



żadnego znaczenia, podobne metody stosuje się do porównywania sygnałów telekomunikacyjnych. Rozpoczynamy od konstrukcji macierzy podobieństwa, której kolumny indeksowane są kolejnymi aminokwasami jednego białka, a wiersze — aminokwasami drugiego. Na przecięciu dowolnego wiersza i kolumny umieszczamy jedynkę (lub kropkę w reprezentacji graficznej), gdy odpowiednie aminokwasy są identyczne, a zero (lub puste miejsce), jeśli są różne. Macierz podobieństwa dla porównania białek ICBP i parwalbuminy z mięśni karpia (PaV) [5] przedstawiono graficznie na rycinie 2a. Mimo, iż są to białka homologiczne, na rysunku dominują szumy, czyli przypadkowe zgodności pojedynczych aminokwasów. Uwzględnienie lokalnej gęstości zliczeń umożliwia pozbycie się szumów (proces ten nazywa się filtrowaniem) i podobieństwo białek uwidacznia się na rycinie jako kropkowane ukośne linie w pobliżu przekątnej (Ryc. 2b i 2c). Dodatkowe linie poza przekątną odzwierciedlają podobieństwa fragmentów białka (ICBP, składa się z dwóch, a PaV z trzech wzajemnie homologicznych pojednostek).

Dla szybkiego porównania wybranej sekwencji z wieloma innymi, lub dla uzyskania ilościowej miary podobieństwa stosuje się różne algorytmy, które eliminują potrzebę wizualnej analizy macierzy podobieństwa, tak jak w metodzie graficznej. Takie właśnie podejście jest np. podstawą algorytmów Needleman - Wunsch [6] i Smitha - Watermana [7]. Do bardzo szybkiego poszukiwania homologii, np. wybranej sekwencji z całą bazą danych służy algorytm Lipman - Pearsona [8] (program FASTP). Przy jego wykorzystaniu porównanie sekwencji ICBP z całym bankiem sekwencji SWISSPROT 5.0 [9] trwa ok. 1 min. na komputerze VAX-780.

Przy dokładniejszej analizie wspomnianą powyżej "zero-jedynkową" punktację w macierzy podobieństwa zastępuje się punktacją uwzględniającą preferencję pewnych aminokwasów do zamiany na inne. Najczęściej wykorzystuje się dane statystyczne zebrane w postaci tzw. macierzy Dayhoff [10]. W tym samym celu można wykorzystać podobieństwa aminokwasów i zdefiniowane poprzez ich właściwości fizykochemiczne [11, 12] np. traktowanie leucyny i izoleucyny jako tego samego aminokwasu. Nie jest to jednak pozbawione elementów arbitralności — nie wiadomo które właściwości aminokwasów są istotne z punktu widzenia ich podobieństwa.

Każda z wymienionych powyżej metod pozwala ilościowo ocenić podobieństwo sekwencji, oraz wzajemne przyporządkowanie (alignment) aminokwasów w obu sekwencjach. Podobieństwo sekwencji wyrażone jest najczęściej w procentach (100% sekwencje identyczne, ok. 10—15% sekwencje przypadkowe). Modyfikując nieco powyższe metody można poszukiwać przyporządkowania sekwencji aminokwasowych nie całych białek, lecz wspólnych fragmentów, zwanych czasem domenami [13]. We wszystkich metodach analizy podobieństwa sekwencji stosuje się arbitralnie przyjmowane parametry, za pomocą których opisuje się delecje i insercje w sekwencji. Swoboda ich wyboru sprawia, że spotyka się czasem różne przyporządkowania sekwencji aminokwasowych tych samych białek.

```

icbp.seq, 72 amino acids vs $scratch:swiss.dat library
< 2 0 :
4 2 :-
6 18 :-----
8 10 :-----
10 48 :-----
12 82 :-----
14 138 :-----
16 261 :-----
18 451 :-----
20 483 :-----
22 514 :-----
24 648 :-----
26 582 :-----
28 493 :-----
30 413 :-----
32 293 :-----
34 222 :-----
36 149 :-----
38 91 :-----
40 63 :-----
42 30 :-----
44 31 :-----
46 36 :-----
48 48 :-----
50 22 :-----
52 18 :-----
54 12 :-----
56 6 :-----
58 6 :-----
60 2 :-
62 3 :-
64 8 :-----
66 2 :-
68 2 :-
70 1 :-
72 5 :-----
74 1 :-
76 1 :-
78 0 :
80 3 :-----
> 80 7 :-----
1337974 residues in 5205 sequences, mean score: 24.5 (6.93)
769 scores better than 32 saved, ktup: 1, fact: 4 scan time: 0:01:11.93
The best scores are:
init, opt
>CABI$BOVIN : DE VITAMIN D-DEPENDENT CALCIUM-BINDING PROT 347, 347
>CABI$PIG : DE VITAMIN D-DEPENDENT CALCIUM-BINDING PROT 318, 318
>CABI$RAT : DE VITAMIN D-DEPENDENT CALCIUM-BINDING PROT 299, 301
>S10A$BOVIN : DE S-100 PROTEIN, ALPHA CHAIN. 111, 167
>S10B$RAT : DE S-100 PROTEIN, BETA CHAIN. 101, 154
>S10B$HUMAN : DE S-100 PROTEIN, BETA CHAIN. 100, 154
>S10B$BOVIN : DE S-100 PROTEIN, BETA CHAIN. 98, 154
>TPCC$HUMAN : DE TROPONIN C, CARDIAC MUSCLE (TN-C). 79, 91
>TPCC$RABIT : DE TROPONIN C, SLOW SKELETAL AND CARDIAC MU 79, 91
>TPCC$BOVIN : DE TROPONIN C, CARDIAC MUSCLE (TN-C). 79, 91
>CFAG$HUMAN : DE CYSTIC FIBROSIS ANTIGEN (CFAG). 76, 137
>CLLL$PIG : DE CALPACTIN I LIGHT CHAIN (P10 PROTEIN). 74, 122
>TPCS$CHICK : DE TROPONIN C, SKELETAL MUSCLE. 71, 90
>TPCS$RABIT : DE TROPONIN C, SKELETAL MUSCLE. 71, 91
>TPCS$RANES : DE TROPONIN C, SKELETAL MUSCLE. 71, 89
>TPCS$HUMAN : DE TROPONIN C, SKELETAL MUSCLE. 71, 91
>TPCS$PIG : DE TROPONIN C, SKELETAL MUSCLE. 71, 91
>CALL$CAEEL : DE CALMODULIN-LIKE PROTEIN (GENE NAME: CAL- 69, 77
>CALM$TETPY : DE CALMODULIN (PHOSPHORYLASE KINASE DELTA C 68, 89
>RPO2$YEAST : DE DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE II (EC 2.7.7 68, 74

```

Ryc. 3. Przykład wyniku porównania sekwencji ICBP (występującego pod nazwą CABIBOVINE w w banku sekwencji SWISSPROT5), uzyskany przy pomocy programu FASTP [8]. Oprócz podania najbardziej podobnych białek, program podaje histogram wyników porównania. Na osi pionowej występuje miara podobieństwa sekwencji (score), na osi poziomej odpowiednia liczba znalezionych sekwencji. Powyżej score = 60 występują białka spokrewnione z ICBP.

BESTFIT of: Cabi\$Bovin check: 6660 from: 2 to: 73

```
ID  CABI$BOVIN      STANDARD;      PRT;      75 AA.
AC  P02633;
DT  21-JUL-1986   (ADAPTED FROM A PIR ENTRY)
DT  20-MAR-1987   (ANNOTATIONS EDITED)
DT  13-AUG-1987   (ANNOTATIONS EDITED) . . .
```

to: Tpcs\$Chick check: 9597 from: 94 to: 161

```
ID  TPCS$CHICK     STANDARD;      PRT;      162 AA.
AC  P02588;
DT  21-JUL-1986   (ADAPTED FROM A PIR ENTRY)
DT  13-AUG-1987   (FT LINES EDITED)
DE  TROPONIN C, SKELETAL MUSCLE. . . .
```

Symbol comparison table: GenDataBase:SWGAPPEP.CMP CompCheck: 1254

Gap Weight:	5.000	Average Match:	0.540
Length Weight:	0.300	Average Mismatch:	-0.396

Quality:	33.6	Length:	72
Ratio:	0.494	Gaps:	1
Percent Similarity:	48.529		

Cabi\$Bovin x Tpcs\$Chick October 22, 1987 18:37 ..

```

  2 SPEELKGFIFEKYAAKEGDPNQLSKEELKLLQLTEFPSSLKGPSTLDELFE 51
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 94 SEELADCFRIFDKNADGFIDIEELGEILRATGEHV...TEEDIEDLMK 139

 52 ELDKNGDGEVSEFEFQVLVKKI 73
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
140 DSDKNNDGRIDFDEFKMMEGV 161
```

**Ryc. 4.** Wynik porównania sekwencji ICBP i PaV za pomocą programu BESTFIT (pakiet UWGCG), wykorzystującego algorytm Smitha-Watermana [7]. Pionowe kreski oznaczają, że na odpowiednich miejscach w obu sekwencjach wystąpiły takie same lub zbliżone (wg skali przyjętej w danych wejściowych do programu) aminokwasy.

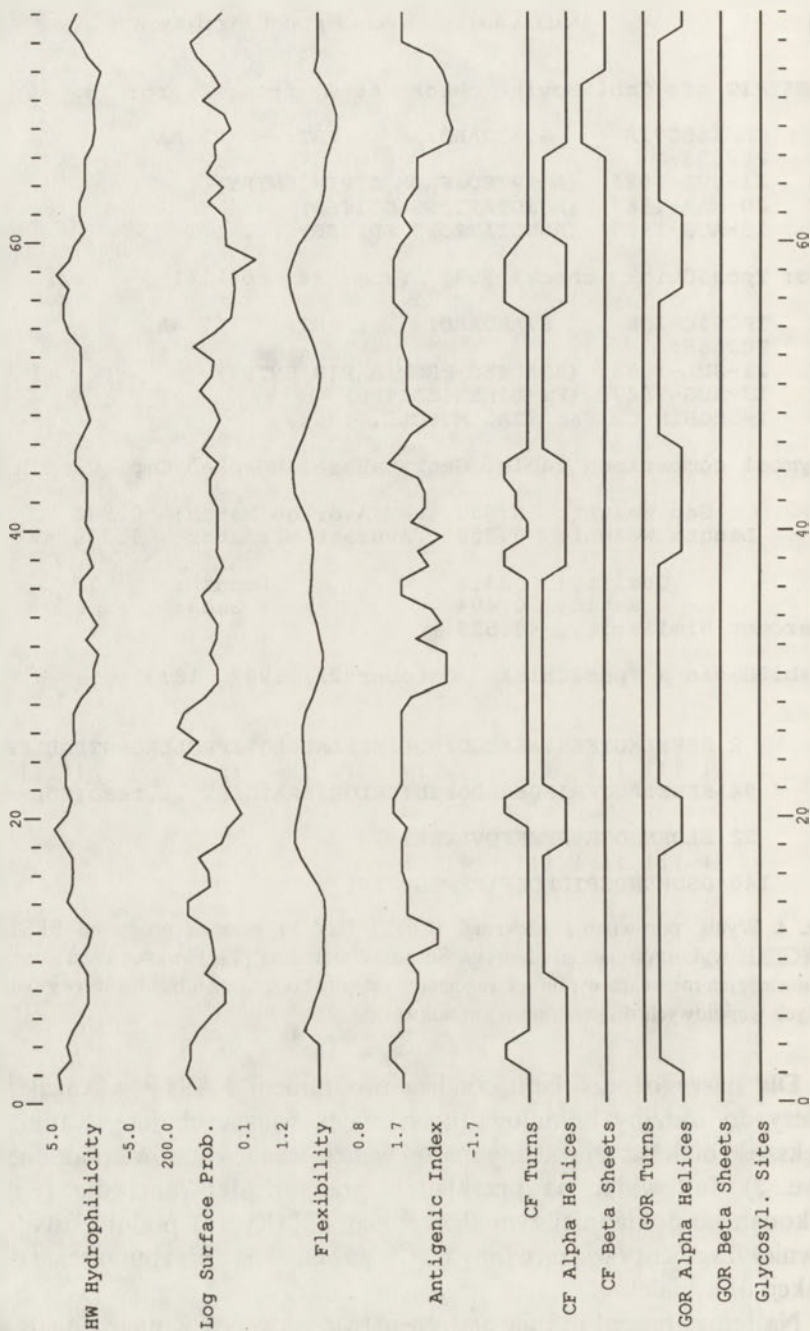
Dla naszego przykładu, analiza programem FASTP wykazała, że ICBP należy do rodziny homologicznych białek wiążących jony wapnia, bowiem większość białek z tej rodziny ma sekwencje aminokwasowe podobne do ICBP (Ryc. 3). Jak widać na przykładzie przyporządkowania dla ICPB i PaV wykonanego dokładniejszym algorytmem [7] (Ryc. 4), podobieństwo obejmuje również fragmenty wiążące jony  $Ca^{2+}$ , wzmacniając przypuszczenie o podobnej funkcji obu białek.

Na temat poszukiwania podobieństwa sekwencji istnieje bogata literatura [14, 15, 16]. Analiza podobieństwa sekwencji jest znacznie łatwiejsza przy korzystaniu z komputerowego banku danych i staje się działaniem rutynowym, jeśli korzystamy z gotowych pakietów programów do analizy sekwencji aminokwasowych białek. Do najbardziej znanych należą pakiety Uniwersytetu z Wisconsin (UWGCG) [17] na komputer VAX i firmy Genofit SA Genewa (PCGene) [18] na komputer IBM PC.



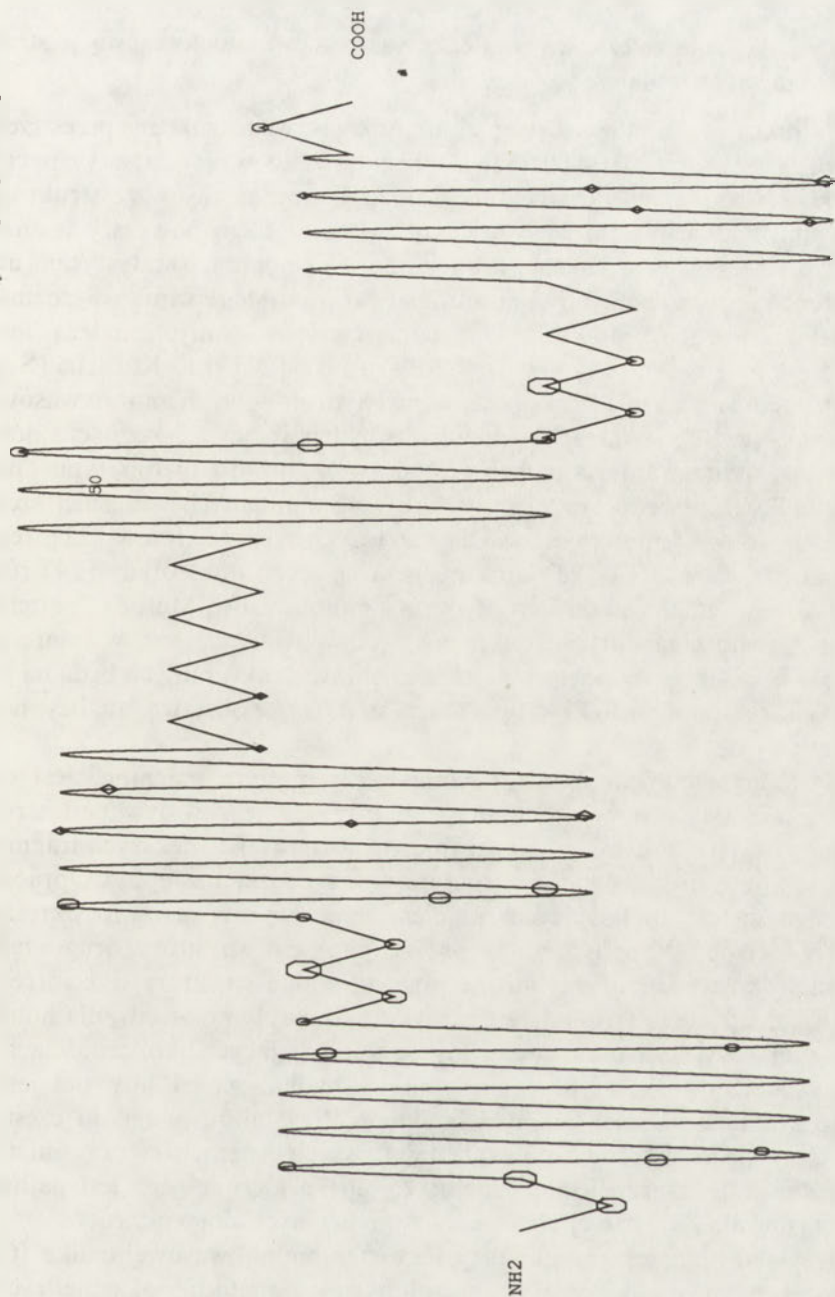
PLOTSTRUCTURE of: klboi.p2s October 1, 1987 14:41

PEPTIDESTRUCTURE of: nbrf:klboi Ck: 6660, 1 to: 75  
Calcium-binding protein, intestinal - Bovine



Ryc. 5. Objasnienie na stronie 53

0 Hydrophilicity >=1.3  
◊ Hydrophobicity >=1.3



Ryc. 5. Przykład kompleksowej analizy sekwencji białka (występującego pod nazwą KLBOI w banku sekwencji PIR-NBRF), wykonanej za pomocą programu PEPPLOT [27] z pakietu UWGCG.  
a. przedstawienie pełnej analizy w postaci wykresów, b. przewidywanie położenia łańcucha α helisy z zaznaczeniem aminokwasów hydrofobowych i hydrofilowych.

### III. Poszukiwanie zależności pomiędzy sekwencją aminokwasową a strukturą drugorzędową białek

Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej, struktury przestrzennej i innych właściwości znanych białek sformułowano wiele statystycznych prawidłości wiążących poszczególne "układy" aminokwasów ze strukturą lub funkcjami białka. Najbardziej ogólnym zastosowaniem powyższych analiz są próby przewidywania struktury drugorzędowej w oparciu o statystyczną analizę preferencji poszczególnych aminokwasów do występowania w rozmaitych strukturach drugorzędowych. Do najczęściej stosowanych należą metody: Garniera i wsp. [19], Chou i Fasmana [20], oraz Kabscha i Saudera [20a]. Algorytm Lima [22] dla sekwencji hydrofobowych aminokwasów typu  $x..xx..xx..x$  (gdzie  $x$  — oznacza aminokwas hydrofobowy a. — oznacza dowolny aminokwas) przewiduje alfa helisę. Należy on już do metod typu "pattern matching", które bezpośrednio poszukują wspomnianych wcześniej szczególnych "układów" aminokwasów. Dla niektórych typów skrętów [22], rejonów oddziałujących z DNA [23] oraz miejsc wiążących nukleotydy [24] również zidentyfikowano charakterystyczny wzór aminokwasów. Metody "pattern matching" z założenia dotyczą tylko pojedynczych funkcji, lecz w miarę wzbogacania się zestawu rozpoznawanych elementów strukturalnych będą na pewno zyskiwać na popularności i być może staną się podstawą analizy nowych sekwencji.

Następnym etapem rozwoju metod typu "pattern matching" jest objęcie analizą nie tylko samej sekwencji, ale również (przewidywanej) struktury drugorzędowej. Szczególnie chodzi tu o rozpoznawanie większych fragmentów struktury (tzw. supersecondary structure, patrz rozdział następny). Opracowano też kilka metod analizujących rozmieszczenie aminokwasów o określonych właściwościach. W połączeniu z przewidywaniem struktury drugorzędowej, pozwala to na bardzo przybliżone przewidywanie struktury trzeciorzędowej. Wyniki analizy tego typu mogą być wykorzystane do poszukiwania homologii na poziomie wyższym niż sekwencyjny, co w sprzyjających okolicznościach może doprowadzić do zidentyfikowania funkcji białka, nawet gdy nie jest ono spokrewnione z żadnym znanym białkiem. Przy takim podejściu często wykorzystuje się języki programowania najnowszych generacji (co czasami nazywa się technikami sztucznej inteligencji) [25, 26], a kierunek ten jest najbardziej obiecujący, ale i najsłabiej rozwinięty z omawianych dotychczas.

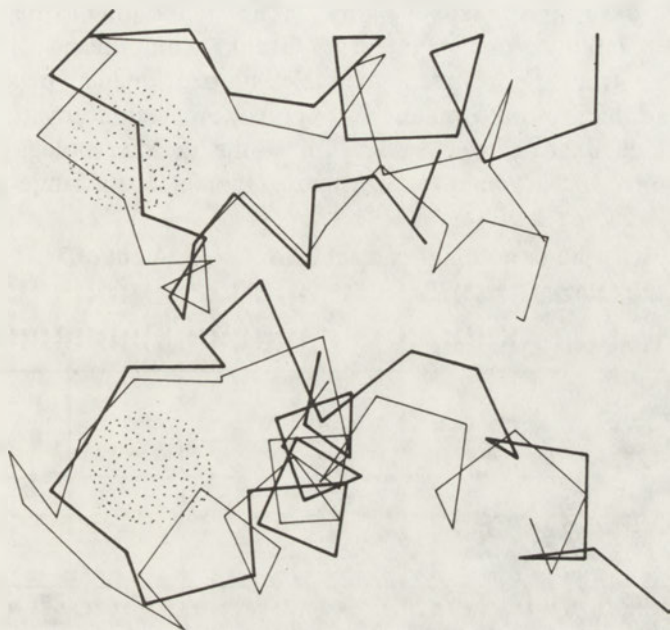
Przykład kompleksowej analizy sekwencji aminokwasowej białka ICBP, z zastosowaniem wielu spośród omówionych tu metod, pokazuje rycina 5, uzyskana za pomocą programu PEPLOT z pakietu UWGCG [27].

### IV. Analiza i porównywanie struktur trzeciorzędowych białek

Jeżeli przy użyciu opisanych w rozdziale II metod znaleziono w bazie danych dobrze zbadane białko o bardzo zbliżonej sekwencji aminokwasowej, dalsze postępowanie jest już znacznie łatwiejsze, a w każdym razie nie ma już



wątpliwości co do funkcji biologicznej analizowanego białka. W najkorzystniejszym przypadku, gdy znana jest struktura przestrzenna homologicznego białka, można nawet próbować przewidzieć strukturę nowego białka metodą mechaniki molekularnej [28]. Dotychczasowe próby przewidywania struktury nie zawsze kończyły się sukcesem [29, 30], gdyż zbyt słabo jeszcze rozumiemy czynniki decydujące o powstawaniu i stabilizacji struktury przestrzennej białka.



**Ryc. 6.** Graficzne nałożenie na siebie struktur ICBP i PaV na podstawie wyników programu HOMSTR [32]. Przedstawione są jedynie odpowiadające sobie fragmenty. Duże sfery oznaczają jony wapnia. Podobieństwo strukturalne obejmuje fragmenty wiążące jony wapnia wraz z sąsiadującymi helisami.

Porównawcza analiza struktury dobrze poznanych, a jednocześnie blisko spokrewnionych, białek dostarcza wielu informacji, którymi można wzbogacić przewidywania oparte na metodach fizyki. Białka, których sekwencje aminokwasowe są podobne w ponad 50%, mają na ogół bardzo zbliżone struktury trójwymiarowe [31] i można próbować „nałożyć” je na siebie (Ryc. 6). Uzyskuje się wtedy dodatkową weryfikację przyporządkowania uzyskanego jedną z metod wymienionych w rozdziale II, a równocześnie można badać jak różnice w sekwencji wpływają na przestrzenne ułożenie się białka. Analizując rycinę 5 i 6 widzimy, że podobieństwo strukturalne ICBP i PaV obejmuje fragment łańcucha uczestniczący w wiązaniu wapnia wraz z sąsiednimi elementami struktury drugorzędowej (helisami).

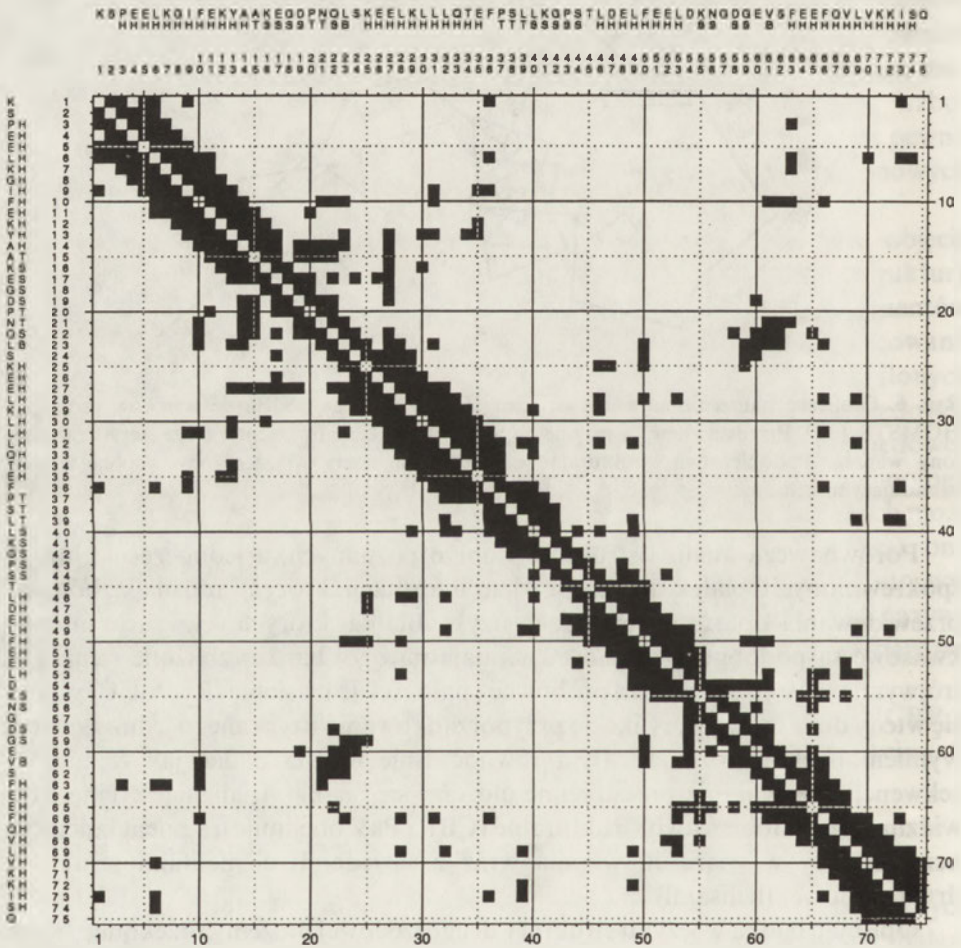
Opisując białka w języku struktury drugorzędowej możemy przekonać się, że wiele odległych ewolucyjnie białek o zupełnie niepodobnej sekwencji posiada

fragментy o podobnej budowie, np. dwie następujące po sobie alfa helisy (alfa-alfa), fragment beta, alfa helisę i znowu fragment beta (beta-alfa-beta). Tworzą one tzw. strukturę superdrugorzędową [33]. Analiza podobieństw i różnic w sekwencjach aminokwasowych takich fragmentów dostarcza również wielu informacji o roli poszczególnych rodzajów aminokwasów w powstawaniu struktury trzeciorzędowej białek.

W obu omówionych powyżej przykładach istotną rolę odgrywało podobieństwo strukturalne badanych białek. Jakimi metodami można zidentyfikować podobne białka czy ich fragmenty? Grafika komputerowa [34] ułatwia porównywanie struktur przestrzennych białek umożliwiając na płaskim ekranie również oglądanie rysunków stereo. Z powodów technicznych nie można zamieścić takich ilustracji w tym artykule. Inna metoda polega na analizie odległości pomiędzy atomami w cząsteczce białka. Konstruuje się macierz

## 3ICB "all or nothing" contact map

## 5. A cut off

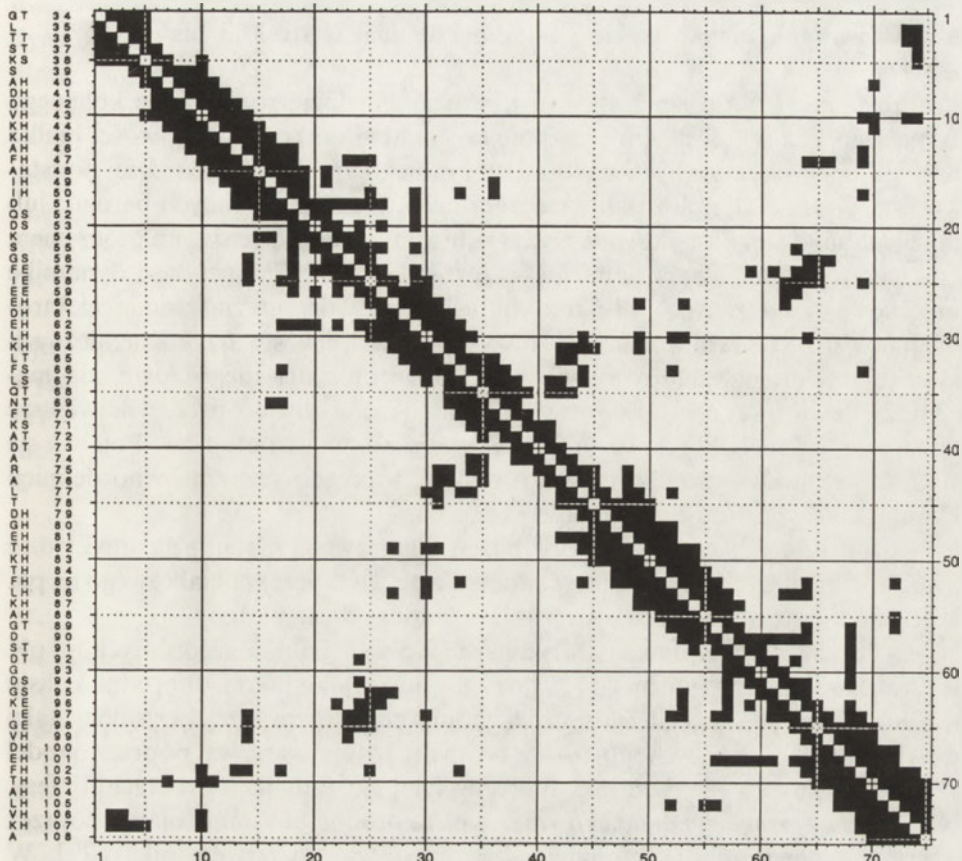


Ryc. 7. Objaśnienia na stronie 57



## 1CPV "all or nothing" contact map      5.0 A cut off

GLTSKPADVVKKAFAIIDQDKSGEIEEDELKLFLONFKADARALTDQETKTFLLKAGQSDGDKIGVDQFTALVKA  
 TTTSHHHHHHHHHNNSSEEEHHHHHSTTTSTTHHHHHHHHHTTSSSEEEHHHHHHHH



Ryc. 7. Uproszczone, graficzne przedstawienie macierzy odległości ICBP i PaV (na rycinie oznaczone 3ICB i 1CPV), tę formę przedstawienia nazywa się czasem mapą kontaktów. Czarny kwadracik w pozycji wyznaczonej przez aminokwasę *n* i *m* oznacza, że przynajmniej jeden atom aminokwasu *n* znajduje się w odległości mniejszej niż 5 Å od jednego z atomów aminokwasu *m*. Zagęszczenie czarnych kwadracików w pobliżu przekątnej odpowiada kontaktom atomów należących do najbliższych sąsiadów. Najwięcej takich kontaktów występuje w alfa helisach. Mapy kontaktów można stosować do rozpoznania elementów struktury drugorzędnej.

odległości (ang. distance matrix), której kolumny i wiersze indeksowane są poprzez kolejne atomy w białku, a której wyrazy są odległościami pomiędzy odpowiednimi atomami. Dzięki analizie macierzy odległości można między innymi: wyszukiwać odrębne domeny lub podjednostki w cząsteczce białka [35], czy poszukiwać „klucza” pasującego do znanego fragmentu białka [36]. Uprozczone graficzne przedstawienie macierzy odległości dla ICBP i PaV znajduje się na rycinie 7. Podobieństwo obu macierzy (a więc i struktur) jest



wyraźne. Dzięki tym rysunkom można łatwo zidentyfikować aminokwasy odgrywające kluczową rolę w utrzymaniu właściwej struktury obu białek [37].

## V. Zastosowanie metod fizyki teoretycznej do analizy struktur białek

Poznanie struktury przestrzennej białka umożliwia rozpoczęcie kolejnego etapu jego analizy. Jest nim szczegółowe badanie funkcji i właściwości białka przy pomocy teoretycznych metod fizyki molekularnej. W najbardziej podstawowym ujęciu białko jest układem jąder i elektronów tworzących bardziej lub mniej stabilną strukturę kowalencyjną silnie oddziałującą ze swoim otoczeniem tzn. wodą, jonami i związkami niskocząsteczkowymi. Energetykę i dynamikę procesów zachodzących w białku określają jedynie oddziaływanie elektromagnetyczne. W celu obliczenia wszystkich właściwości fizykochemicznych takiego układu należałoby rozwiązać odpowiednie dla niego równania mechaniki kwantowej. Na razie jest to jednak niemożliwe, obecnie największe badane w ten sposób układy nie przekraczają kilkunastu atomów. Pojawia się stąd konieczność wprowadzania uproszczeń, które dotyczą zarówno definicji układu, jak i sposobu obliczenia jego energii.

Różnorodność stosowanych przybliżeń zilustrowana zostanie na przykładzie dwóch problemów: pierwszy dotyczy opisu wpływu otoczenia białkowego na pK łańcuchów bocznych, a drugi wiązania ligandów przez białko.

1. Początkowo w pracach dotyczących wpływu grup naładowanych na pK wybranego łańcucha bocznego [38] traktowano białko jako jednorodne kuliste medium o niskiej stałej dielektrycznej zanurzone w roztworze o wysokiej stałej dielektrycznej. Jony występujące w roztworze opisywane są poprzez model Debye-Hückla. Ładunki białka występują tam na powierzchni sfery. Nowsze modele uwzględniają również niejednorodne otoczenie białka poprzez obliczanie powierzchni dostępnej przez cząsteczki rozpuszczalnika [39]. W jeszcze bardziej skomplikowanych modelach rozpuszczalnik ma wewnętrzną strukturę złożoną z jonów, których rozkład oblicza się poprzez rozwiązywanie równania Poissona-Boltzmanna [40]. Pole elektryczne modyfikujące pK badanego łańcucha bocznego obliczane może być również w tzw. modelu mikrodielektrycznym [41]. W tym modelu białko oraz otaczający solwent ma bogatszą strukturę wewnętrzną złożoną z ładunków elektrycznych i polaryzowalnych dipoli atomowych. Najnowsze prace sugerują, że do prawidłowego opisu pola elektrycznego w białku należałoby uwzględnić lokalne fluktuacje położenia atomów, czyli dynamikę białka [42].

2. Układ złożony z białka i małej cząsteczki oddziałującej z nim (ligandu) analizowany może być przez rozwiązywanie równań mechaniki kwantowej wybranych fragmentów białka [43], lub poprzez symulacje całego białka wraz z otaczającym je rozpuszczalnikiem, lecz przy użyciu prostszego sposobu obliczania energii [44]. Do obliczania energii całego białka o określonej strukturze przestrzennej stosuje się proste analityczne potencjały typu atom-atom. Dla

powyższego modelu przyjęła się nazwa mechanika molekularna, gdyż stosowane równania są analogiczne do tych, które należałoby rozwiązać gdyby białko było układem oddziałujących kulek i sprężynek. Bardziej skomplikowane modele uwzględniają właściwości dielektryczne białka [45, 46]. Właściwości termodynamiczne, takie jak energia swobodna, entropia, średnie położenia i fluktuacje atomów, stałe wiązania ligandów itp., obliczane są następnie w wyniku uśredniania interesujących wielkości (Monte Carlo lub dynamika molekularna).

Zwiększająca się dostępność komputerów o dużej mocy obliczeniowej umożliwia powstawanie modeli teoretycznych opisujących coraz dokładniej analizowane zjawisko fizykochemiczne w białku. Z uwagi na skomplikowanie problemu omawianego na początku tego rozdziału podejście „bez przybliżeń” nie będzie pomimo to realne w najbliższej przyszłości.

Umiejętność takiego sformułowania pytania i doboru właściwej metody, aby jej błędy możliwie mało wpłynęły na otrzymane wyniki, jest prawdziwym wyzwaniem dla biofizyki molekularnej. W celu znajdowania systematycznych prawidłowości determinujących właściwości białek niezbędne jest oparcie się na łatwo dostępnych danych. Są to zarówno dane strukturalne takie jak te zawarte w Protein Data Bank [47], jak i inne (sekwencje, dane fizykochemiczne), znajdujące się np. w banku SWISSPROT, czy w innych bazach danych.

Przykładem zastosowania takiej metody badawczej jest sformułowanie przez H o l a [48] koncepcji dipola alfa helisy (ładunek  $-0.5e$  na C-końcu i  $0.5e$  na N-końcu helisy). Koncepcja ta była następnie analizowana za pomocą metod mechaniki kwantowej [49]. Prace te uzasadniają stosowanie takich modeli, w których pole elektrostatyczne białka przybliżano poprzez pole pochodzące od jego drugorzędowych fragmentów [50].

Jednym z kierunków rozwoju biofizyki molekularnej jest niewątpliwie formułowanie reguł i prawidłowości dotyczących struktury i funkcji białek. Nie zastępują one podstawowych praw fizyki, które determinują właściwości makrocząsteczek, lecz ułatwiają powstawanie coraz lepszych modeli przybliżonych.

## VI. Uwagi końcowe

Przedstawiono tutaj wiele metod stosowanych do teoretycznej analizy sekwencji i struktur białek. Metody te, badając białko na różne sposoby, tworzą pewną całość, którą chcielibyśmy tu przedstawić godząc się z góry na wiele uproszczeń. Wiele z przedstawionych metod powstało poza tradycyjną biochemią i biologią i z tego powodu są w tych środowiskach często nie znane i nie doceniane. Metody te stosowane są od kilku lat przez autorów w badaniach nad grupą białek wiążących jony wapnia. Chociaż jest to specyficzny problem, to proponowane metody mogą być z powodzeniem stosowane do innych zagadnień. Wierzimy, że artykuł przyczyni się choć trochę do ich popularyzacji. Wspólną cechą omówionych tutaj podejść jest intensywne zastosowanie komputera jako narzędzia pracy. Nie sposób inaczej przeprowadzać analizy dużych i

skomplikowanych układów, opracowywać duże zbiory danych. Na szczęście, i to czyni tę tematykę tak atrakcyjną, nie potrzeba do takiej analizy niedostępnych dla nas superkomputerów. Dla wielu zastosowań wystarczy dobry mikrokomputer (np klasy IBM AT), czyli sprzęt coraz łatwiej dostępny w Polsce. Wszystkich zainteresowanych tą tematyką, i/lub zamierzających wykorzystać opisane powyżej metody do własnych problemów zapraszamy do nawiązania kontaktu z autorami.

Dziękujemy prof. C. Sanderowi i personelowi EMBL w Heidelbergu za wiele cennych uwag i wszechstronną pomoc. Część zamieszczonych w pracy wyników uzyskano za pomocą niedostępnych w Polsce programów i danych (UWGCG, HOMSTR oraz dane Protein Data Bank) podczas pobytu jednego z nas (AG) w EMBL [37].

Opracowanie wykonano w ramach Programu CPBR 3.13.

Artykuł nadesłano 17 marca 1988 r.

Zaakceptowano do druku 28 maja 1988 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Leatherbarrow R.I., Fersht A.R., (1986) *Protein Eng.*, **1**, 7—16.
2. Shaw W.V., (1987), *Biochem. J.* **246**, 1—17.
3. Anfinsen C.B., (1973), *Science* **181**, 223—230.
4. Fullmer C.S., Wasserman R.H. (1977) w *Calcium Binding proteins and calcium function* red. Wasserman R. H., Corradino R. A., Carafoli E., Kretsinger R. H., MacLennan D. H., Siegel F. L. str. 303—304, New York Elsevier.
5. Coffe C.J., Brandshaw R.A., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3305—3309.
6. Needelman S.B., Wunsch C.D., (1970), *J. Mol. Biol.* **48**, 443—453.
7. Smith T.F., Waterman M.S., (1981), *J. Mol. Biol.* **147**, 195—197.
8. Lipman D.J., Pearson W.R., (1985), *Science* **227**, 1435—1441.
9. Swissprot—bank sekwencji białek, stworzony na Wydziale Biochemii Medycznej Uniwersytetu w Genewie, obecnie prowadzony i uaktualniony przez Europejską Organizację Biologii Molekularnej. Wersja 6—styczeń 1988.
10. Dayhoff M.O., Schwartz R. M., Orcutt B.C., (1978) w *Atlas of Protein Sequence and Structure t. 5, Supplement 3*, red. Dayhoff M.O., str. 345—352, NBRF Washington.
11. Kubota Y., Takahashi S., Nikishawa K., Ooi T., (1981), *J. Theor. Biol.* **91**, 347—361.
12. Argos P., (1987), *J. Mol. Biol.* **193**, 385—396.
13. Gribskov M., McLachlan A.D., Eisenberg D., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4355—4358.
14. *Nucleic acids and protein sequence analysis, a practical approach.* red. Bishop M.J., Rawlings C.J., IRL Press, 1987.
15. Waterman M.S., (1984), *Bull. Math. Biol.* **46** 473—500.
16. Davidson D., (1985), *Bull. Math. Biol.* **47**, 437—474.
17. Devereux J. Haberli P., Smithies O., (1984), *Nucl. Acids Res.* **12**, 387—395.
18. *PC Gene Manual*, (1987), Genofit SA, Geneva.
19. Garnier J., Osguthorpe D.J., Robson B., (1978), *J. Mol. Biol.* **120**, 97—120.
20. Chou P.Y., Fassman G.O., (1978), *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 251—176.
- 20a Kabsch W., Sander C., (1983), *FEBS Lett.* **155**, 179—182.
21. Lim V.L., (1974), *J. Mol. Biol.* **88**, 873—894.
22. Cohen F.E., Abarbanel R.M., Kuntz I.D., Fletterick R.J., (1986), *Biochemistry* **25**, 266—275.
23. Dodd I.B., Egan J.B., (1987), *J. Mol. Biol.* **194**, 546—557.



24. Wierenga R.K., Hol G.J.W., (1983), *Nature* **302**, 842—844.
25. Rawlings C.J. (1987) w *Proceedings of the Fourth European Seminar on Computer Aided Molecular Design*, Helsingor, Dania, October 1987.
26. Lathrop R.H., Webster T.A., Smith T.F., (1987), *Communications of the ACM* **30**, 909—921.
27. Gribskov M., Burgess R.R., Devereux J., (1986), *Nucl. Acids Res.* **14**, 327—334.
28. O'Neil K., De Grado W.F., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4954—4958.
29. Blundell T.L., Sibanda B.L., Sternberg M.J.E., Thornton J.M. (1987) *Nature* **326**, 347—352.
30. Ripka W.C. (1986), *Nature* **321**, 93—94.
31. Bashford D., Clothia C.H., Lesk A.M., (1987), *J. Mol. Biol.* **196**, 199—216.
32. Argos P., Rossman M.G., (1979), *Biochemistry* **18**, 4951—4959.
33. Schulz G.E., Schirmer R.H. (1979) *Principles of protein structure* str. 79—84, Springer-Verlag New York.
34. Ganti G., McCammon J.A., (1986), *J. Molec. Graph.* **4**, 200—203.
35. Sander C., (1981) w *Structural Aspects of Recognition and Assembly in Biological Macromolecules*. red. Balaban M., Susman J.L., Traub W., Yonath A., str. 183—195, Balaban ISS Rehovot and Philadelphia.
36. Jakes S.E., Watts N., Willet P., Bawden D., Fisher J.D., (1987), *J. Molec. Graph.* **5**, 56—59.
37. Godzik A., Sander C. w przygotowaniu.
38. Tanford C., Kirkwood J.O., (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5333—5339.
39. Matthew J.B., (1985), *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **14**, 387—417.
40. Gilson M.K., Honig B.H., (1987) *Nature*, **330**, 84—86.
41. Warshel A., (1984), *Quart. Rev. Biophys.* **17**, 283—422.
42. Gilson M.K., Honig B.H., (1986) *Biopolymers*, **25**, 2097—2119.
43. Karpfen A., Schuster P. (1985) w *The Chemical Physics of solvation. Part A. Theory of solvation*. red. Dogonadze R. R. Kalman E., Kornyshev A. A., Ulstrup J., str. 265—312, Elsevier.
44. McCammon J.A., Harvey S.C., (1987) *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Cambridge University Press.
45. Van Belle D., Couplet I., Prevost M., Wodak S.W., (1987), *J. Mol. Biol.* **198**, 721—735.
46. Goodfellow J. (1987), *Int. J. Biol. Macromol.*, **9**, 273—280.
47. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer E.F. Brice M.D., Rodger J.R., Kennard O., Simanouchi T., Tatsumi M. (1977), *J. Mol. Biol.* **112**, 535—542.
48. Hol W.G.J., Van Duijnen P.T., Berendsen H.J.C., (1978), *Nature*, **273**, 443—446.
49. Van Duijnen P.T., Thole B.T., (1982), *Biopolymers* **21**, 1749—1761.
50. Warwicker J., Watson H.C., (1982), *J. Mol. Biol.*, **157**, 671—679.



WIESŁAWA LEŚNIAK<sup>\*</sup>)

## Interakcja kalmoduliny z jej białkami docelowymi

### Interaction of calmodulin with its target proteins

#### Spis treści

- I. Wstęp — rola i właściwości kalmoduliny
- II. Zastosowanie chemicznie zmodyfikowanej kalmoduliny w badaniach jej interakcji z enzymami
  - II-1. Niespecyficznie zmodyfikowana kalmodulina
  - II-2. Specyficznie zmodyfikowana kalmodulina
  - II-3. Chemiczna modyfikacja kalmoduliny w kompleksie z enzymem
  - II-4. Zastosowanie azydowych pochodnych kalmoduliny
- III. Biologiczna aktywność naturalnie występujących izoform oraz genetycznie zmienionej kalmoduliny
- IV. Struktura i biologiczna aktywność fragmentów kalmoduliny
- V. Struktura i właściwości krótkich peptydów wiążących kalmodulinę
- VI. Domeny wiążące kalmodulinę w białkach docelowych
- VII. Podsumowanie

#### Contents

- I. Introduction — Role and properties of calmodulin
- II. Application of chemically modified calmodulin in investigations of its interaction with enzymes
  - II-1. Unspecifically modified calmodulin
  - II-2. Specifically modified calmodulin
  - II-3. Chemical modification of calmodulin complexed with enzyme
  - II-4. Application of azidocalmodulin
- III. Biological activity of naturally occurring isoforms and genetically engineered calmodulin
- IV. Structure and biological activity of calmodulin fragments
  - V. Structure and properties of short peptides that bind to calmodulin
- VI. Calmodulin binding domains in target proteins
- VII. Summary

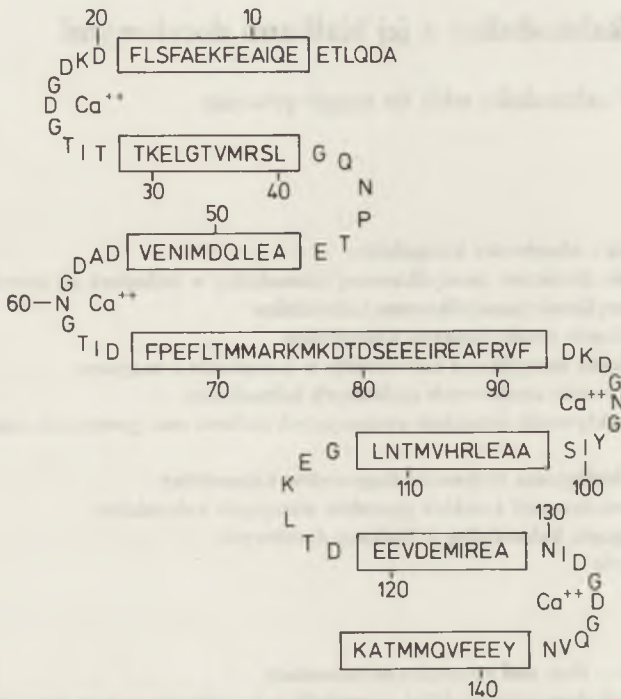
Wykaz stosowanych skrótów: CaM — kalmodulina, PDE — fosfodwuesteraza cyklicznych nukleotydów, MLCK — kinaza lekkich łańcuchów miozyny, CaN — kalcyneuryna, TNI — troponina I, NAD — dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, ACTH — hormon adrenokortykotropowy, VIP — peptyd jelitowy, GIP — peptyd żołądkowy, MAP-2 — jedno z białek związanych z mikrotubulami, HPLC — wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa,  $K_m$  — stała Michaelisa,  $K_d$  — stała dysocjacji,  $K_i$  — stała inhibicji.

<sup>\*</sup>) Mgr. Zakład Biochemii i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



## I. Wstęp — rola i właściwości kalmoduliny

Kalmodulina (CaM) zaliczana jest do grupy homologicznych białek wiążących wapń [1]. Jest to kwaśny (pI 4.2), termostabilny polipeptyd o masie 17 kDa zawierający cztery domeny wiążące jony wapnia (Ryc. 1) [2,3]. Wiązanie jonów



**Ryc. 1.** Pierwszorzędowa struktura kalmoduliny. Prostokątami oznaczono rejonny tworzące  $\alpha$ -helisę. Stosowane jednoliterowa skróty nazw aminokwasów: 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; Q-Gln; R-Arg; S-Ser; T-Thr; V-Val; W-Trp; Y-Tyr; Z-Glx

wapnia inicjuje zmianę konformacji kalmoduliny wyrażającą się wzrostem zawartości  $\alpha$ -helisy w jej strukturze drugorzędowej [4,5], z równoczesnym wyeksponowaniem hydrofobowych rejonów cząsteczki [6]. Wywołane przez wapń zmiany w strukturze kalmoduliny umożliwiają jej interakcję z wieloma enzymami oraz białkami nieenzymatycznymi. Tylko nieliczne białka są zdolne wiązać kalmodulinę również w nieobecności jonów wapnia [7,8]. Związanie kalmoduliny z enzymem powoduje stymulację jego aktywności. W ten sposób, bezpośrednio, lub przez aktywację niektórych kinaz i fosfataz, kalmodulina może wpływać na aktywność wielu enzymów, a co za tym idzie na przebieg różnych procesów biologicznych (Tab. 1). Szerzej struktura i funkcja kalmoduliny zostały omówione w pracach przeglądowych [9, 10, 11, 12]. Od kilku lat znana jest także struktura krystalograficzna kalmoduliny [13].

## Białka docelowe kalmoduliny

Enzymy	Występowanie	Proces metaboliczny modulowany w wyniku interakcji
fosfodwuesteraza cyklicznych nukleotydów cyklaza adenylowa cyklaza guanidylowa	kręgowce, bezkręgowce, pierwotniaki, rośliny ssaki, bakterie pierwotniaki	metabolizm cyklicznych nukleotydów
Ca <sup>2+</sup> -ATPazy z błon plazmatycznych	ssaki, rośliny	regulacja stężenia jonów wapnia w komórce
kalcyneuryna [fosfotaza białkowa]	ssaki	defosforylacja białek
ATPaza dyneiny	kręgowce, bezkręgowce, pierwotniaki, rośliny	ruchliwość wici, rzęsek
oksydaza NADPH oksydoreduktaza NADPH semi-hydroaskorbinian	ssaki (neutrofile) ssaki (aparat Golgiego)	procesy oksydoredukcyjne
metylaza fosfolipidowa	grzyby	metylacja fosfolipidów
kanał potasowy zależny od wapnia (99, 100)	pierwotniaki	równowaga jonowa
kinaza lekkich łańcuchów miozyny kinaza ciężkich łańcuchów miozyny	kręgowce, bezkręgowce grzyby	regulacja aktywności ATPazy aktomiozynowej
fosfofruktokinaza (147)	ssaki	glikoliza
kinaza fosforylaza	ssaki	glikogenoliza
kinaza dolicholi	pierwotniaki	biosynteza glikoprotein
kinaza NAD	rośliny	synteza NADP
kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny	kręgowce, rośliny	fosforylacja białek
Białka nieenzymatyczne		
Map-2(*) tubulina (*) czynnik tau (*) pasma I lipovitellina synapsyna I (*) spektryna (fodryna)(*) kaldesman(*)	kręgowce (mózg, nadnercza, erytrocyty)  kręgowce, bezkręgowce, rośliny, pierwotniaki  kręgowce	organizacja cytoszkieletu  organizacja cytoszkieletu oraz wpływ na aktywność ATPazy aktomiozynowej

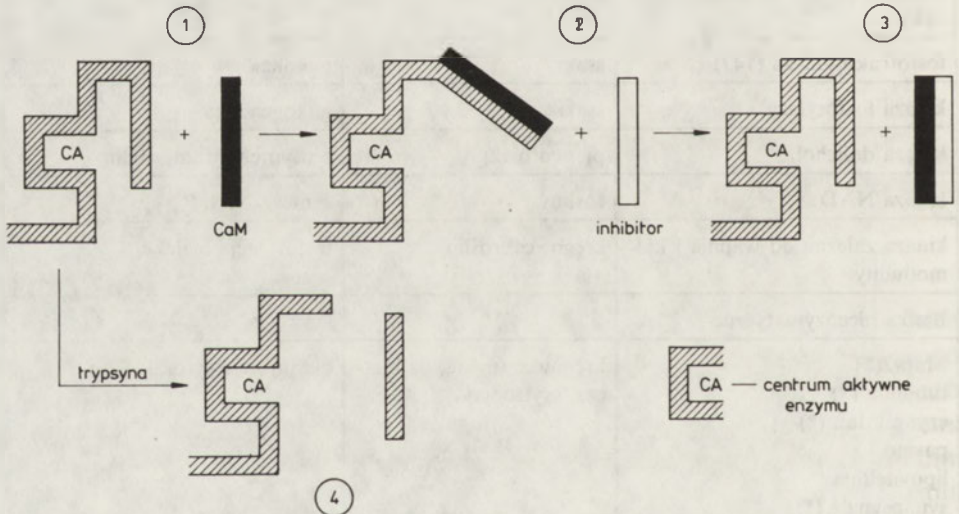
[65]

c.d. tabeli 1

Enzymy	Występowanie	Proces metaboliczny modulowany w wyniku interakcji
fosfolamban(*)	ssaki (mięśnie)	regulacja stężenia jonów wapnia w sarkoplazmie
regulatorowa podjednostka kinazy zal. od cAMP	ssaki (mózg)	regulacja aktywności kinazy
peptyd inhibitorowy ATPazy mitochondrialnej	ssaki (mitochondria)	?
zasadowe białko mielinowe(*)	ssaki (mózg)	obserwowana <i>in vitro</i> interakcja nie ma prawdopodobnie fizjologicznego znaczenia
troponina I histony	ssaki (mięśnie) kręgowce	

(\*) — białka te ulegają również fosforylacji przez kinazę zależną od CaM. W tabeli uwzględniono tylko te białka, których funkcja w organizmie lub fizjologiczne znaczenie interakcji z CaM są znane. Tabelę opracowano na podstawie danych z pracy M a n a l a n i K l e e [9], z niewielkimi zmianami i uzupełnieniami.

Równoległe z badaniami nad strukturą oraz biologiczną rolą kalmoduliny rozwijały się badania nad molekularnym mechanizmem jej interakcji z białkami docelowymi. Rycina 2 przedstawia wysuniętą w 1982 roku hipotezę działania kalmoduliny [14]. Według tej hipotezy enzymy aktywowane przez CaM zawierają w swojej cząsteczce odcinek peptydowy osłaniający centrum aktywne i



**Ryc. 2.** Hipotetyczny schemat aktywacji i inhibicji enzymów zależnych od kalmoduliny. 1. W natywnym enzymie centrum aktywne zablokowane jest przez domenę inhibitorową. 2. Przyłączenie CaM powoduje odblokowanie centrum aktywnego. 3. Zwiążenie CaM z inhibitorem uniemożliwia jej interakcję z enzymem. 4. Odtrawienie domeny inhibitorowej powoduje nieodwracalną aktywację enzymu.



tym samym powodujący autoinhibicję enzymu. Kalmodulina wiąże się z tym fragmentem i powoduje wzrost aktywności enzymu prawdopodobnie poprzez wywołanie takich zmian w konformacji odcinka inhibitorowego, które powodują odsłonięcie centrum aktywnego. Wiązanie kalmoduliny z enzymem jest stabilizowane przez oddziaływania o charakterze hydrofobowym i jonowym. Łagodna proteoliza może powodować odtrawienie domeny inhibitorowej co prowadzi do niezależnej od CaM, nieodwracalnej aktywacji enzymu. Hydrofobowe, dodatkowo naładowane inhibitory wiążą się z kalmoduliną uniemożliwiając jej interakcję z enzymem. Przedstawiona wyżej hipoteza oparta była na następujących faktach doświadczalnych:

1. Niektóre, różne pod względem budowy chemicznej substancje (takie jak pochodne fenotiazyny, lokalne anestetyki, niektóre alkaloidy) o charakterze hydrofobowym i wypadkowym ładunku dodatnim, hamują zależną od kalmoduliny stymulację aktywności enzymów [14—17].

2. W nieobecności wapnia kwaśne fosfolipidy i nienasycone kwasy tłuszczowe (czyli związki mające, podobnie jak kalmodulina, hydrofobowy charakter i ładunek ujemny) mogą stymulować aktywność enzymów zależnych od kalmoduliny [18—22].

3. Interakcja kalmoduliny z enzymami zależy od pH i siły jonowej środowiska [23].

4. Łagodna proteoliza enzymów zależnych od kalmoduliny powoduje ich nieodwracalną aktywację powiązaną z utratą wrażliwości na kalmodulinę [14, 24—31].

Przedstawiona wyżej hipoteza nie wyjaśnia jednak wielu kwestii dotyczących molekularnych aspektów interakcji kalmoduliny z jej białkami docelowymi. Nie wiadomo na przykład czym spowodowane są obserwowane *in vitro* różnice w powinowactwie enzymów do kalmoduliny. Wysunięto przypuszczenie, że pewne enzymy mogą oddziaływać z kalmoduliną, która ma związane trzy jony wapnia, podczas gdy inne wymagają do interakcji kalmoduliny w kompleksie z czterema jonami wapnia [32, 33]. Mogłoby to powodować *in vivo* sekwencyjne „włączanie się” procesów zależnych od kalmoduliny w miarę wzrostu stężenia wapnia w komórce. Nie wiadomo również który i czy zawsze ten sam rejon cząsteczki kalmoduliny odpowiedzialny jest za wiązanie poszczególnych enzymów? Czy odpowiada mu zawsze taki sam, czy też różny odcinek łańcucha polipeptydowego w białkach docelowych? Jaki aspekt struktury CaM odpowiedzialny jest za specyficzne właściwości wyróżniające ją spośród innych białek wiążących wapń? Te i inne zagadnienia dotyczące molekularnego mechanizmu działania kalmoduliny stały się w ostatnich kilku latach przedmiotem wnikliwych badań przy użyciu metod chemicznych, biochemicznych, genetycznych i immunologicznych. Artykuł ten ma na celu omówienie badań nad interakcją kalmoduliny z białkami docelowymi ze szczególnym uwzględnieniem najnowszych osiągnięć w tej dziedzinie.

## II. Zastosowanie chemicznie zmodyfikowanej kalmoduliny w badaniach jej interakcji z enzymami

Jedną z metod badania interakcji kalmoduliny z aktywowanymi przez nią enzymami stanowi wykorzystanie chemicznie zmodyfikowanej kalmoduliny. Porównanie biologicznej aktywności natywnej i zmodyfikowanej kalmoduliny pozwala wnioskować o wpływie wprowadzonej zmiany, a zatem o roli zmodyfikowanej reszty aminokwasowej w interakcji kalmoduliny z enzymem. Metoda ta ma liczne ograniczenia wynikające chociażby ze słabej reaktywności aminokwasów hydrofobowych oraz trudności w uzyskaniu specyficznej modyfikacji określonych reszt aminokwasowych. Jej stosowanie stwarza również pewną trudność w interpretacji wyników. Często trudno jest bowiem rozstrzygnąć czy zaobserwowane zmiany w aktywności CaM są bezpośrednim następstwem zablokowania grup funkcyjnych aminokwasów, czy też wynikają z wtórnych zmian struktury CaM, albo też — zwłaszcza w przypadku dużych podstawników aromatycznych — są skutkiem sterycznej przeszkody, jaką dla interakcji stanowi wprowadzony związek.

### II-1. Niespecyficznie zmodyfikowana kalmodulina

Większość dotychczas stosowanych metod chemicznej modyfikacji kalmoduliny prowadzi do niespecyficznego modyfikacji jednego rodzaju aminokwasu. Z doświadczeń z tak zmodyfikowaną kalmoduliną wynika, że jedyna reszta histydyny (His 107) oraz dwie reszty tyrozynowe (Tyr 99 i Tyr 138) w cząsteczce kalmoduliny nie są prawdopodobnie bezpośrednio zaangażowane w wiązaniu i aktywacji badanych enzymów. Kalmodulina zawierająca karboetoksyłową pochodną histydyny lub znitrowane reszty tyrozynowe nie wykazuje zmian w aktywacji fosfodwuesterazy cyklicznych nukleotydów (PDE) z serca wołu [34] i cyklazy adenylowej z mózgu [35]. Również kalmodulina zawierająca azydkową pochodną arylową związaną z jedną lub dwiema resztami tyrozyny oraz CaM znakowana jodem w reszcie tyrozynowej stymuluje PDE w tym samym stopniu co CaM natywna [36, 37]. Kalmodulina znakowana jodem zachowuje zdolność wiązania się z wieloma białkami docelowymi i jest powszechnie wykorzystywana do wykrywania białek wiążących kalmodulinę w homogenatach tkanek [37, 38]. Modyfikacja reszt argininy [34, 39], lizyny [34, 35, 40, 41], metioniny [34, 35] oraz aminokwasów kwaśnych [34, 35] w cząsteczce CaM powoduje natomiast znaczne zmiany w jej biologicznej aktywności. Efekt modyfikacji zależy od rodzaju wprowadzonego podstawnika oraz liczby zmodyfikowanych reszt danego aminokwasu w cząsteczce [34, 39] i może się wyrażać zmianą powinowactwa CaM do enzymu, zmianą maksymalnego poziomu stymulacji aktywności enzymatycznej, a w skrajnych przypadkach, nawet utratą zdolności wiązania lub aktywacji enzymu. Należy przy tym podkreślić, że modyfikacja nie powodująca zmiany ładunku reszty aminokwasowej, np. guanidylacja reszt lizyny, ma łagodniejsze skutki niż modyfikacja wywołująca jego zmianę lub neutralizację

Wpływ modyfikacji kalmoduliny na jej powinowactwo i zdolność do aktywacji niektórych enzymów

zmodyf. aminokwas	związana grupa	ilość zmod. reszt	PDE	MLCK (mięś. szkieletowe)	Ca <sup>2+</sup> ATPaza (erytrocyty)	CaN	kinaza NAD	cyklaza adenylowa z mózgu	kinaza fosforylacji	MLKC (mięśnie gładkie)	kinaza białkowa	kinaza białkowa z roślin	piśmienictwo	
Lys	karbamylowa	6.4	41 (2.4)					105 (0.9)					35, 36	
	acetylowa	6.6	100 (6.5)			100 (28)							41	
	metylowa	nd	126 (0.7)									117 (1.6)	42	
	guanidynowa	5.4	100 (0.5)			100 (3)							41	
	fenotiazyna	Lys 148	97 (13)		85 (20)		8 (90)							32
	fenotiazyna	Lys 75	0	0	100 (8)	50 (1)			100 (3)		100 (1.3)		46, 51—53	
Arg	brak metylacji	Lys 115	100	100		100	300						105	
	fenyloglioksal	4			71 (5)					15 (6.5)			40	
	1,2 cykloheksandion	4.2	109 (0.9)					76 (1.3)					35, 36	



c.d. tab. 2

zmodyf. aminokwas	związana grupa	ilość zmod. reszt	PDE	MLCK (mięś. szkieletowe)	Ca <sup>2+</sup> ATPaza (erytrocyty)	CaN	kinaza NAD	cyklaza adenylowa z mózgu	kinaza fosforylasy	MLKC (mięśnie gładkie)	kinaza białkowa	kinaza białkowa z roślin	piśmienictwo
Met	karbo-ksymetylowa	2	55 (1.8)					43 (2.3)					35
Asp Glu	amidowa	20	38 (1.6)					22 (4.5)					35
Zamiana 3 reszt kwasu glutaminowego w poz. 82—84 na reszty lizyny			100 (2.5)	30 (2)			0						75
17 lub 19 zmian w sekwencji aminokwasowej			100 (3)	100		50 (1)			10		60 (1)		74

— zdolność zmodyfikowanej CaM do aktywacji enzymu wyrażono jako stosunek wartości  $V_{max}$  reakcji dla zmodyfikowanej i natywnej CaM  $\times 100\%$   
 — zmianę powinowactwa CaM wobec enzymu wyrażono jako stosunek wartości  $K_m$  lub  $K_a$ , dla zmodyfikowanej i natywnej CaM (wartość podana w nawiasie)

[34, 40, 41]. Wpływ niektórych modyfikacji na biologiczną aktywność kalmoduliny przedstawia tabela 2. Okazuje się, że ta sama modyfikacja kalmoduliny może mieć zupełnie różny efekt na jej powinowactwo i zdolność do aktywacji różnych enzymów. Obserwacje te zwróciły uwagę na różnice w interakcji CaM z poszczególnymi białkami docelowymi.

## II-2. Specyficznie zmodyfikowana kalmodulina

Specyficzną modyfikację jednej lub kilku ściśle określonych reszt aminokwasowych w cząsteczce kalmoduliny można uzyskać wykorzystując chemicznie reaktywne pochodne różnych związków o charakterze hydrofobowym. Ta specyficzność modyfikacji wynika prawdopodobnie z faktu, że związki te wykazują powinowactwo wobec hydrofobowych rejonów cząsteczki, a ich chemicznie reaktywne pochodne reagują z resztami aminokwasowymi znajdującymi się w tych rejonach lub ich najbliższym sąsiedztwie [42]. Wszystkie stosowane dotychczas związki o charakterze hydrofobowym specyficznie znakowały reszty lizyny w pozycji 75, 148 oraz 21 [42—45] lub położone w ich pobliżu reszty metioniny [46], a więc te rejony cząsteczki CaM, które uczestniczą w niekowalencyjnym wiązaniu fenotiazyn i innych hydrofobowych inhibitorów [47—49]. Niezmiernie interesujące wyniki przyniosły badania nad biologiczną aktywnością kalmoduliny z kowalencyjnie związanymi pochodnymi fenotiazyn [42, 45, 50—53]. Fenotiazyny (najlepiej poznana grupa inhibitorów CaM) wiążą się z CaM w obecności jonów wapnia w stosunku 2 : 1 i kompetycyjnie hamują jej interakcję z białkami docelowymi [54, 55]. Na tej podstawie sądzi się, że mogą one wiązać się z tymi samymi co enzymy rejonami cząsteczki kalmoduliny. Jednak kowalencyjne związanie jednej cząsteczki fenotiazyny nie uniemożliwia wiązania się kalmoduliny z enzymami i dopiero związanie drugiej cząsteczki fenotiazyny hamuje interakcję [51—53], lub drastycznie zmniejsza powinowactwo kalmoduliny do enzymów [50]. Kowalencyjne związanie fenotiazyn ma natomiast zasadniczy wpływ na zdolność CaM do wywołania stymulacji aktywności badanych enzymów [42, 45, 50—53] (Tab. 2). Przyłączenie cząsteczki norchloropromazyny do lizyny 75 powoduje, że CaM nie stymuluje aktywności PDE i kinazy lekkich łańcuchów miozyny (MLCK) [51, 52], stymuluje aktywność kalcyneuryny (CaN) tylko do 50% szybkości maksymalnej [52], natomiast w pełni aktywuje kinazę fosforylasy [53], kinazę białkową [53],  $Ca^{2+}$ -ATPazę z błon erytrocytów [45] i bakteryjną cyklazę adenylową [45]. Z kolei modyfikacja reszty lizyny w pozycji 148 [42] sprawia, że kalmodulina jest zupełnie nieaktywna w stosunku do roślinnej kinazy NAD, ale jednocześnie jej aktywność w stosunku do  $Ca^{2+}$ -ATPazy oraz PDE pozostaje praktycznie niezmienną i dopiero związanie drugiej cząsteczki fenotiazyny powoduje dramatyczny spadek powinowactwa CaM do tych enzymów [50]. Wskazuje to na różnice w interakcji CaM z poszczególnymi enzymami. Jedną z możliwych interpretacji tego zjawiska jest założenie, że różne enzymy rozpoznają inne miejsca wiązania w cząsteczce CaM [50]. Jak jednak wytłumaczyć fakt, że

zmodyfikowana CaM wiąże się z enzymem z wysokim powinowactwem, tak jak w przypadku MLCK i PDE, ale nie powoduje stymulacji aktywności enzymatycznej [51, 52]? Oczywiście jest, że samo związanie się kalmoduliny z enzymem nie wystarcza do jego aktywacji. Prawdopodobnie spełniony musi zostać dodatkowy warunek lub warunki aby kalmodulina mogła w pełni przejawić swoją aktywność biologiczną. Być może zmiana konformacji CaM, jaką zaobserwowano podczas jej interakcji z niektórymi peptydami [56, 57] lub inhibitorami [58], ma również istotne znaczenie w interakcji z enzymami. W przypadku CaM zmodyfikowanej przez kowalencyjne związanie fenotiazyny, wiązanie to może uniemożliwiać przyjęcie przez nią określonej konformacji koniecznej dla interakcji z określonym enzymem. Ta sama CaM zachowuje jednak zdolność do maksymalnej stymulacji aktywności innych enzymów co sugeruje, że mogą one oddziaływać z inną konformacyjną formą kalmoduliny. Poparcie hipotezy o różnicach w konformacji CaM mogą stanowić wyniki doświadczeń z przeciwciałem, które z różnym powinowactwem rozpoznaje kalmodulinę w kompleksie z różnymi enzymami [59].

### II-3. Chemiczna modyfikacja kalmoduliny w kompleksie z enzymem

Cenne informacje o rejonach kalmoduliny zaangażowanych w interakcję z enzymami przynoszą doświadczenia nad chemiczną modyfikacją kalmoduliny przeprowadzoną w obecności lub nieobecności związanego z nią enzymu. Pozwalają one bowiem porównać reaktywność określonych reszt aminokwasowych w cząsteczce kalmoduliny, gdy jest ona w formie wolnej lub związanej z enzymem. Dotychczas zbadano w ten sposób wpływ kalcyneuryny [40] oraz MLCK [60] na acetylację reszt lizyny. Kalmodulina w kompleksie z tymi enzymami jest mniej podatna na acetylację w porównaniu z kalmoduliną wolną. W szczególności zmniejsza się podatność na acetylację lizyny w pozycji 75, a także reszt lizyny w pozycjach 21 i 148 [40, 60]. Również związanie  $\beta$ -endorfiny i trójfluoroperazyny przez CaM zmniejsza możliwość acetylacji lizyn w pozycjach 75 i 148 [61]. Nie wiadomo czy spadek reaktywności reszt lizyny w cząsteczce CaM wynika z ich „zasłonięcia” przez związany enzym czy też jest to skutek zmiany konformacji kalmoduliny wywołanej związaniem enzymu. Zmniejszona reaktywność lizyn w pozycjach 21, 75, i 148 pozostaje w zgodzie z wynikami badań krystalograficznych, z których wynika, że C-końcowy fragment kalmoduliny zawierający lizynę 148 znajduje się w sąsiedztwie centralnej  $\alpha$ -helisy zawierającej lizynę 75 [12]. Inne badania dostarczają dowodów na to że, związanie ligandu powoduje zbliżenie się do siebie N- i C- końcowych rejonów cząsteczki CaM [62]. Za ewentualnym udziałem lizyny 75 w interakcji z enzymami przemawia również fakt, że ta reszta aminokwasowa jest 25 razy bardziej podatna na modyfikację wówczas gdy CaM ma związany wapń, a więc gdy jest w formie aktywnej [44, 60].



#### II-4. Zastosowanie azydkowych pochodnych kalmoduliny

Innym, ciekawym podejściem do badania miejsc interakcji kalmoduliny z białkami docelowymi jest wykorzystanie fotoczułych azydkowych pochodnych kalmoduliny. Grupa azydkowa pod wpływem promieni UV może reagować z grupami  $\equiv\text{C-H}$ ,  $-\text{O-H}$ ,  $=\text{N-H}$  z wytworzeniem kowalencyjnych wiązań międzycząsteczkowych i powstaniem nitrenu [63]. Dotychczas metoda ta była szeroko stosowana do wykrywania interakcji zachodzących między dwoma białkami [64], w tym również między kalmoduliną i jej białkami docelowymi [65, 66]. Metodę tę można również wykorzystać do lokalizowania miejsc interakcji, o ile fotoczuła grupa azydkowa znajduje się w znanym miejscu łańcucha polipeptydowego badanego białka. Azydkowa pochodna kalmoduliny w której fotoczuła grupa związana jest z tyrozyną w pozycji 99 tworzy kowalencyjne wiązanie z troponiną I (TNI), PDE i MLCK, natomiast kalmodulina z grupą azydkową związaną z tyrozyną 138 reaguje z TNI i PDE, ale nie reaguje z MLCK [36]. Wydajność sieciowania pomiędzy TNI i PDE a tyrozyną 99 jest znacznie wyższa, niż pomiędzy tymi białkami a tyrozyną 138. Wynika to prawdopodobnie z większej odległości Tyr 138 od miejsca wiązania enzymu, chociaż nie bez wpływu jest zapewne to, że Tyr 138 schowana w „kieszeni hydrofobowej” jest mniej dostępna niż Tyr 99 [12]. Doświadczenia z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko liczącemu siedem aminokwasów fragmentowi łańcucha polipeptydowego kalmoduliny, obejmującemu resztę tyrozyny w pozycji 138 wykazały, że fragment ten nie stanowi miejsca wiązania PDE i kinazy fosforylazy [67]. Stosując CaM z kowalencyjnie związaną biotyną uzyskano również wyniki świadczące o tym, że Lys 75, Lys 94 oraz Tyr 99 znajdują się bliżej miejsca wiązania PDE niż Tyr 138 [45]. Z kolei doświadczenia przeprowadzone tą samą metodą w badaniu ATPazy dyneiny z rzęstek *Tetrahymena* [68] i innych białek [37] wykazują, że mogą one mieć inne niż PDE miejsca wiązania w cząsteczce kalmoduliny.

#### III. Biologiczna aktywność naturalnie występujących izoform oraz genetycznie zmienionej kalmoduliny

Zanim możliwa stała się ingerencja w pierwszorzędowną strukturę kalmoduliny zgromadzono wiele danych o funkcjonalnych różnicach pomiędzy CaM pochodzącą z różnych organizmów. Należy zaznaczyć, że kalmodulina jest białkiem konserwatywnym. CaM wyizolowana z tkanek ssaków, ptaków i płazów różni się jedynie stopniem amidacji [69, 70–74], a otrzymana z organu elektrycznego węgorza ma tylko jeden zamieniony aminokwas [75]. Od kilku do kilkunastu zmian w sekwencji aminokwasowej w porównaniu z CaM kręgowców wykazuje kalmodulina pochodząca z *Tetrahymena* [76], *Chlamydomonas reinhardtii* [77, 78], *Dictyostelium discoideum* [79], *Metridium senile* [80], *Paramecium* [81] oraz CaM z roślin [82, 83]. Najwięcej różnic w sekwencji i tylko

60% homologii z kalmoduliną kręgowców wykazuje CaM wyizolowana z drożdży [84]. Większość różnic w sekwencji aminokwasowej CaM powstała na skutek zmiany jednej zasady w trójkowym kodonie DNA [82].

Kalmoduliny pochodzące ze szpinaku [85], owsa [83], orzeszka ziemnego [86], *Chlamydomonas* [87], *Dictyostelium* [79] i drożdży [88] stymulują aktywność fosfodwuesterazy cyklicznych nukleotydów w identycznym stopniu jak kalmoduliny kręgowców jakkolwiek z różnym powinowactwem. Natomiast znaczne różnice w biologicznej aktywności kalmodulin otrzymanych z różnych źródeł wykazano porównując ich zdolność do stymulowania aktywności MLCK z żółądka kury [89], roślinnej kinazy NAD [79, 89—91], cyklazy guanidylowej z *Paramecium* [92], cyklazy guanidylowej z *Tetrahymena* [93] oraz kanału potasowego zależnego od wapnia ze zmutowanej formy *Paramecium* [81, 94]. Tylko w niewielu wypadkach wiadomo jaka zmiana w strukturze pierwszorzędowej CaM odpowiedzialna jest za różnice w jej biologicznej aktywności. Defekt aktywności kanału potasowego zaobserwowany u mutantu *Paramecium* spowodowany jest tym, że CaM pochodząca z tego mutantu różni się od CaM ze szczepu dzikiego jedną resztą aminokwasową [95]. Defekt aktywności kanału może być usunięty przez wstrzyknięcie do komórki kalmoduliny ze szczepu dzikiego [96], natomiast kalmodulina pochodząca z innych organizmów tylko w niewielkim stopniu lub w ogóle nie jest w stanie wywołać tego efektu [81]. Zmianą w jednej reszcie aminokwasowej CaM spowodowane są także różnice w jej zdolności do stymulowania aktywności kinazy NAD. I tak, różne kalmoduliny, których wspólną cechą jest obecność w pozycji 115 lizyny z wolną grupą ε-aminową mogą stymulować aktywność tego enzymu do kilkukrotnie wyższego poziomu [79, 89—91]. W cząsteczce kalmoduliny kręgowców i kalmoduliny pochodzącej z wielu innych organizmów w pozycji tej znajduje się trójmetyloliżyna. Fizjologiczne znaczenie metylacji lizyny 115 nie zostało w pełni wyjaśnione [97], jakkolwiek sugeruje się, że ta posttranslacyjna modyfikacja może chronić kalmodulinę przed proteolizą [79, 98, 99]. Przeprowadzona *in vitro* metylacja lizyny w pozycji 115 nie zmienia poziomu aktywacji PDE, natomiast trzykrotnie obniża zdolność CaM do stymulacji aktywności kinazy NAD [100]. Zamiana lizyny 115 na argininę nie powoduje natomiast żadnych zmian we właściwościach CaM [100].

Zastosowanie metod inżynierii genetycznej w badaniach kalmoduliny i jej interakcji z białkami datuje się dopiero od niedawna. Metody te, z zastosowaniem cDNA komplementarnego do mRNA CaM, przyczyniły się między innymi do poznania pierwszorzędowej struktury kalmoduliny pochodzącej z różnych źródeł [69, 91, 101, 102]. Zastosowanie techniki rekombinacji i mutagenyzy pozwala również na ingerencję w sekwencję cDNA lub sztucznie zsyntetyzowanego DNA kodującego kalmodulinę, co umożliwiłoby uzyskiwanie zmian w jej strukturze pierwszorzędowej. Porównanie aktywności kalmoduliny zawierającej określone substytucje aminokwasowe z CaM natywną dostarcza wielu informacji o roli poszczególnych reszt aminokwasowych w oddziaływaniach z enzymami [103—105]. Metody inżynierii genetycznej mają zasadniczą przewagę nad



opisaną wcześniej chemiczną modyfikacją kalmoduliny, ponieważ pozwalają na dokonanie zamiany wybranej reszty aminokwasowej; wykluczają także możliwość ewentualnych zaburzeń w interakcji spowodowanych przez steryczne przeszkody, jakimi mogą być podstawniki w chemicznie zmodyfikowanej kalmodulinie.

Poprzez rekombinację klonowanego w bakteriach genu CaM kury z pseudogenem zawierającym 19 substytucji aminokwasowych otrzymano kalmodulinę zawierającą odpowiednio 3 (CaM-3), 16 [CaM-16] i 19 (CaM-19) substytucji aminokwasowych w cząsteczce w porównaniu z kalmoduliną kury [104]. Aktywność biologiczna CaM-3 jest taka sama jak natywnej kalmoduliny. CaM-16 i CaM-19 stymulują aktywność PDE i MLCK z mięśni szkieletowych i gładkich do takiej samej szybkości maksymalnej jak natywna kalmodulina wykazując niewielki, bo trzykrotny spadek powinowactwa wobec tych enzymów. Jednocześnie CaM 16 oraz CaM 19 są w stanie spowodować wzrost aktywności kalcyneuryny, kinazy białkowej i kinazy fosforylasy tylko o 50, 60 i 10% [104] (Tab. 2). Inną zmianą w pierwszorzędowej strukturze CaM jaką udało się wywołać stosując metody inżynierii genetycznej było zastąpienie trzech ujemnie naładowanych reszt kwasu glutaminowego w pozycji 82-84 przez trzy reszty lizyny (VU-8 CaM) [105]. Tak zmieniona kalmodulina zachowuje zdolność maksymalnej stymulacji PDE. MLCK stymuluje tylko do 30% szybkości maksymalnej i nie jest w stanie aktywować kinazy NAD. W tym ostatnim przypadku CaM prawdopodobnie w ogóle nie wiąże się z enzymem [105]. Opisane wyżej przykłady wskazują, że zamiana jednego lub kilku aminokwasów w cząsteczce CaM może mieć zasadniczy wpływ na jej interakcję z pewnymi enzymami, nie mając prawdopodobnie żadnego efektu na interakcję z innymi enzymami. Nie wiadomo jednak czy różnice w biologicznej aktywności CaM w stosunku do różnych białek docelowych wynikają bezpośrednio ze zmiany istotnej reszty aminokwasowej, czy też są rezultatem zmian konformacji kalmoduliny wywołanych zmianami w jej strukturze pierwszorzędowej [104, 105]. Różnice te mogą więc wynikać z innych miejsc wiązania tych białek lub/i z różnic w optymalnej dla każdego enzymu konformacji kalmoduliny.

#### **IV. Struktura i biologiczna aktywność fragmentów kalmoduliny**

Poddając kalmodulinę działaniu trypsyny w kontrolowanych warunkach można doprowadzić do jej strawienia na fragmenty (106, 107). Jeżeli trawienie przeprowadza się w obecności jonów wapnia to hydrolizie ulega wiązanie Lys 77-Met 78 w wyniku czego powstają dwa fragmenty: N-końcowy fragment 1-77 i C-końcowy fragment 78-148, odpowiadające niemal dokładnie dwóm połówkom cząsteczki kalmoduliny. Każdy z tych fragmentów zawiera dwie domeny wiążące wapń. W nieobecności jonów wapnia trawienie ma miejsce pomiędzy arginina 106 a histydyna 107. Powstaje wówczas fragment 1-106 zawierający trzy domeny wapniowe, przy czym domena III jest niekompletna, oraz fragment



107-148 z jedną domeną wiążącą wapń [106, 107]. Liczne badania wykazały, że fragmenty 1-77 i 78-148 zachowują strukturę taką, jaką miały w natywnej cząsteczce kalmoduliny [108—111], mogą więc być uważane za odpowiedniki tych rejonów natywnej kalmoduliny i w związku z tym stanowić doskonały instrument badań nad lokalizacją miejsc wiązania enzymów z kalmoduliną. Początkowo prace z użyciem fragmentów dotyczyły głównie ich zdolności do stymulowania aktywności enzymów zależnych od CaM [107, 112—114]. Stwierdzono wówczas, że powinowactwo fragmentów kalmoduliny do enzymów jest wielokrotnie, czasami nawet o kilka rzędów wielkości niższe niż natywnej kalmoduliny. Dlatego też w niektórych przypadkach aktywacja enzymu widoczna przy wysokich stężeniach fragmentu mogła być spowodowana minimalnym nawet zanieczyszczeniem preparatu fragmentu niestrawioną kalmoduliną. Trudności z interpretacją takich wyników spowodowały pewien impas w badaniach z użyciem fragmentów kalmoduliny. Do jego przełamania przyczyniło się zastosowanie HPLC do rozdzielania fragmentów. Dało to gwarancję usunięcia śladowych ilości kalmoduliny [115]. Rozpoczęto także badania nad wiązaniem się fragmentów kalmoduliny z jej białkami docelowymi [115—117]. W ten sposób można było wykazać interakcję fragmentu CaM z enzymem nawet wówczas, gdy nie wyrażała się ona wzrostem aktywności enzymu.

Wyniki doświadczeń nad wiązaniem się fragmentów kalmoduliny i ich zdolnością do aktywacji niektórych enzymów przedstawia tabela 3. Fragment

Tabela 3

Zdolność proteolitycznych fragmentów CaM do interakcji z białkami docelowymi

Fragment Enzym	1—77		78—148		1—106		Piśmiennictwo
	W	A	W	A	W	A	
Ca <sup>2+</sup> -ATPaza (erytrocyty)	+	—	+	+	+	+	116, 118
PDE	+	—	+	—			115, 117
kalcyneuryna	—	—	+	—			115, 117
MLCK (mięśnie gładkie)	—	—	+	—			37, 116, 117
kinaza fosforylazy		+		+		+	113
kinaza zal. od CaM	—		+				117
kinaza fosfolambanu z SR serca		—		—			121
cyklaza guanidylowa z <i>Paramecium</i>		+		+		+	119
fodryna	—		+				117
melityna	+		+				120

+, — oznaczają odpowiednio występowanie lub brak wiązania (W) lub aktywacji (A) enzymu

78-148 zachowuje zdolność wiązania się ze wszystkimi badanymi białkami docelowymi kalmoduliny, a więc w tej części cząsteczki kalmoduliny znajduje się miejsce (miejsca) interakcji z białkami docelowymi. Fragment 1-77 natomiast ma zdolność wiązania się tylko z niektórymi spośród badanych białek. Pośród zbadanych dotychczas enzymów są takie, których aktywność wzrasta pod wpływem związania fragmentu, np.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza z erytrocytów [116, 118], kinaza fosforylasy [113], cyklaza guanidyłowa z *Paramecium* [119] oraz inne np. MLCK [114, 116], PDE [115], kalcyneuryna [115], w przypadku których związanie fragmentu kalmoduliny nie jest warunkiem wystarczającym do stymulacji aktywności.

Zdolność interakcji niektórych enzymów zarówno z fragmentem 1-77 jak i 78-148 stanowi bezpośredni dowód obecności co najmniej dwóch miejsc wiązania enzymów w cząsteczce kalmoduliny. Niższe niż w przypadku kalmoduliny stałe wiązania kompleksu enzym-fragment świadczą, że pomimo zachowania miejsca lub miejsc wiązania, powinowactwo fragmentów kalmoduliny do jej enzymów docelowych drastycznie spada. Można więc sądzić, że w natywnej cząsteczce CaM, procesowi wiązania z enzymem towarzyszy silna pozytywna kooperacja pomiędzy różnymi rejonami cząsteczki. Kooperację taką zaobserwowano w procesie wiązania się kalmoduliny z niektórymi inhibitorami [122, 123] i peptydami [124]. Efekt kooperacji nie występuje w przypadku interakcji enzym-fragment, co może być przyczyną spadku powinowactwa.

## V. Struktura i właściwości krótkich peptydów wiążących kalmodulinę

Ze względu na trudności związane z sekwencjonowaniem dużych cząsteczek białkowych, przez szereg lat nie wiedziano praktycznie nic o strukturze domen odpowiedzialnych za wiązanie kalmoduliny w aktywowanych przez nią enzymach. Dlatego też niezwykle interesujące i ważne było spostrzeżenie, że hormon adrenokortykotropowy (ACTH) oraz  $\beta$ -endorfina, jeden z peptydów opioidowych, hamowały aktywację PDE współzawodnicząc z enzymem o kalmodulinę [125]. W bardzo krótkim czasie poznano szereg innych biologicznie aktywnych peptydów wiążących się z CaM *in vitro*. Należą do nich peptydy takie jak: glukagon, sekretyna, peptyd jelitowy (VIP), peptyd żołądkowy (GIP) [126, 127], dynorfiny [127, 128], melityna — składnik jadu pszczoł [129, 130] oraz mastoparan — składniki jadu os [130—132]. Ogółem opisano dotychczas około 50 takich peptydów [133]. Wiążą się one z kalmoduliną w obecności jonów wapnia ze stałymi dysocjacji od kilku mikromoli ( $\beta$ -endorfina) do kilku nawet dziesiątych części nanomola w przypadku mastoparanów i melityny [129, 131, 133]. W tym ostatnim przypadku stałe dysocjacji porównywalne są ze stałymi dysocjacji kompleksu CaM-enzym. Stechiometria wiązania peptydu z kalmoduliną wynosi 1:1 i 2:1 odpowiednio dla peptydów o wysokim i niskim powinowactwie. Krótkie peptydy mają również zdolność hamowania *in vitro* wywołanej przez kalmodulinę aktywacji enzymów [129—131, 134].

Ze względu na niewielką długość i znaną sekwencję aminokwasową opisane wyżej peptydy okazały się bardzo użytecznym narzędziem w badaniach procesu wiązania kalmoduliny z białkami. Stało się bowiem jasne, że w ich prostej strukturze zawarte są wszystkie elementy niezbędne do interakcji z kalmoduliną i prawdopodobnie charakterystyczne również dla domen wiążących CaM w białkach. Jednym z celów badań nad tymi peptydami było określenie minimalnego odcinka aminokwasowego zdolnego do wiązania kalmoduliny z wysokim powinowactwem. Porównując stałe wiązania pomiędzy kalmoduliną a fragmentami ACTH [135],  $\beta$ -endorfiny [135, 136] i dynorfiny [128, 131, 135] ustalono pewne charakterystyczne elementy strukturalne wspólne dla wszystkich tych fragmentów. Fragmenty badanych peptydów wiążące CaM z  $K_d < 10 \mu\text{M}$  cechowała uderzająco niska zawartość reszt kwasu glutaminowego, podczas gdy zawartość glutaminy, argininy i lizyny była wyższa niż przeciętna [127, 133]. Wysłunięto przypuszczenie, że do wiązania kalmoduliny niezbędna jest obecność trzech zasadowych reszt aminokwasowych i, położonych o dwie pozycje dalej, dwóch reszt aminokwasów hydrofobowych [126]. Taka struktura odpowiada — jeżeli chodzi o rozkład ładunków i rejonów hydrofobowych — strukturze najbardziej efektywnie wiążących kalmodulinę fenotiazyn i innych związków farmakologicznych [137]. Jakkolwiek nie wszystkie peptydy wiążące CaM posiadają taką właśnie strukturę to charakteryzuje je pewna regularność występowania reszt aminokwasów zasadowych i hydrofobowych (Ryc. 3). Szereg

		Stała dysocjacji (nM)
1	I N L <span style="border: 1px solid black;">K</span> A L A A L A <span style="border: 1px solid black;">K</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> I L	0.3
2	I N W <span style="border: 1px solid black;">K</span> G I A A M A <span style="border: 1px solid black;">K</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> I L	0.9
3	G A V L <span style="border: 1px solid black;">K</span> V L T T G L P A L	3.0
4	<span style="border: 1px solid black;">L</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> L L <span style="border: 1px solid black;">L</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> L L <span style="border: 1px solid black;">K</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> L L <span style="border: 1px solid black;">L</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> L	3.0
5	M A V <span style="border: 1px solid black;">K</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> Y L N S I L N	50
6	I <span style="border: 1px solid black;">R</span> Q Q D F V N W L L A Q Q	70
7	F <span style="border: 1px solid black;">K</span> N A I I <span style="border: 1px solid black;">K</span> N A T <span style="border: 1px solid black;">K</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> G N	> 70
8	A G N P T V <span style="border: 1px solid black;">K</span> V P <span style="border: 1px solid black;">R</span> <span style="border: 1px solid black;">R</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> <span style="border: 1px solid black;">K</span> N	
9	M L W Q V F Q G A <span style="border: 1px solid black;">R</span> <span style="border: 1px solid black;">R</span> S D L	

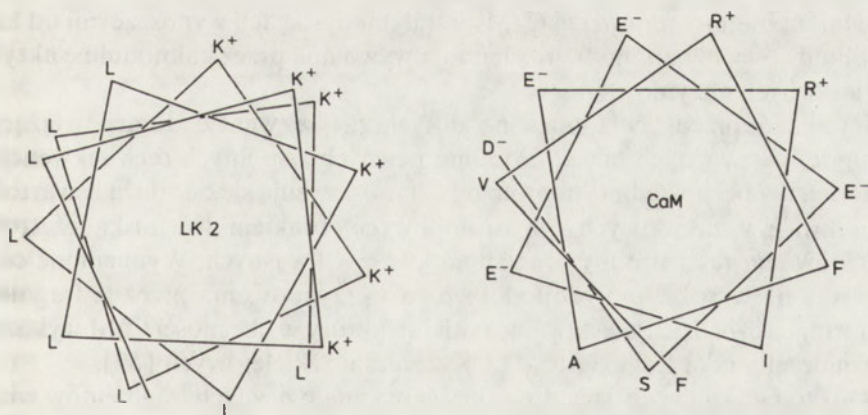
**Ryc. 3.** Sekwencja aminokwasowa niektórych peptydów wiążących kalmodulinę. 1. mastoparan; 2. mastoparan X; 3. melityna; 4. syntetyczny peptyd LK<sub>2</sub>; 5. VIP; 6. GIP; 7.  $\beta$ -endorfina (13–18) 8. ACTH (14–27); 9. glukagon (14–27). Kwadratami oznaczone zostały reszty aminokwasów zasadowych.

obserwacji potwierdziło istotność dodatnich ładunków w peptydach w ich interakcji z kalmoduliną. Na przykład fragmenty  $\beta$ -endorfiny pozbawione kilku reszt aminokwasów zasadowych znacznie słabiej antagonizowały aktywację



PDE przez CaM [136] zaś acetylacja reszt lizyny w melitynie i mastoparanie powodowała znaczny spadek ich powinowactwa wobec kalmoduliny [128, 133]. Stwierdzono, że niektóre zasadowe peptydy wykazują zdolność wiązania się z CaM [138] jakkolwiek inne, np. polilizyna nie mają tej właściwości [126]. Można więc sądzić, że obecność aminokwasów zasadowych jest koniecznym, ale nie wystarczającym warunkiem, aby peptyd wiązał kalmodulinę.

Badania nad interakcją CaM z mastoparanami i melityną wzbogaciły dotychczasowe wiadomości o nowe dane. Wyróżniającą cechą tych peptydów jest ich zdolność przybierania konformacji  $\alpha$ -helisy w obecności CaM. W strukturze drugorzędowej melityny w formie  $\alpha$ -helisy występuje tylko 5% łańcucha aminokwasowego; pod wpływem związania z CaM udział  $\alpha$ -helisy wzrasta do 70% [139]. Powstająca w melitynie po związaniu z kalmoduliną  $\alpha$ -helisa ma charakter amfifilowy, tzn. aminokwasy zasadowe i hydrofobowe umieszczone są po przeciwnych stronach struktury helikalnej. Odpowiada to takiej strukturze pierwszorzędowej, w której reszty aminokwasów zasadowych i hydrofobowych występują średnio co 3.6 pozycji. Strukturę  $\alpha$ -helisy pod wpływem wiązania z CaM tworzą również mastoparany, VIP, GIP i sekretyna [140]. Zsyntetyzowano sztuczne peptydy o takiej sekwencji, która determinuje powstanie idealnej amfifilowej  $\alpha$ -helisy. Liczący siedem aminokwasów peptyd Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Leu jest zbyt krótki by utworzyć stabilną  $\alpha$ -helisę i w związku z tym słabo wiąże CaM, natomiast dwa razy dłuższy peptyd o takiej samej sekwencji wiąże CaM ze stałą wiązania porównywalną do melityny [141, 142]. Inny syntetyczny peptyd o strukturze amfifilowej  $\alpha$ -helisy, ale o charakterze kwaśnym w ogóle nie oddziałuje z CaM, podczas gdy  $\delta$ -hemolizyna, tworząca  $\alpha$ -helisę o charakterze neutralnym, wykazuje słabą interakcję [141, 142]. Autorzy sugerują, że amfifilowa helisa peptydów może wiązać się z jedną z kwasnych



Ryc. 4. Schemat interakcji pomiędzy amfifilowymi peptydami (LK<sub>2</sub>) i jednym z fragmentów  $\alpha$ -helisy kalmoduliny. Elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy przeciwnie naładowanymi helisami stabilizowane są dehydracją reszt aminokwasów hydrofobowych. Znaki +, - oznaczają dodatnio i ujemnie naładowane reszty aminokwasowe.

$\alpha$ -helis w cząsteczce CaM, poprzez elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy przeciwnie naładowanymi helisami, stabilizowane dehydracją reszt hydrofobowych [142]. Ze względów energetycznych najkorzystniejsze jest antyrównoległe ułożenie struktur helikalnych. Przykład takiej interakcji przedstawia rycina 4. Jednak przykłady  $\beta$ -endorfiny [125], gramicydyny S [124] oraz innych peptydów wiążących kalmodulinę, a nie tworzących  $\alpha$ -helisy wykazują, że struktura ta nie jest niezbędnym warunkiem umożliwiającym wiązanie, niemniej jednak stanowi jeden z czynników determinujących wysokie powinowactwo peptydu do kalmoduliny.

## VI. Domeny wiążące kalmodulinę w białkach docelowych

Logiczną konsekwencją poznania sekwencji krótkich peptydów wiążących kalmodulinę i określenia ich wspólnych właściwości umożliwiających to wiązanie, stały się poszukiwania analogicznych rejonów aminokwasowych w białkach wiążących kalmodulinę. Badania takie rozpoczęto dopiero kilka lat temu, ale znane są już w kilku enzymach i białkach nieenzymatycznych sekwencje fragmentów wiążących kalmodulinę.

Stosując różne metody trawienia wyizolowano i określono sekwencje fragmentów wiążących CaM z kinazy lekkich łańcuchów miozyny (MLCK) z mięśni szkieletowych [143], MLCK z mięśni gładkich [144], fosfofruktokinazy [145] oraz  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy z erytrocytów [146]. Z kolei, znając sekwencję aminokwasową lub sekwencję zasad DNA czy cDNA, znaleziono analogiczne fragmenty w cząsteczce  $\gamma$ -podjednostki kinazy fosforylasy [144], CaM-zależnej kinazy II [147], MLCK z mięśni gładkich [148] oraz termostabilnego białkowego inhibitora kinazy zależnej od cAMP [149]. Wykazano, że w przypadku każdego z wymienionych białek, sztuczne peptydy o sekwencjach odpowiadających takim fragmentom wiążą CaM ze stałymi dysocjacji wynoszącymi od kilku do kilkudziesięciu nanomoli oraz hamują wywołaną przez kalmodulinę aktywację natywnych enzymów.

Rycina 5 przedstawia poznane dotychczas sekwencje domen wiążących kalmodulinę z różnych białek. Pomimo pewnych wspólnych cech sekwencje te nie wykazują bezpośredniej homologii. Charakteryzują się one dużą zawartością aminokwasów zasadowych i hydrofobowych, brakiem lub niską częstością występowania reszt proliny oraz aminokwasów kwaśnych. Wymienione cechy wskazują na wysokie prawdopodobieństwo przyjmowania przez te fragmenty konformacji  $\alpha$ -helisy. Powstawanie takiej struktury w obecności CaM wykazano doświadczalnie dla fragmentu MLCK z mięśni szkieletowych [57].

Doskonałą sondą służącą do wykrywania analogicznych fragmentów wiążących CaM w innych białkach i określania stopnia ich podobieństwa są oczywiście przeciwciała. Poliklonalne przeciwciała przeciwko melitynie rozpoznaje niektóre białka wiążące kalmodulinę z organu elektrycznego węgorka [150]. Natomiast



	Stała dysocjacji (nM)
K K Y M A R R K W Q K T G H A V R A I G R L S S S	1.6
K R R W K K N F I A V S A A N R F K K I S S S G A L M	0.9
K K F N A R R K L K G A I L T T M L A T R N F S G	
R R V K P V T R E I V I R D P Y A L R P L R R L	20
K L R G R S F M N N W E V Y K L L A H I R P P A P K S G S Y T V A V M	11.4
G L R R G G I L W F R G L N R I Q T Q I K V V N A F S S S L H E F	
I A S G R T G R R N A I H D I L V S S A	70

**Ryc. 5.** Sekwencje aminokwasowe domen wiążących CaM w białkach. 1. MLCK z mięśni gładkich (146, 150); 2. MLCK z mięśni szkieletowych (145); 3. Kinaza zależna od CaM (149); 4.  $\gamma$ -podjednostka kinazy fosforylasy (146); 5. fosfofruktokinaza (147); 6.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza z erytrocytów (148); 7. inhibitor kinazy zależnej od cAMP (151). Kwadratami oznaczone zostały reszty aminokwasów zasadowych.

monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko wiążącej CaM domenie z MLCK mięśni szkieletowych nie rozpoznaje żadnego innego enzymu, czy peptydu [151]. Dalsze badania z użyciem przeciwciał pozwolą zapewne na rozstrzygnięcie, czy i w jakim stopniu domeny wiążące kalmodulinę w różnych białkach wykazują strukturalne podobieństwa. Być może różnice w strukturze tych domen są bezpośrednią przyczyną różnic w powinowactwie enzymów do CaM.

Ostatnie badania zwróciły uwagę na pewien ciekawy aspekt budowy fragmentów wiążących kalmodulinę w cząsteczce MLCK z mięśni szkieletowych i gładkich. Wykazano mianowicie ich podobieństwo do substratu MLCK czyli lekkich łańcuchów miozyny [152, 153]. Syntetyczny peptyd wzorowany na domenie wiążącej CaM z MLCK mięśni szkieletowych nie tylko współzawodniczy z enzymem o kalmodulinę, ale również hamuje aktywność niezależnego już od CaM, chymotrypsynowego fragmentu tego enzymu, współzawodnicząc z właściwym substratem o centrum aktywne (z wartością  $K_m$ , zbliżoną do wartości  $K_m$  substratu) [152]. Co więcej, zastąpienie trzech aminokwasów w tym fragmencie trzema resztami seryny sprawia, że może on być fosforylowany przez MLCK, chociaż aktywność specyficzna enzymu jest wówczas 1000-krotnie mniejsza niż dla właściwego substratu. Dodanie CaM hamuje inhibicję enzymu i fosforylację fragmentu [152]. Podobne wyniki uzyskano badając MLCK z mięśni gładkich [153]. Autorzy sugerują, że zjawisko autoinhibicji przez fragment enzymu o budowie pseudosubstratu może cechować nie tylko enzymy aktywowane przez CaM.

Fragmenty pochodzące z różnych białek docelowych kalmoduliny mogą, jak wyżej wykazano, mieć zdolność zarówno wiązania CaM jak i hamowania aktywacji enzymów. Niektóre wyniki sugerują, że można z nich wyróżnić dwie różne, sąsiadujące ze sobą domeny, z których jedna odpowiedzialna jest za



wiązanie CaM, a druga stanowi właściwą domenę inhibitorową. W przypadku  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy z erytrocytów [154, 155] i PDE z mózgu [156] wykazano, że na pewnym etapie proteolizy wzrostowi ich aktywności nie towarzyszy utrata zdolności wiązania CaM [154, 156]. Sugeruje to, że odtrawieniu ulega najpierw fragment inhibitorowy. Natomiast łagodna proteoliza MLCK z mięśni gładkich prowadzi do uzyskania nieaktywnego, niewrażliwego na CaM enzymu, który staje się aktywny pod wpływem dalszego trawienia [157, 158]. W tym przypadku odtrawieniu ulega najpierw fragment wiążący CaM a następnie fragment blokujący centrum aktywne enzymu.

## VII. Podsumowanie

Kalmodulina wiąże się ze ściśle określonym odcinkiem w łańcuchu aminokwasowym białka docelowego. Odcinek ten ma długość 20—30 aminokwasów, co odpowiada masie ok. 3—4 kDa. Fragmenty wiążące kalmodulinę z różnych białek charakteryzują się wysoką zawartością aminokwasów hydrofobowych i zasadowych oraz zdolnością do tworzenia amfifilowej  $\alpha$ -helisy, ale ich sekwencje aminokwasowe nie są identyczne. Położenie tych fragmentów w łańcuchu aminokwasowym białka docelowego jest różne w różnych białkach.

Lokalizacja miejsc(a) wiązania enzymów w cząsteczce CaM pozostaje nadal nieznaną. Wiele danych doświadczalnych wskazuje na obecność w cząsteczce kalmoduliny więcej niż jednego miejsca wiązania z białkami. Prawdopodobnie tworzeniu się kompleksu kalmoduliny z białkiem docelowym towarzyszy pozytywna kooperacja pomiędzy tymi miejscami. Sugeruje się również, że różne enzymy mogą rozpoznawać różne miejsca wiązania w cząsteczce kalmoduliny. Najczęściej postuluje się, że w interakcji z enzymami zaangażowane są, rozpoznawane również przez inhibitory, dwie hydrofobowe domeny w N-końcowej i C-końcowej części cząsteczki CaM. Innym ciekawym aspektem tworzenia się kompleksu CaM-enzym jest zachodząca wówczas zmiana konformacji kalmoduliny i jej znaczenie dla interakcji. O całej złożoności i różnorodności interakcji CaM z jej białkami docelowymi może świadczyć fakt, że każdy ze zbadanych dotychczas enzymów reaguje w inny sposób na zmiany w strukturze CaM (Tab. 2.).

Należy dodać, że na tworzenie się kompleksu CaM-enzym *in vivo* wpływać może wiele różnych czynników. Znany jest na przykład efekt wzrostu powinowactwa kalmoduliny wobec enzymu, gdy enzym ten ma związany substrat [159]. Z kolei obecność enzymu zwiększa powinowactwo CaM wobec wapnia i ułatwia jego wiązanie [62, 160, 161]. W ten sposób obecność substratu danego enzymu może powodować preferencyjne wiązanie się kalmoduliny z tym właśnie enzymem. Czynnikiem regulującym interakcję CaM-enzym mogą okazać się fosforylacja [167, 168], karboksymetylacja [169—171] i inne posttranslacyjne modyfikacje kalmoduliny. Wymienione powyżej czynniki, jak i zapewne wiele

innych modulatorów działania kalmoduliny tworzą w efekcie bardzo elastyczny system reagujący różnokierunkowo na minimalne nawet zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia.

Artykuł nadesłano 18 kwietnia 1988 r.

Zaakceptowano do druku 9 września 1988 r.

## PIŚMIENICTWO

1. Kretsinger R.H., (1979), *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **11**, 1—26.
2. Lin M., Liu Y.P., Cheung W.Y., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4943—4954.
3. Dedman J.R., Potter J.D., Jackson R.L., Johnson J.O., Means A.R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8415—8422.
4. Klee C.B., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1017—1024.
5. Liu Y.P., Cheung W.Y., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4193—4198.
6. LaPorte D.W., Wierman B.M., Storm D.R., (1980), *Biochemistry*, **19**, 3814—3919.
7. Andreassen T.J., Luetje C.W., Heideman W., Strom D.R., (1983), *Biochemistry*, **22**, 4615—4618.
8. Glenney J.R. Jr., Weber K., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10551—10554.
9. Klee C.B., Vanaman T.C., (1982), *Adv. Protein Chem.*, **35**, 213—321.
10. Manalan A.S., Klee C.B., (1984), *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, **18**, 227—278.
11. Cheung W.Y., (1980), *Science*, **207**, 19—27.
12. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 265—290.
13. Babu S., Sack J.S., Greenhough T.G., Bugg C.E., Means A.R., Cook W.J., (1985), *Nature*, **315**, 37—40.
14. Gietzen K., Sadorf I., Bader H., (1982), *Biochem. J.*, **207**, 541—549.
15. Levin R.M., Weiss B., (1979), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **208**, 454—459.
16. Gietzen K., Mansard A., Bader H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 674—681.
17. Volpi M., Sha'afi R.I., Epstein P.M., Andrenyak D.M., Feinstein M.B., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 795—799.
18. Tanaka T., Hidaka H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11078—11080.
19. Wolff J., Brostrom C.O., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 720—731.
20. Depaoli-Roach A.A., Gibbs J.B., Roach P.J., (1979), *FEBS Lett.*, **105**, 321—324.
21. Stieger J., Schatzmann H.J., (1981), *Cell Calcium*, **2**, 601—616.
22. Niggli V., Adunyah E.S., Penniston J.T., Carafoli E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 394—401.
23. Blumenthal D.K., Stull J.T., (1982), *Biochemistry*, **21**, 2386—2391.
24. Cheung W.Y., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2859—2869.
25. Sakai T., Yamamoto H., Tanaka R., Makino H., Histaka K., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 121—134.
26. Tucker M.M., Robinson J.B. Jr., Stellwagen E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9051—9058.
27. Krinks M.H., Haeiech J., Rhoads A., Klee C.B., (1984), *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **16**, 31—47.
28. Walsh M.P., Dąbrowska R., Hinkins S., Hartshorne D.J., (1982), *Biochemistry*, **21**, 1919—1925.
29. Sarkadi B., Enyedi A., Gardos G., (1980), *Cell Calcium*, **1**, 278—294.
30. Niggli V., Adunyah E.S., Carafoli E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8588—8592.
31. Meijer L., Guerrier P., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **702**, 143—146.

32. Huang C.Y., Chau V., Chock P.B., Wang J.H., Sharma R.K., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 871—874.
33. Cox J.A., Malnoe A., Stein E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3218—3222.
34. Walsh M., Stevens F.C., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2742—2749.
35. Thiry P., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., Rathe J., Christophe J., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 409—414.
36. Klevit R.E., Vanaman T.C., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 15414—15424.
37. Graf E., Filoteo A.G., Penniston J.T., (1980), *Arch. Biochim. Biophys.*, **203**, 719—726.
38. Bartelt D.C., Wolff D.J., Sheele G.A., (1986), *Biochem. J.*, **240**, 753—763.
39. Molla A., Hincke M.T., Katz S., Lazaro R., (1983), *Biochem. J.*, **215**, 475—482.
40. Manalan A.S., Klee C.B., (1987), *Biochemistry*, **26**, 1382—1390.
41. Tertrin-Clary C., Chenut M.G., de la Llosa P., (1987), *Int. J. Biochem.*, **19**, 949—955.
42. Faust F.M., Slisz M., Jarret H.W., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1938—1941.
43. Jackson A.E., Puett D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14985—14992.
44. Mann D., Vanaman T.C., (1987), *Methods Enzymol.*, **139**, 417—433.
45. Newton D.L., Burke T.R.Jr., Rice K.C., Klee C.B., (1987), *Methods Enzymol.*, **139**, 405—417.
46. Lukas T.J., Marshak D.R., Watterson D.M., (1985), *Biochemistry*, **24**, 151—157.
47. Klevit R.E., Levine B.A., Williams R.J.P., (1981), *FEBS Lett.*, **123**, 25—29.
48. Strynadka N.C.J., James M.N.G., (1988), *Proteins*, **3**, 1—17.
49. Gariepy J., Hodges R.S., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1586—1597.
50. Jarret H.W., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 4967—4972.
51. Newton D.L., Burke T.R.Jr., Rice K.C., Klee C.B., (1983), *Biochemistry*, **22**, 5472—5476.
52. Newton D.L., Klee C.B., (1984), *FEBS Lett.*, **165**, 269—272.
53. Newton D.L., Klee C.B., Woodgett J., Cohen P., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **845**, 533—539.
54. Levin R.M., Weiss B., (1977), *Mol. Pharmacol.*, **13**, 690—697.
55. Prozialeck W.C., Weiss B., (1982), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **222**, 509—516.
56. Seeholzer S.H., Cohn M., Putkey J.A., Means A.R., Crepsi H.L., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3634—3638.
57. Klevit R.A., Blumenthal D.K., Wemmer D.E., Krebs E.G., (1985), *Biochemistry*, **24**, 8152—8157.
58. Dalgarno D.C., Klevit R.E., Levine B.A., Scott G.M.M., Williams R.J.P., Gergely J., Grabarek Z., Leavis P.C., Grand R.J.A., Drabikowski W., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **791**, 164—172.
59. Hansen R.S., Beavo J.A., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 14636—14645.
60. Jackson A.E., Carraway K.L.III, Puett D., Brew K., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 12226—12232.
61. Giedroc D.P., Sinha S.K., Brew K., Puett D., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 13406—13413.
62. Yazawa M., Ikura M., Hikichi K., Ying L., Yagi K., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 10951—10954.
62. Cavalla D., Neff N.H., (1985), *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2821—2826.
64. Ji T.H., (1983), *Methods Enzymol.*, **91**, 580—609.
65. Andreasen T.J., Keller C.H., LaPorte D.C., Edelman A.M., Storm D.R., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2782—2785.
66. Hinds T.R., Andreasen T.J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7877—7882.
67. Watterson D.M., Burgess W.H., Lukas T.J., Iverson D., Marshak D.R., Schleicher M., Erickson B.W., Fok K.-F., Van Eldick L.J., (1984), *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, **16**, 205—226.



68. Blum J.J., Hayes A., Jamieson G.A.Jr., Vanaman T.C., (1980), *J. Cell Biol.*, **87**, 386—397.
69. Chien Y.-H., Dawid I.B., (1984), *Mol. Cell Biol.*, **4**, 507—513.
70. Kasai H., Kato Y., Isobe T., Kawasaki H., Okuyama T., (1980), *Biomed. Res.*, **1**, 248—264.
71. Watterson D.M., Sharief F.S., Vanaman T.C., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 962—975.
72. Sasagawa T., Ericsson L.H., Walsh K.A., Schreiber W.E., Fisher E.H., Titani K., *Biochemistry*, **21**, 2565—2569.
73. Dedman J.R., Jackson R.L., Schreiber W.E., Means A.R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 343—346.
74. Putkey J.A., Ts'ui K.F., Tanaka T., Lagace L., Stein J.P., Lai E.C., Means A.R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6793—6796.
75. Lagace L., Chandra T., Woo S.L.C., Means A.R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 1684—1688.
76. Yazawa M., Yagi K., Toda H., Kondo K., Narita K., Yamazaki R., Sobue K., Kakiuchi S., Nagao S., Nozawa Y., (1981), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 1051—1057.
77. Lukas T.J., Wiggins M., Watterson D.M., (1985), *Plant Physiol.*, **78**, 447—483.
78. Schleicher M., Lukas T.J., Watterson D.M., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**, 33—42.
79. Marshak D.M., Clark M., Roberts D.M., Watterson D.M., (1984), *Biochemistry*, **23**, 2891—2899.
80. Takagi T., Nemoto T., Konishi K., (1980), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 377—381.
81. Schaefer H., Lukas T.J., Blair I.A., Schultz J.E., Watterson D.M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1025—1029.
82. Lukas T.J., Iverson D.B., Schleicher M., Watterson D.M., (1984), *Plant Physiol.*, **75**, 788—795.
83. Schleicher M., Lukas T.J., Watterson D.M., (1983), *Plant Physiol.*, **73**, 666—670.
84. Davis T.N., Urdea M.S., Masiarz F.R., Thorner J., (1986), *Cell*, **47**, 423—431.
85. Watterson D.M., Iverson D.B., Van Eldick L.J., (1980), *Biochemistry*, **19**, 5762—5768.
86. Anderson J.M., Charbonneau H., Jones H.P., McCann R.D., Cormier M.J., (1980), *Biochemistry*, **19**, 3113—3120.
87. Schleicher M., Lukas T.J., Watterson C.M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10250—10255.
88. Luan Y., Matsuura J., Yazawa M., Nakamura T., Yagi K., (1987), *J. Biochem.*, **102**, 1531—1537.
89. Roberts D.M., Burgess W.H., Watterson D.M., (1984), *Plant Physiol.*, **75**, 796—798.
90. Roberts D.M., Crea R., Malecha M., Alvarado-Urbina G., Chiarella R.H., Watterson D.M., *Biochemistry*, **24**, 5090—5098.
91. Putkey J.A., Ts'ui K.F., Tanaka T., Lagace L., Stein J.P., Lai E.C., Means A.R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11864—11870.
92. Klumpp S., Kleefeld G., Schultz J.E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12455—12459.
93. Kakiuchi S., Sobue K., Yamazaki R., Nagao S., Umeki S., Nozawa Y., Yazawa M., Yagi K., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 19—22.
94. Burgess-Cassler A., Hinrichsen R.D., Maley M.E., Kung C., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **913**, 321—328.
95. Hinrichsen R.D., Burgess-Cassler A., Soltveldt B.C., Hennessey T., Kung C., (1986), *Science*, **232**, 503—506.
96. Schaefer W.A., Hinrichsen R.D., Burgess-Cassler A., Kung C., Blair I.A., Watterson D.M., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3931—3935.

97. Paik W.K., Kim S., (1980), w *Protein Methylation*, red. Meister, A., John Wiley and sons, New York.
98. Van Eldick L.J., Grossman A.R., Iverson D.B., Watterson D.M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **77**, 1912—1916.
99. Gregori L., Marriott D., West S.M., Chan V., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5232—5235.
100. Roberts D.M., Rowe P.M., Siegel F.L., Lukas T.J., Watterson D.M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1491—1494.
101. Wawrzynczak E.J., Perham R.N., (1984), *Biochem. Int.*, **9**, 177—185.
102. Beckingham K., Doyle K.E., Maune J.F., (1987), *Methods Enzymol.*, **139**, 230—245.
103. Putkey J.A., Slaughter G.R., Means A.R., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 4704—4712.
104. Putkey J.A., Draetta G.F., Slaughter G.R., Klee C.B., Cohen P., Stull J.T., Means A.R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9896—9903.
105. Craig T.A., Watterson D.M., Prendergast F.G., Haiech J., Roberts D.M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3278—3284.
106. Drabikowski W., Kuźnicki J., Grabarek Z., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **385**, 124—133.
107. Walsh M., Stevens F.C., Kuźnicki J., Drabikowski W., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7440—7443.
108. Brzeska H., Venyaminov S.V., Grabarek Z., Drabikowski W., (1983), *FEBS Lett.*, **153**, 168—173.
109. Thulin E., Andersson A., Drakenberg T., Forsen S., (1984), *Biochemistry*, **23**, 1862—1870.
110. Ikura M., Hiraoki Z., Hikichi K., Minowa O., Yamaguchi H., Yasawa M., Yagi K., (1984), *Biochemistry*, **23**, 3124—3128.
111. Dalgarno D.C., Klevit R.E., Levine B.A., Williams R.J.P., Dobrowolski Z., Drabikowski W., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **138**, 281—289.
112. Wall C.M., Grand R.J.A., Perry S.V., (1981), *Biochem. J.*, **195**, 307—316.
113. Kuźnicki J., Grabarek Z., Brzeska H., Drabikowski W., Cohen P., (1981), *FEBS Lett.*, **130**, 141—145.
114. Szyja W., Sarzała M.G., Drabikowski W., (1983), w *Calcium Binding Proteins*, str. 143—145; red. de Bernard B., North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
115. Newton D.L., Oldewurtel M.D., Krinks M.H., Shiloach J., Klee C.B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4419—4426.
116. Szyja W., Wrzosek A., Brzeska H., Szarzała M.G., (1986), *Cell Calcium*, **7**, 73—88.
117. Ni W.-Ch., Klee C.B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 6974—6981.
118. Guerini D., Krebs J., Carafoli E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 15172—15177.
119. Klumpp S., Guerini D., Krebs J., Schultz J.A., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 875—864.
120. Steiner R.F., Marshall L., Needleman D., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 286—300.
121. Suko J., Pidlich J., Bertel O., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **153**, 451—457.
122. Johnson J.D., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 787—793.
123. Mills J.S., Bailey B.L., Johnson J.D., (1985), *Biochemistry*, **24**, 4897—4902.
124. Cox J.A., Milos M., Comte M., (1987), *Biochem. J.*, **246**, 495—502.
125. Weiss B., Prozialeck W., Cimino M., Sellinger-Barnette M., Wallace T.L., (1980), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **356**, 319—345.
126. Malencik D.A., Anderson S.R., (1982), *Biochemistry*, **21**, 3480—3486.
127. Malencik D.A., Anderson S.R., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1995—2001.
128. Sellinger-Barnette M., Weiss B., (1984), *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, **16**, 261—276.
129. Comte M., Maulet Y., Cox J.A., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 269—272.

130. Barnette M.S., Daly R., Weiss B., (1983), *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2929—2933.
131. Malencik D.A., Anderson S.R., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 50—56.
132. Malencik D.A., Anderson S.R., (1984), *Biochemistry*, **23**, 2420—2438.
133. Anderson S.R., Malencik D.A., (1986), w *Calcium and Cell Function*, red. Cheung W. Y., t. 6, str. 1—37; Academic Press, London.
134. Katoh N., Raynor R.L., Wise B.C., Schatzman R.C., Turner R.C., Helfman D.M., Fain J.N., Kuo J.-F., (1982), *Biochem. J.*, **202**, 217—224.
135. Barnette M.S., Weiss B., (1983), *Psychopharmacol. Bull.*, **19**, 387—392.
136. Giedroc D.P., Ling N., Puett D., (1983), *Biochemistry*, **22**, 5584—5591.
137. Weiss B., Prozialeck W.C., Wallace T.L., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2217—2226.
138. Itano T., Itano R., Penniston J.T., (1980), *Biochem. J.*, **189**, 455—459.
139. Maulet Y., Cox J.A., (1983), *Biochemistry*, **22**, 5680—5686.
140. Bohdansky M., (1974), w *Hormonal Proteins and Peptides*, red. Li C.H., str. 29—43; Academic Press, New York.
141. Cox J.A., Comte M., Fitton J.E., DeGrado W.F., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 2527—2534.
142. Erickson-Viitanen S., O'Neil K.T., DeGrado W.F., (1987), w *Protein Engineering*, str. 201—211; Liss A. R. Inc.
143. Blumenthal D.K., Takio K., Edelman A.M., Charbonneau, H., Titani K., Walsh K.A., Krebs E.G., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3187—3191.
144. Lukas T.J., Burgess W.H., Prendergast F.G., Lau W., Watterson D.M., (1986), *Biochemistry*, **25**, 1458—1464.
145. Buschmeier B., Meyr H.E., Mayr G.W., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 9454—9462.
146. James P., Maeda M., Fischer R., Verma A.K., Krebs J., Penniston J.T., Carafoli E., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 2905—2910.
147. Lin C.R., Kapiloff M.S., Durgerian S., Tatemoto K., Russo A.F., Hanson P., Schulman H., Rosenfeld M.G., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5962—5966.
148. Guerriero V., Russo M.A., Olson N.J., Putkey J.A., Means A.R., (1986), *Biochemistry*, **25**, 8372—8381.
149. Malencik D.A., Scott J.D., Fisher E.H., Krebs E.G., Anderson S.R., (1984), *Biochemistry*, **25**, 3502—3508.
150. Kaetzel M.A., Dedman J.R., (1987), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3726—3729.
151. Nunnally M.H., Blumenthal D.K., Krebs E.G., Stull J.T., (1987), *Biochemistry*, **26**, 5885—5890.
152. Kennelly P.J., Edelman A.M., Blumenthal D.K., Krebs E.G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 11958—11963.
153. Kemp B.E., Pearson R.B., Guerriero V.Jr., Bagchi J.C., Means A.R., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2542—2548.
154. Zurini M., Krebs J., Penniston J.T., Carafoli E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 618—627.
155. Benaim G., Zurini M., Carafoli E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8471—8477.
156. Kincaid R.L., Stith-Coleman J.E., Vaughan M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9009—9015.
157. Walsh M.P., (1985), *Biochemistry*, **24**, 3724—3730.
158. Foster C., Van Fleet M., Marshak A., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**, 616—623.
159. Olwin B.B., Edelman A.M., Krebs E.G., Strom D.R., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 10949—10955.
160. Kincaid R.L., Vaughan M., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1193—1197.
161. Colca J.R., DeWald D.B., Pearson J.D., Palazuk B.J., Laurino J.P., McDonald J.M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 11399—11402.
162. Fukami Y., Nakamura T., Nakayama A., Kanehisa T., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4190—4193.



163. Bilingsley M.L., Lovenberg W., (1985), *Neurochem. Int.*, **7**, 575—587.
164. Bilingsley M.L., Velletin P.A., Lovenberg W., Kuhn D., Goldenring J.R., (1985), *J. Neurochem.*, **44**, 1442—1450.
165. Vincent P. L., Siegel F.L., (1987), *J. Neurochem.*, **49**, 1613—1622.
166. Gagnon C., Kelly S., Manganiello V., Vaughn M., O'dya C., Stuttmatter W., (1981), *Nature*, **291**, 515—516.

VIOLETTA SĄCZYŃSKA\*

## Kalmodulina i jej rola w regulacji metabolizmu komórki roślinnej

### Calmodulin and its role in regulation of plant cell metabolism

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Występowanie kalmoduliny
- III. Budowa i właściwości kalmoduliny
  - III-1. Masa cząsteczkowa
  - III-2. Struktura pierwszorzędowa
  - III-3. Wiązanie  $\text{Ca}^{2+}$  przez kalmodulinę i jej struktura drugorzędowa
  - III-4. Właściwości biochemiczne
- IV. Ewolucja kalmoduliny
- V. Mechanizm działania kalmoduliny
- VI. Enzymy roślinne zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny
  - VI-1. Kinaza NAD
  - VI-2. ATPazy błonowe
  - VI-3. Kinaza asparaginianowa
  - VI-4. Enzymy lipolityczne
  - VI-5. Reduktaza azotanowa
  - VI-6. Kinazy białkowe
  - VI-7. Syntaza  $\alpha$ -galaktozylo-1  $\rightarrow$  1-glicero-3-fosforanu
- VII. Rola  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny w świetle hipotezy przekaznika II-rzędu

#### Contents

- I. Introduction
- II. Occurrence of calmodulin
- III. Structure and properties of calmodulin
  - III-1. Molecular weight
  - III-2. Primary structure
  - III-3.  $\text{Ca}^{2+}$  — binding and secondary structure of calmodulin
  - III-4. Biochemical properties
- IV. Evolution of calmodulin
- V. Mechanism of action of calmodulin
- VI.  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulin-dependent plant enzymes
  - VI-1. NAD kinase
  - VI-2. Membrane ATPases

---

\* Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

VI-3. Aspartate kinase

VI-4. Lipolytic enzymes

VI-5. Nitrate reductase

VI-6. Protein kinases

VI-7.  $\alpha$ -galactosyl-1  $\rightarrow$  1-glicerol-3-phosphate synthase (isofloridosidephosphate synthase)

VII. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin in terms of second messenger hypothesis

## I. Wstęp

Kalmodulina (CaM) jest niskocząsteczkowym, regulatorowym białkiem, które zachowując znaczny stopień strukturalnej homologii, powszechnie występuje u eukariontów. Jako jedno z białek wiążących  $\text{Ca}^{2+}$ , kalmodulina wchodzi w odwracalne interakcje z  $\text{Ca}^{2+}$  tworząc kompleks białko- $\text{Ca}^{2+}$ , który z jednej strony moduluje aktywność wielu enzymów, z drugiej zaś podlega regulacji poprzez zmiany stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce. Ze względu na to, że zmiany stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ , zgodnie z hipotezą przekaźnika II rzędu, są efektem działania bodźców zewnętrznych, kalmodulinę uznano za czynnik odgrywający zasadniczą rolę w regulacji czynności komórki.

Kalmodulinę odkryli w 1970 roku niezależnie od siebie *Chen* [1, 2] oraz *Kakiuchi* i *in.* [3] i opisali jako termostabilne białko odpowiedzialne za wysoką aktywność fosfodwuesterazy cyklicznych nukleotydów mózgu w obecności  $\text{Ca}^{2+}$ . Następnie *Teo* i *Wang* [4] wykazali, że jest ono niskocząsteczkowym białkiem wiążącym  $\text{Ca}^{2+}$ . Zdolność aktywowania fosfodwuesterazy cAMP, wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  i inne właściwości fizyko-chemiczne aktywatora odkrytego w mózgu stały się podstawą jego identyfikacji z pewnymi białkami [5]. Wyizolowano je i oczyszczono z rozmaitych tkanek różnych zwierząt oraz charakteryzowano jako białka wiążące  $\text{Ca}^{2+}$  albo też zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  aktywatory określonych enzymów. Rola kalmoduliny w regulacji procesów metabolicznych u zwierząt była przedmiotem artykułu *Kuźnickiego* i *Drabikowskiego* z 1980 roku [6].

Dopiero po paru latach od odkrycia kalmoduliny w tkankach zwierząt wykazano, że białko to występuje również w roślinach. W 1977 roku, *Muto* i *Miyachi* [7] stwierdzili, że częściowo oczyszczona kinaza NAD grochu podlega stymulacji pod wpływem endogennego, termostabilnego białka. Następnie *Anderson* i *Cormier* [8] wykazali, że aktywacja enzymu zachodzi jedynie w obecności  $\text{Ca}^{2+}$ . Dalsze badania *Andersona* i *in.* [9] doprowadziły do identyfikacji aktywatora kinazy NAD z kalmoduliną. Jak się później okazało, kalmodulina występuje zarówno w roślinach wyższych jak i niższych oraz reguluje aktywność przynajmniej kilku różnych enzymów roślinnych.

Odzwierciedleniem historii badań nad kalmoduliną było słownictwo stosowane dla określenia nowo odkrytego białka [5]. Początkowo nazywano je uwzględniając jedyną z jego molekularnych lub funkcjonalnych właściwości. Wraz z napływem informacji wskazujących na wielofunkcyjny charakter białka,



zaczęto określać je np. jako zależny od wapnia regulator (ang. calcium dependent regulator). W końcu przyjęto nazwę zaproponowaną przez Cheunga i in. [10]: kalmodulina (ang. calmodulin), która pochodzi od słów: calcium-dependent modulator protein.

## II. Występowanie kalmoduliny

Od czasu odkrycia kalmoduliny w siewkach grochu [7], kalmodulinę lub aktywność podobną do aktywności kalmoduliny wykryto w większości przebadanych roślin zaliczanych do różnych grup systematycznych (Tab. 1), przy czym z niektórych roślin białko to zostało wyizolowane, oczyszczone i przynajmniej częściowo scharakteryzowane [13—17, 19, 20, 23—25]. Kalmodulina występuje prawdopodobnie także w organizmach prokariotycznych. Stwierdzono bowiem występowanie białka podobnego do kalmoduliny w *Bacillus subtilis* [26] i *Myxococcus xanthus* [27] oraz wykazano aktywność podobną do aktywności kalmoduliny w *Escherichia coli* [28].

Kalmodulinę wyizolowano z różnych organów roślin okrytonasiennych [25]. Oznaczono także jej zawartość za pomocą metody radioimmunologicznej w różnych tkankach etiolowanych oraz zielonych roślin grochu [22]. Wyniki badań, wyrażone w µg kalmoduliny/mg DNA wskazują na to, że kalmodulina występuje najobficiej w młodych, dzielących się i rosnących tkankach etiolowanych siewek oraz aktywnych fotosyntetycznie tkankach roślin zielonych,

Tabela 1

Rośliny, w których wykryto kalmodulinę

Grupa systematyczna	Gatunek	Piśmiennictwo
Głony	<i>Euglena gracilis</i> <i>Chlamydomonas</i> <i>Mougeotia</i>	11 13, 14 13, 5, 15
Śluzorośla	<i>Physarum polycephalum</i> <i>Dictyostelium discoideum</i>	11, 14, 12 14
Grzyby niższe	<i>Blastocladiella emersonii</i>	12
Grzyby wyższe	<i>Neurospora crassa</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Russula</i> <i>Cortinarius</i> <i>Agaricus bisporus</i>	5, 13, 16 14 17 17 17
Mchy		5
Paprocie	<i>Anemia phyllitidis</i>	18

c.d. tabeli 1

Grupa systematyczna	Gatunek	Piśmiennictwo
Okrytonasienne	Jęczmień	5, 13, 19, 20
	Pszenica	21
	Kukurydza	5, 13, 22
	Owies	19
	Brokuły	5
	Rzepa	5
	Burak	5
	Ziemniak	5
	Ogórek	5
	Groch	5, 12, 21, 22
	Fasola	12
	Marchew	12
	Orzeszki ziemne	5, 13, 19
	Szpinak	5, 13, 21, 19, 22, 23
	Cukinia	5, 13, 16
	Bawełna	5
	Kapusta	5
	Tytoń	24
	Citrus sinensis	25

**Tabela 2**

Rozmieszczenie kalmoduliny w komórkach liścia pszenicy [13]

Frakcja	Zawartość kalmoduliny w % całkowitej ilości kalmoduliny
Cytosol	90
Mitochondria	5—9
Chloroplasty	1—2
Mikrosomy	< 1

przy czym zawartość kalmoduliny w liściach jest o wiele niższa od tej jaką oznaczono w części wierzchołkowej roślin etiolowanych. Wyższą zawartość kalmoduliny w dzielących się komórkach w porównaniu z innymi badanymi tkankami stwierdzono także u kukurydzy i szpinaku stosując metodę immunohistochemiczną [29]. Obserwacje te tłumaczy się udziałem kalmoduliny w regulowaniu fotosyntezy oraz procesu podziału komórek [22].

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badań nad rozmieszczeniem kalmoduliny w komórce roślinnej. Należy je traktować ostrożnie, ponieważ wykazano, że zależnie od warunków doświadczenia uzyskuje się różne dane na temat ilości kalmoduliny w błonach, cytoplazmie i organellach [5,13]. Biorąc pod uwagę informacje zawarte w tabeli 2 oraz doniesienia o obecności kalmoduliny w jądrze

komórki roślinnej [13,30] można przypuszczać, że białko to jest związane ze wszystkimi organellami komórkowymi. Kalmodulina występuje jednak głównie w cytosolu, gdzie jej stężenie wynosi około 1—10  $\mu\text{M}$  [13].

### III. Budowa i właściwości kalmoduliny

#### III-1. Masa cząsteczkowa

Masy cząsteczkowe kalmoduliny z roślin zaliczanych do różnych grup systematycznych są zbliżone (Tab. 3). Dostępne dane wskazują na to, że kalmodulina jest białkiem monomerycznym [6,31], chociaż biorąc pod uwagę masę cząsteczkową kalmoduliny zwierzęcej wyznaczoną metodą sączenia na sitach molekularnych dopuszcza się możliwość powstawania dimeru tego białka z udziałem innych wiązań niż dwusiarczkowe (brak cysteiny w cząsteczce) [6]. W przypadku kalmoduliny roślinnej kwestią nierozstrzygniętą jest nie tylko tworzenie dimeru, ale także ewentualna rola reszt cysteiny w tym procesie (obecność cysteiny w cząsteczce; por. Tab. 3).

Tabela 3

Masy cząsteczkowe kalmoduliny z różnego materiału roślinnego\*

Źródło kalmoduliny	Względne masy cząsteczkowe		Piśmiennictwo
	+ $\text{Ca}^{2+}$	- $\text{Ca}^{2+}$	
<i>Mougeotia</i>	14,000	16,500	15
<i>Anemia phyllitidis</i>	14,000	15,000	18
Cukinia	14,500	17,000	15, 16, 25
<i>Citrus sinensis</i>	14,500	17,000	25
<i>Nicotiana tabacum Im</i>	15,000	18,000	24
Serce wołu	16,500	21,000	24
Mózg wołu**	16,000	19,000	15, 16, 25

\* Wartości otrzymano stosując elektroforezę kalmoduliny w SDS-żelu poliakrylamidowym w obecności i pod nieobecność  $\text{Ca}^{2+}$  (+  $\text{Ca}^{2+}$ /–  $\text{Ca}^{2+}$ ). Różnice między wartościami uzyskanymi w obecności i pod nieobecność  $\text{Ca}^{2+}$  są prawdopodobnie wynikiem większej podatności kalmoduliny na działanie czynników denaturujących w porównaniu z kompleksem  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina (patrz Rozdz. III-3).

\*\* Mcz kalmoduliny z mózgu wołu obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej wynosi około 17000 daltonów [6, 12].

#### III-2. Struktura pierwszorzędowa

Obecnie znany jest skład aminokwasowy kalmoduliny wielu niższych i wyższych roślin [13, 14, 23, 25, 32] (Tab. 4). Wiadomo, że łańcuch polipeptydowy kalmoduliny składa się z około 150 aminokwasów, z czego znaczną część (ponad 30%) stanowią kwas glutaminowy i asparaginowy lub ich pochodne amidowe. Wysoka zawartość aminokwasów kwaśnych i niska aminokwasów zasadowych w kalmodulinie sprawiają, że ma ona niski punkt izoeletryczny (Tab. 5). Z kolei brak tryptofanu, niska zawartość tyrozyny i stosunkowo duża zawartość



Tabela 4

Skład aminokwasowy kalmoduliny szpinaku [23]

Aminokwasy	Liczba reszt/15 680 g <sup>a</sup>
Asp	23,5
Thr	7,3
Ser	5,6
Glu	29,7
Pro	1,8
Gly	10,3
Ala	10,5
Cys	n.d.
Val	4,9
Met	7,0
Ile	5,0
Leu	10,5
Tyr	1,0
Phe	7,5
His	0,9
TM-Lys	1,0
Lys	7,7
Trp	0
Arg	4,3

a — względna masa cząsteczkowa kalmoduliny szpinaku wyznaczona metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym

TM-Lys-N-ε-trójmetylolizyna

n.d. — nie oznaczana

fenyloalaniny powodują, że widmo absorpcyjne kalmoduliny w zakresie ultrafioletu wykazuje pasma absorpcji charakterystyczne dla fenyloalaniny. Konsekwencją składu aminokwasowego kalmoduliny jest także niski współczynnik absorpcji np.  $\epsilon_{276\text{nm}}^{1\%}$  kalmoduliny roślin wyższych wynosi 0,9 [25].

W kalmodulinie wielu organizmów roślinnych i zwierzęcych stwierdzono obecność nietypowego aminokwasu tj. trójmetylolizyny. Natomiast nie wykryto tego aminokwasu np. w kalmodulinie grzybów, śluzorośli (Tab. 6), a także glonu *Chlamydomonas* [14]. Brak trójmetylolizyny nie jest jednak cechą charakte-

Tabela 5

## Punkty izoelektryczne kalmoduliny różnego pochodzenia

Źródło kalmoduliny	Punkt izoelektryczny	Piśmiennictwo
<i>Neurospora crassa</i>	3,9	16
	4,04	14
Tytoń	3,85	24
Cukinia	3,9	16
<i>Citrus sinensis</i>	3,7	25
Dżdżownica	4,0	5
Różne tkanki wołu	3,9—4,3	5
Mózg wołu	4,0	6
	3,9	16
	4,3	5

Tabela 6

## Różnice w składzie aminokwasowym kalmoduliny różnych roślin i kalmoduliny zwierzęcej

Źródło kalmoduliny	Liczba reszt aminokwasów w cząsteczce					Piśmiennictwo
	Ser	Pro	Tyr	Cys	TM-Lys	
<i>Dictyostelium discoideum</i>	6	4	5	0	0	14
<i>Neurospora crassa</i>	11	3	1	0	0	14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15	1	0	0	0	32
Podstawczaki	11	10	3	n.d.	0	14
Jęczmień	9,9 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>	n.d.	0 <sup>a</sup>	17
	5,5 <sup>b</sup>	2,2 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	n.d.	1,1 <sup>b</sup>	20
Orzeszki ziemne	5	2	1	1	1	25
Kukurydza	6	2	1	n.d.	1	13
Cukinia	5	2	1	1	1	25
<i>Citrus sinensis</i>	5	2	1	1	1	25
Mózg wołu	4	2	2	0	1	13

TM-Lys-N-ε-trójmetylolizyna

n.d. — nie oznaczano

a — średnia dla 2 preparatów (mol aminokwasu/mol kalmoduliny)

b — mol/16700 g

rystyczną kalmoduliny organizmów niższych, ponieważ aminokwas ten występuje w kalmodulinie pierwotniaków oraz bezkręgowców [14]. Według niektórych danych również kalmodulina jęczmienia nie zawiera trójmetylolizyny (Tab. 6). Nie potwierdzają tego jednak inne doniesienia na ten temat (Tab. 6). Nie ma też danych, które wskazywałyby na występowanie dwóch form tego regulatorowego białka w roślinach a jednocześnie wyjaśniały sprzeczność wyników składu aminokwasowego kalmoduliny jęczmienia. Różnice budowy kalmoduliny różnych roślin oraz kalmoduliny roślinnej i zwierzęcej dotyczą także innych aminokwasów (Tab. 6).

Dotychczas określono prawie kompletną sekwencję aminokwasową kalmoduliny szpinaku tj. pozycje 13—21 i 30—148 [13] oraz częściowo zsekwencjonowano kalmodulinę jęczmienia [20] i fasoli (*Phaseolus aureus*) [30]. Pewnych informacji na temat struktury pierwszorzędowej kalmoduliny roślinnej dostarczyły badania przeprowadzone z zastosowaniem techniki daktyloskopii [14] oraz metod immunologicznych [12, 20, 22, 31].

Liczne doświadczenia wykazały, że skład aminokwasowy, sekwencje aminokwasowe, mapy peptydów „trypsynowych” kalmoduliny różnego pochodzenia są podobne. Mówi się więc o dużej homologii kalmoduliny roślin wyższych, kręgowców i pierwotniaków [20] oraz wysokiej konserwatywności tego białka wśród eukariontów [23].

### III-3. Wiązanie $\text{Ca}^{2+}$ przez kalmodulinę i jej struktura drugorzędowa

Znamienną cechą kalmoduliny jest zdolność wiązania jonów wapnia. Zakładając, że masa cząsteczkowa kalmoduliny wynosi 17 000 i stosując równowagową chromatografię żelową wykazano, że 1 mol kalmoduliny wyizolowanej z różnych organizmów może przyłączyć następujące ilości moli  $\text{Ca}^{2+}$ : kalmodulina mózgu wołu — 3,3 [19], mięśni owada — 3,5 [19], *Neurospora crassa* — 3,0 [19], cukini — 3,3 [19], 3,5 [13]. Wyniki te wskazują, że w cząsteczce kalmoduliny są 4 miejsca wiązania  $\text{Ca}^{2+}$ . Nie jest to jednak regułą, ponieważ wykazano obecność tylko 3 miejsc wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  w cząsteczce kalmoduliny drożdży [32]. Kwestią nierozstrzygniętą jest czy miejsca te mają jednakowe, czy też różne powinowactwo względem  $\text{Ca}^{2+}$  [5, 6, 33]. Kalmodulina może wiązać także jony  $\text{Mg}^{2+}$ , przy czym miejsca wiązania  $\text{Mg}^{2+}$  są różne od miejsc wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  [33].

Hipoteza na temat struktury drugorzędowej kalmoduliny [5, 6, 12, 33] przewiduje usytuowanie miejsc wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  w kalmodulinie. Według tej hipotezy cząsteczka kalmoduliny zbudowana jest z 4 domen, a każda z nich składa się z 2 odcinków o strukturze  $\alpha$ -heliksu i łączącej je pętli, w której znajdują się aminokwasy koordynacyjnie wiążące  $\text{Ca}^{2+}$ .

Przyłączenie  $\text{Ca}^{2+}$  przez kalmodulinę powoduje zmianę niektórych jej właściwości, a mianowicie: zmniejsza się podatność pewnych aminokwasów w cząsteczce kalmoduliny na działanie czynników modyfikujących [6]; zwiększa się odporność kalmoduliny na proteolityczną inaktywację [5, 6], zwiększa się



intensywność fluorescencji tyrozyny [6, 13]; pojawia się zdolność kalmoduliny do tworzenia połączeń ze związkiem, który wchodzi w interakcje z hydrofobowymi częściami białek [34]; wzrasta stała sedymentacji oraz zmniejsza się promień Stokesa [5]. Ponadto stwierdzono, że wiązanie  $\text{Ca}^{2+}$  wywołuje zmianę widma dichroizmu kołowego, przy czym w przypadku kalmoduliny mózgu wołu, cukini [19] i *Neurospora crassa* [14] zaobserwowano podobne zmiany widma w dalekim ultrafiolecie oraz nieco odmiennie w bliskim ultrafiolecie. Różnice te tłumaczy się niejednakową zawartością tyrozyny w kalmodulinie roślinnej i zwierzęcej. Przedstawione dane wskazują, że wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez kalmodulinę powoduje wzrost uporządkowania, z wartości i stabilności białka [5] oraz odsłonięcie hydrofobowych części kalmoduliny [34]. Obecnie wiadomo również, że zmiany konformacyjne towarzyszą przyłączaniu kolejnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez cząsteczkę kalmoduliny [33].

#### III-4. Właściwości biochemiczne

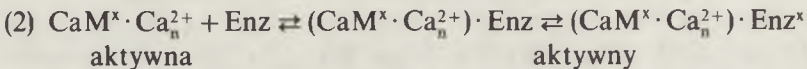
Kalmodulina reguluje aktywność wielu enzymów w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Przeprowadzono badania, w których porównywano wpływ kalmoduliny roślinnej i zwierzęcej na aktywność jednego z enzymów współdziałających z  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliną, przy czym stosowano enzym roślinny (kinaza NAD) lub zwierzęcy (fosfodwuesteraza cyklicznych nukleotydów, kinaza lekkiego łańcucha miozyny). Wyniki tych badań są sprzeczne. I tak, jedne wskazują na podobną zdolność kalmoduliny roślinnej i zwierzęcej do aktywowania enzymu roślinnego [13, 20, 24, 25, 30], inne zaś na znacznie niższą zdolność kalmoduliny roślinnej do aktywowania enzymu zwierzęcego [14, 17, 32] oraz znacznie niższą zdolność kalmoduliny zwierzęcej do aktywowania enzymu roślinnego [13]. Nie wiadomo, jaki jest powód tych sprzeczności. Przypuszcza się, że są one spowodowane różnymi biochemicznymi właściwościami preparatów kalmoduliny [13, 24]. Niektórzy jednak sugerują, że kalmodulina różnego pochodzenia może mieć różne powinowactwo do poszczególnych enzymów i jest to wynikiem, bliżej na razie nieokreślonych, różnic strukturalnych [14, 25].

#### IV. Ewolucja kalmoduliny

Badania nad strukturą występujących u zwierząt homologicznych białek wiążących  $\text{Ca}^{2+}$  doprowadziły do sformułowania hipotezy, według której podstawową jednostką ewolucji była domena wiążąca  $\text{Ca}^{2+}$  [5], a pojawienie się kalmoduliny poprzedziły dwie kolejne duplikacje pierwotnego genu kodującego tę domenę [5, 12]. Natomiast porównanie właściwości kalmodulin różnego pochodzenia skłoniło do przypuszczeń, że kalmodulina powstała jako jedno z pierwszych białek wiążących  $\text{Ca}^{2+}$  [5], ewoluowała nierzadziej wolno do momentu pojawienia się roślin wyższych i zwierząt naczelnych [20], a w mikroorganizmach gen kodujący kalmodulinę był poddany większej liczbie punktowych mutacji niż u zwierząt i roślin [14].

## V. Mechanizm działania kalmoduliny

Aktywacja enzymów przez kalmodulinę wymaga obecności  $\text{Ca}^{2+}$  [12]. Zależność tę tłumaczy wielostopniowy przebieg interakcji kalmoduliny z regulowanymi przez nią enzymami [5, 12, 31], który można zilustrować za pomocą 2 równań:



gdzie: CaM — kalmodulina; Enz — enzym; x — nowa konformacja

Po związaniu jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , kalmodulina przyjmuje konformację aktywną biologicznie tj. taką, która pozwala na jej połączenie z enzymem [5, 12, 31]. Podkreśla się przy tym, że ekspozycja grup hydrofobowych w kompleksie  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina jest istotna dla zajścia tego procesu [34, 35]. Z kolei przyłączenie kompleksu  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina do nieaktywnego lub częściowo aktywnego enzymu powoduje zmianę jego konformacji, której z reguły towarzyszy wzrost aktywności [5, 12, 31]. Taki mechanizm działania kalmoduliny zaproponowano na podstawie badań nad stymulacją fosfodwuesterazy cyklicznych nukleotydów [5, 31], a następnie potwierdzono w doświadczeniach z innymi zależnymi od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny enzymami m.in. kinazą NAD [31].

Wyjątek stanowi enzym zwierzęcy — kinaza fosforylazy b, który podlega dwójkiemu rodzaju regulacji [5, 12, 31]. Kalmodulina jako podjednostka wiążąca  $\text{Ca}^{2+}$  asocjuje z pozostałymi podjednostkami ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) w sposób niezależny od  $\text{Ca}^{2+}$ . Natomiast egzogenna kalmodulina może w obecności  $\text{Ca}^{2+}$  dodatkowo stymulować enzym zgodnie z mechanizmem regulacji innych enzymów. W trakcie badania fosforylacji białek kolecyptyli kukurydzy wynikiły problemy z usunięciem endogennej kalmoduliny [36], które można by wytłumaczyć zakładając istnienie podwójnego mechanizmu regulacji również w przypadku zależnych od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny kinaz białkowych.

Mechanizm wielofunkcyjności kalmoduliny pozostaje na razie w sferze domysłów, przy czym rozpatruje się m.in. następujące możliwości:

1) Różne enzymy posiadają podobne domeny [5, 12] lub regiony hydrofobowe [34], które wchodzi w interakcje z tymi samymi miejscami [5, 12] lub grupami hydrofobowymi [34] kompleksu  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina.

2) Różne enzymy reagują z różnymi regionami kompleksu  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina [12].

3) Różne białka lub grupy białek rozpoznają różne stechiometryczne kompleksy kalmoduliny z jonami  $\text{Ca}^{2+}$  [12, 13].

Według niektórych danych [33], dopiero po związaniu trzech jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez cząsteczkę kalmoduliny staje się możliwa interakcja regulatorowego białka z enzymami. Z kolei, porównując wpływ eksperymentalnie zmutowanej kalmo-

duliny na aktywność trzech wybranych enzymów (kinaza NAD, fosfodwuesteraza cyklicznych nukleotydów, kinaza lekkiego łańcucha miozyny), stwierdzono, że miejsca interakcji różnych enzymów z kalmoduliną nie są jednakowe [33].

## VI. Enzymy roślinne zależne od $\text{Ca}^{2+}$ i kalmoduliny

Badania nad rolą kalmoduliny w roślinach przeprowadza się wykorzystując oczyszczone enzymy, albo też preparaty enzymatyczne pozbawione endogennej kalmoduliny. Dokonuje się również doświadczeń na surowych ekstraktach roślinnych, a nawet nienaruszonych tkankach. W tych ostatnich dwu przypadkach stosuje się środki inaktywujące kalmodulinę zwane inhibitorami lub antagonistami kalmoduliny. Zalicza się do nich m.in. niektóre leki antypsychotyczne, takie jak chlorpromazina, fluphenazina, które wiążą się odwracalnie z kalmoduliną w sposób zależny od  $\text{Ca}^{2+}$  [15]. Antagoniści regulatorowego białka mogą jednak oddziaływać niespecyficznie na badane procesy [15, 35, 37, 38, 39], dlatego też wyniki doświadczeń z ich zastosowaniem należy interpretować bardzo ostrożnie.

### VI-1. Kinaza NAD

Kinaza NAD współdziałająca z  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliną jest typowo roślinnym enzymem, bowiem nie udało się jej wykryć u zwierząt z wyjątkiem jaj morskiego jeżowca [12, 31]. W komórce roślinnej występuje prawdopodobnie zależna i niezależna od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny forma kinazy NAD [13], przy czym wykazano, że kinaza NAD regulowana przez kalmodulinę stanowi przynajmniej 95% kinazy NAD występującej w grochu [37]. Dane dotyczące subkomórkowej lokalizacji enzymu często są sprzeczne ze sobą. Muto i in. [40] stwierdzili, że w przypadku 5-ciu (z 6-ciu przebadanych) gatunków roślin większość zawartej w komórce kinazy NAD znajduje się w chloroplastach. W doświadczeniach tych nie sprawdzono jednak, czy enzym podlega regulacji przez  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmodulinę. J a r r e t i n. [37], na podstawie badań protoplastów grochu, również uznali chloroplasty za główne miejsce występowania kinazy NAD w komórce, a ponadto wykazali, że występująca w stromie kinaza NAD jest zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny. Badania S i m o n a i n. na chloroplastach szpinaku [41] i grochu [42] potwierdziły powyższe wyniki tylko odnośnie obecności kinazy NAD w chloroplastach. Wykazano bowiem, że w chloroplastach szpinaku występuje niezależna od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny kinaza NAD, a w stromie i błonach chloroplastów grochu znajdują się różne formy tego enzymu, przy czym regulowana przez  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmodulinę kinaza NAD zasocjowana jest z zewnętrzną błoną chloroplastów. Z kolei badając koleoptyle kukurydzy stwierdzono, że prawie cała aktywność kinazy NAD zasocjowana jest z zewnętrzną błoną mitochondrialną i aktywność ta podlega stymulacji przez  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmodulinę [13]. Kinazę NAD wykryto także w mitochondriach korzeni



kukurydzy, ale tym razem stwierdzono, że forma zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny występuje zarówno w zewnętrznej jak i wewnętrznej błonie mitochondrium [41]. Kinazę NAD współdziałającą z  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliną znaleziono ponadto w cytoplazmatycznej frakcji szpinaku [41], grochu [8] i cukini [13].

Kontrowersje na temat lokalizacji regulowanej przez  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmodulinę kinazy NAD wynikają przypuszczalnie z tego, że w niektórych badaniach stosowano prawdopodobnie preparaty kinazy NAD, które ze względu na duże powinowactwo kinazy do kalmoduliny, zawierały enzym w postaci kompleksu z kalmoduliną. To bowiem powoduje, że nie można wykazać współdziałania enzymu z dodaną kalmoduliną [30].

Kinaza NAD jest jedynym znanym enzymem, który katalizuje fosforylację NAD w obecności ATP [13]. Enzym ten wyróżnia się wśród innych enzymów współdziałających z  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliną. Oczyszczona kinaza NAD ulega bowiem aktywacji pod wpływem około 50 razy mniejszej ilości kalmoduliny niż enzymy zwierzęce regulowane przez kalmodulinę [37]. Wiadomo również, że jej aktywność może zwiększyć się około 100-krotnie [37], a np. fosfodwuesterazy cyklicznych nukleotydów tylko 6-15-krotnie [12] pod wpływem kalmoduliny. Ponadto nie stwierdzono, żeby kinaza NAD, w odróżnieniu od niektórych innych enzymów zależnych od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny, ulegała aktywacji pod wpływem lipidów, czy proteaz [37].

#### VI-2. ATPazy błonowe

Pierwsze dowody na istnienie zależnej od kalmoduliny i  $\text{Ca}^{2+}$  ATPazy błonowej w komórkach roślin pochodziły z doświadczeń nad aktywną akumulacją wapnia w pęcherzykach błonowych tworzących frakcję mikrosomalną lub tzw. frakcję mikrosomalną wzbogaconą w błony plazmatyczne [13, 16, 44—46]. Tego typu badania ujawniły, że kalmodulina stymuluje zależny od ATP transport  $\text{Ca}^{2+}$  do mikrosomów i aktywuje mikrosomalną  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPazę [13, 16, 44, 45]. Bardziej bezpośrednim dowodem na istnienie transportującej  $\text{Ca}^{2+}$  ATPazy regulowanej przez kalmodulinę była udana próba częściowego oczyszczenia ATPazy z mikrosomalnej frakcji koleoptyli kukurydzy metodą chromatografii powinowactwa, z kalmoduliną jako ligandem [45]. Wykazano przy tym, że częściowo oczyszczony enzym jest odpowiedzialny za stymulowany przez kalmodulinę transport  $\text{Ca}^{2+}$ , jaki obserwowano w mikrosomach. Przypuszcza się, że ATPaza regulowana przez kalmodulinę występuje w błonie plazmatycznej i jest elementem systemu transportu wydalającego  $\text{Ca}^{2+}$  na zewnątrz komórki [13, 44—46].

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPazę współdziałającą z  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliną odkryto również w otoczce chloroplastów szpinaku [21] i etioplastów owsa [47], jednakże funkcja tej ATPazy nie jest znana. Odkryta ATPaza występuje najprawdopodobniej w wewnętrznej błonie chloroplastów, w związku z czym badania wskazujące na to, że  $\text{Mg ATP}^{2-}$  wpływa na transport polipeptydów po cytosolowej stronie chloroplastów, wykluczają możliwość udziału tego enzymu

w transporcie polipeptydów [47], co pierwotnie brano pod uwagę [21]. Tak więc można przypuszczać, że ATPaza stanowi element aktywnego mechanizmu sprzęgniętego w wpływ  $H^+$ , transport  $K^+$  lub wywołany światłem transport  $Ca^{2+}$  przez błony chloroplastów [21].

Ponadto stwierdzono [13], że aktywność transportującej  $H^+$  ATPazy, związana z tonoplastem, jest hamowana przez kalmodulinę w obecności  $Ca^{2+}$ , a antagoniści kalmoduliny stymulują wydzielanie  $H^+$  i powodują hiperpolaryzację transmembranowego potencjału w nienaruszonych tkankach roślinnych. Zatem należy się spodziewać odkrycia nowej regulatorowej funkcji kalmoduliny.

### VI-3. Kinaza asparaginianowa

Kinaza asparaginianowa (4-fosfotransferaza ATP:asparaginian) — enzym występujący w bakteriach i roślinach wyższych — katalizuje reakcję fosforylacji asparaginianu do aspartylofosforanu, która jest pierwszym etapem w biosyntezie aminokwasów: izoleucyny, lizyny, treoniny i metioniny. Znane są trzy izofunkcjonalne formy tego enzymu różniące się podatnością na hamujące działanie treoniny, lizyny i S-adenozylometioniny. S a n e i i n. [48] wykazali, że kinaza asparaginianowa z liści kilku gatunków roślin podlega stymulacji pod wpływem czynnika białkowego, który później zidentyfikowano jako kalmodulina. K o c h h a r i n. [48, 49] stwierdzili następnie, że z dwóch form kinazy asparaginianowej, jakie udało się im rozdzielić (wrażliwa na treoninę i wrażliwa na lizynę), tylko izoenzym hamowany przez treoninę współdziała z  $Ca^{2+}$  i kalmoduliną. Wyniki te są zgodne z obserwacjami B o n n e r a i i n. [50], którzy wykazali, że kalmodulina nie bierze udziału w regulowaniu aktywności kinazy asparaginianowej wrażliwej na lizynę.

### VI-4. Enzymy lipolityczne

Doświadczenia, w których zaobserwowano, że jonofor  $Ca^{2+}$  (A 23187) wzmacnia inhibitor kalmoduliny opóźnia degradację błon liści grochu oraz, że aktywność fosfolipazy w mitochondriach kalafiora i frakcjach organelli bulw ziemniaka jest skutecznie hamowana przez inhibitor kalmoduliny [51], zapoczątkowały badania nad rolą kalmoduliny w regulacji enzymów lipolitycznych. Wykazano, że inhibitory kalmoduliny hamują, a egzogenna kalmodulina stymuluje hydrolizę fosfatydylocholiny w homogenatach liści ziemniaka [51]. Badania kontynuowano stosując trzy frakcje subkomórkowe liści ziemniaka (supernatant po wirowaniu przy 13000 x g oraz osad i supernatant po wirowaniu supernatantu 13000 x g przy 100000 x g) i analog fluorescencyjny fosfatydylocholiny jako substrat [52]. Wykazano w ten sposób, że kalmodulina stymuluje fosfolipazę zlokalizowaną we frakcji rozpuszczalnej. Przedstawiono ponadto dane wskazujące na to, że fosfolipaza podlega *in vivo* regulacji poprzez mechanizm typu fosforylacja-defosforylacja, a kalmodulina aktywuje fosfolipazę za pośrednictwem kinazy białkowej.

Prowadząc następnie badania na homogenatach z bulw ziemniaka, uzyskano odmienne wyniki od poprzednich [53].

Egzogenna kalmodulina nie miała wpływu na szybkość degradacji błon, ani, w odróżnieniu od egzogennych jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , na hydrolizę fosfatydylocholiny. Ponadto inhibitory kalmoduliny w zależności od stężenia działały hamująco bądź stymulująco na hydrolizę fosfatydylocholiny. Obserwacje te jednak nie obalają tezy o udziale kalmoduliny w regulowaniu aktywności fosfolipazy, ponieważ homogenat ziemniaka zawierał endogenną kalmodulinę, a inhibitory o właściwościach hydrofobowych prawdopodobnie oddziaływały na hydrolizę fosfatydylocholiny w sposób niespecyficzny.

#### VI-5. Reduktaza azotanowa

Reduktaza azotanowa jako kompleks enzymatyczny katalizuje redukcję azotanów do azotynów. Wykazanie zależności metabolizmu azotanów od zawartości wapnia i obecności  $\text{Ca}^{2+}$  w liściach skłoniło do badań nad mechanizmem działania  $\text{Ca}^{2+}$  w procesie asymilacji azotanów [54]. Badania te doprowadziły do stwierdzenia, że reduktaza azotanowa wyizolowana z liści *Amaranthus* ulega aktywacji pod wpływem kalmoduliny w obecności  $\text{Ca}^{2+}$  [54]. Wykazano ponadto, że miejscem działania kalmoduliny jest ta część kompleksu reduktazy azotanowej, której grupę prostetyczną stanowi FMN.

#### VI-6. Kinazy białkowe

Można wyróżnić 3 grupy roślinnych kinaz białkowych: 1) kinazy niezależne od  $\text{Ca}^{2+}$ , 2) kinazy zależne od  $\text{Ca}^{2+}$ , 3) kinazy zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny [38]. Biorąc pod uwagę doniesienia [45, 46] o niedawno odkrytym mechanizmie regulacji aktywności tych enzymów, należałoby wyodrębnić dodatkowo grupę 4) zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  i fosfolipidu.

Pierwsze informacje na temat kinaz zaliczanych do trzeciej grupy pochodzą z badań nad fosforylacją białek frakcji błonowych izolowanych z różnych tkanek rozmaitych roślin [13, 36, 45, 55]. W niektórych przypadkach stwierdzono jedynie, że kalmodulina stymuluje fosforylację białek błonowych [12, 36], w innych natomiast udało się określić ilość i masę cząsteczkową peptydów fosforylowanych w sposób zależny od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny [13, 45, 55]. Z badań przeprowadzonych na frakcjach mikrosomalnych wynika ponadto, że większość, spośród dużej liczby białek ulegających fosforylacji, stanowią białka, które są fosforylowane w procesie niezależnym od  $\text{Ca}^{2+}$  a tylko kilka z nich podlega działaniu kinaz współdziałających z  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliną [56, 57]. Okazało się, że proces fosforylacji przebiega inaczej w wysoce oczyszczonych preparatach tonoplastu, bowiem w tym przypadku dotyczy on ograniczonego zespołu polipeptydów i jest zależny głównie od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny [56]. Poza tym stwierdzono, że kalmodulina bierze udział w regulowaniu procesu fosforylacji białek rozpuszczalnych koleoptyli kukurydzy [36].



Przedmiotem zainteresowań było także jądro komórki roślinnej, ponieważ zachodzi w nim intensywna fosforylacja białek przez endogenne kinazy [57]. Wyniki badań z zastosowaniem inhibitorów kalmoduliny,  $\text{Ca}^{2+}$  i EGTA sugerują, że kalmodulina może być zaangażowana w fosforylację białek jądrowych [39]. Skądinąd wiadomo, że częściowo oczyszczona kinaza histonowa pszenicy ulega aktywacji pod wpływem kompleksu  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina [13].

Ze względu na to, że w większości badań stosowano tylko preparaty mikrosomów, rozmieszczenie kinaz białkowych współdziałających z  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliną i ich substratów w komórce nie jest znane [56]. Oczyszczenie preparatów błonowych cukini pozwoliło jedynie stwierdzić, że białka fosforylowane przez te kinazy są specyficznym zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym, mitochondriach, plazmalemmie [13, 57]. Poza tym w badanych preparatach stwierdzono obecność trudnej do usunięcia endogennej kalmoduliny, co często uniemożliwiało określenie białek fosforylowanych w sposób zależny od kalmoduliny [36] i mogło być przyczyną tylko nieznacznej stymulacji aktywności kinaz białkowych przez egzogenną kalmodulinę [38]. Problem komplikuje się w świetle informacji wskazujących na to, że stężenie kalmoduliny stymulujące fosforylację może różnić się w zależności od białka będącego substratem [36]. Nie rozwiązuje go zastosowanie inhibitorów regulatorowego białka. Z badań przeprowadzonych na koleoptylach kukurydzy [36] wynika bowiem, że działają one hamująco na fosforylację w stężeniach zbyt wysokich, aby można było uznać specyficzność inhibicji, a z badań przeprowadzonych na rajgrasie [56], że zastosowane w bardzo wysokich stężeniach mogą stymulować fosforylację białek.

Dotychczas zidentyfikowano w roślinach wiele zależnych od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny kinaz białkowych włącznie z tymi, które udało się oczyścić i częściowo scharakteryzować [39]. Jednakże nie znane są substraty tych kinaz z wyjątkiem oksydoreduktazy chinian:  $\text{NAD}^+$  [39]. Jest ona typowo roślinnym enzymem, który katalizuje reakcję: chinon  $\rightleftharpoons$  dehydrochinon, przy czym jedynie ufosforylowana oksydoreduktaza stanowi formę aktywną enzymu [13, 16, 57]. Do odkrycia mechanizmu regulacji aktywności oksydoreduktazy przyczyniło się doświadczenie, które wykazało, że pozbawiony kalmoduliny, nieaktywny preparat enzymu staje się aktywny w obecności ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny jako niezbędnych składników procesu reaktywacji [13, 16, 57]. Te obserwacje sugerowały, że za aktywację oksydoreduktazy odpowiedzialna jest kinaza białkowa zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny [13, 16, 57], co następnie potwierdzono oczyszczając enzym fosforylujący oksydoreduktazę metodą chromatografii powinowactwa z kalmoduliną jako ligandem [57]. Tak więc oksydoreduktaza chinian:  $\text{NAD}^+$  podlega dwustopniowemu systemowi regulacji, który obejmuje zależną od stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  aktywację kinazy białkowej przez kalmodulinę (etap 1) oraz aktywację oksydoreduktazy na skutek fosforylacji katalizowanej przez aktywną formę kinazy (etap 2) [57]. Zgodnie z tym mechanizmem przebiega aktywacja oksydoreduktazy w zawieszinowych kulturach tkankowych marchwi rosnących na świetle, natomiast w komórkach hodowanych w ciemności,

oksydoreduktaza podlega bezpośredniej aktywacji przez  $\text{Ca}^{2+}$ , prawdopodobnie dzięki przyłączeniu dodatkowej podjednostki, której obecność stwierdzono w wyizolowanym enzymie [13, 57].

#### VI-7. Syntaza $\alpha$ -galaktozylo-1 $\rightarrow$ 1-glicero-3-fosforanu

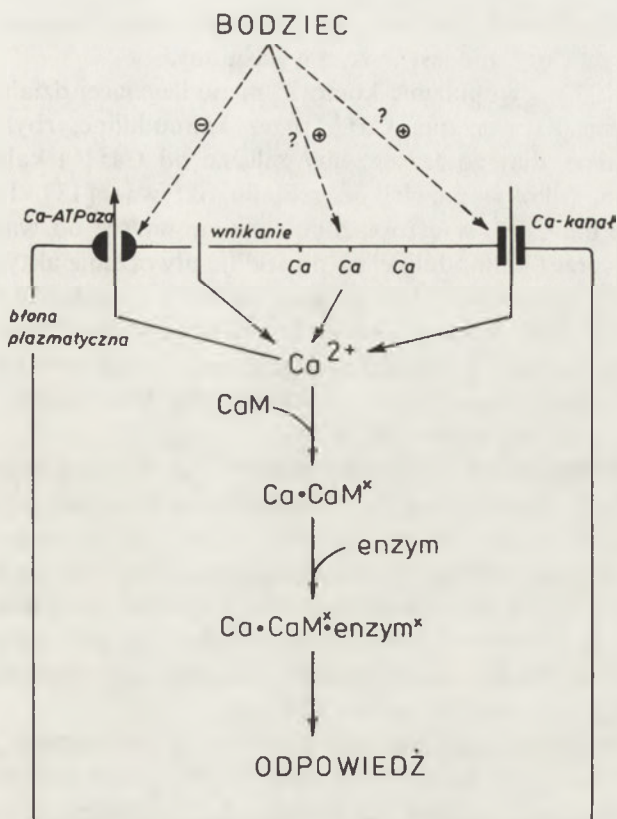
Kurczenie komórek *Poteroiochromonas malhamensis* umieszczonych w roztworze hipertonicznym powoduje wzrost aktywności syntazy odpowiedzialnej za regulację ciśnienia osmotycznego. Okazało się, że mechanizm aktywacji tego enzymu obejmuje zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  procesy błonowe oraz wywołaną przez nie aktywację proteazy, która jest bezpośrednim aktywatorem enzymu [46, 58]. Wprowadzając kalmodulinę mózgu wołu lub komórek glonu i jony  $\text{Ca}^{2+}$  do homogenatów z komórek o standardowej objętości wykazano, że  $\text{Ca}^{2+}$  wpływa na aktywację syntazy za pośrednictwem kalmoduliny [46, 58].

### VII. Rola $\text{Ca}^{2+}$ i kalmoduliny w świetle hipotezy przekaźnika II-rzędu

Jednym z mechanizmów tłumaczących zdolności adaptacyjne organizmu do środowiska zewnętrznego jest mechanizm opisany pod postacią hipotezy przekaźnika II rzędu. Dane świadczące o wzroście stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  pod wpływem stymulacji nerwowej lub hormonalnej, a także obecność białek wiążących  $\text{Ca}^{2+}$  takich jak kalmodulina w tkankach zwierzęcych sugerowały, że jony  $\text{Ca}^{2+}$  funkcjonują jako przekaźnik II-rzędu u zwierząt [6]. Odkrycie kalmoduliny w roślinach przemawiało za tym, że jony  $\text{Ca}^{2+}$  mogą pełnić podobną rolę w komórkach roślinnych. Obecnie powszechnie uznaje się  $\text{Ca}^{2+}$  za istotny element systemu przenoszenia bodźców [13, 16, 31].

W komórce roślinnej spełnione są warunki niezbędne do funkcjonowania takiego systemu regulacji. Pośrednie dane wskazują bowiem, że stężenie wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytosolu niestymulowanych komórek roślin wyższych jest niskie (poniżej  $1 \mu\text{M}$ ), [13, 30, 41]. Ponadto z badań nad transportem  $\text{Ca}^{2+}$  wynika, że komórki roślinne są wyposażone w system kontroli i regulacji stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  [13, 33, 44, 45].

Istnieją przesłanki by sądzić, że w roślinach rzeczywiście zachodzi regulacja według mechanizmu przekaźnika II rzędu z udziałem  $\text{Ca}^{2+}$ . Wykazano bowiem, że światło i niektóre hormony zmieniają właściwości transportu  $\text{Ca}^{2+}$  w różnych frakcjach subkomórkowych [13, 16, 44–46]. Poza tym pewne badania nad wpływem bodźców takich jak hormony, światło, fitotoksyczne substancje grzybowe, grawitacja na procesy fizjologiczne [13, 16, 38, 46, 59] sugerują, że istnieje związek między percepcją bodźca, wzrostem stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  a obserwowaną reakcją fizjologiczną. W niektórych przypadkach stwierdzono, że  $\text{Ca}^{2+}$  w podwyższonym stężeniu może oddziaływać na badane procesy za pośrednictwem kalmoduliny [13, 15, 38]. Najbardziej przekonującym argumentem za takim mechanizmem przenoszenia bodźców jest aktywacja kinazy NAD pod wpływem światła w nienaruszonych tkankach [13, 16].



**Ryc. 1.** Schemat udziału  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny w regulacji metabolizmu komórki roślinnej [13].  
 Objasnienia:  $\ominus$   $\oplus$  oddziaływanie hamujące,  $\oplus$   $\oplus$  oddziaływanie stymulujące,  $?$  — oddziaływanie niedostatecznie poparte danymi doświadczalnymi,  $-\text{Ca}$  — wapń związany przez błonę plazmatyczną,  $\text{CaM}$  — kalmodulina,  $\text{Ca} \cdot \text{CaM}^x$  — kompleks  $\text{Ca}^{2+}$  — kalmodulina (aktywna forma kalmoduliny),  $\text{Ca} \cdot \text{CaM}^x \text{enzym}^x$  — kompleks aktywnej kalmoduliny z enzymem,  $x$  — zmieniona konformacja.

Udział  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny w regulacji metabolizmu komórki, zgodny z hipotezą przekaźnika II rzędu, został przedstawiony na rycinie 1. Pod wpływem bodźców zewnętrznych (przekaźniki I rzędu) stężenie wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie rośnie, prawdopodobnie z  $0,1 \mu\text{M}$  do  $1\text{--}10 \mu\text{M}$  [13]. Przypuszcza się, że zjawisko to może być spowodowane:

- wnikaniem  $\text{Ca}^{2+}$  ze środowiska komórki przez kanały wapniowe, które są otwierane na skutek działania bodźców [13, 45],
- uwalnianiem  $\text{Ca}^{2+}$  przez organelle komórkowe takie jak retikulum endoplazmatyczne, wakuole i mitochondria [38] oraz cysterny wapniowe, które występują w komórkach niektórych glonów [38, 60], śluzowców i mimosy [60],
- uwalnianiem wapnia związanego [13],
- zmniejszeniem aktywności transportu  $\text{Ca}^{2+}$  na zewnątrz cytoplazmy [13, 16], obniżeniem aktywności zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny ATPazy błonowej, która traci wrażliwość na kalmodulinę pod wpływem światła [33]. Molekularny



mechanizm oddziaływania bodźców na elementy systemu transportu zaangażowane w przepływ  $\text{Ca}^{2+}$  nie jest jeszcze wyjaśniony.

Stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie komórki niepodlegającej działaniu bodźców jest, z uwagi na  $K_D$  wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  przez kalmodulinę, zbyt niskie, żeby aktywować białko, dlatego też enzymy zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny są nieaktywne lub tylko w niewielkim stopniu aktywne [13]. Pod wpływem stymulacji stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie staje się wyższe od wartości  $K_D$  dla wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  przez kalmodulinę, co powoduje utworzenie aktywnego kompleksu  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina [13]. Przypuszcza się, że  $\text{Ca}^{2+}$  w stężeniu wyższym niż  $1\ \mu\text{M}$  jest w stanie zaktywować większość komórkowej kalmoduliny [39]. Z kolei aktywny kompleks  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina łącząc się z enzymem wywołuje reakcje biochemiczne, które mają istotne znaczenie dla fizjologicznej odpowiedzi komórki na działające bodźce [13, 21].

Obecność kalmoduliny w różnych przedziałach komórkowych, gdzie najprawdopodobniej spełnia funkcje regulatorowe, nasuwa przypuszczenie, że w organellach mają miejsce zmiany stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i zachodzi regulacja aktywności enzymów według mechanizmu zaproponowanego dla enzymów cytoplazmy [13]. Pewnym potwierdzeniem tej tezy są wyniki które wskazują, że stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w stromie chloroplastów zwiększa się pod wpływem światła wskutek transportu  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplazmy [37, 44] albo uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnętrznych przestrzeni tylakoidów [30].

Kalmodulina wykazuje zdolność do stymulowania akumulacji jonów wapnia w wakuolach, retikulum endoplazmatycznym, cysternach mikrosomalnych, a także transportu  $\text{Ca}^{2+}$  na zewnątrz komórki [13]. Obserwacje te sugerują, że kalmodulina nie tylko odbiera sygnał jakim jest wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ , ale ma również wpływ na intensywność i czas trwania tegoż sygnału [5] oraz bierze udział w regulowaniu swej własnej aktywności [13]. Ponadto wraz z odkryciem naturalnych inhibitorów kalmoduliny w jabłkach [61] pojawia się możliwość występowania innego niż poprzez zmiany stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  mechanizmu regulowania aktywności kalmoduliny.

Pragnę podziękować Panu Prof. Zbigniewowi Kaniudze za pomoc w przygotowaniu niniejszego artykułu.

Opracowanie wykonane w ramach tematu 1.09 finansowanego z CPBP 05.02.

Artykuł otrzymano 9 kwietnia 1988 r.  
Zaakceptowano do druku 20 czerwca 1988 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Cheung W. Y., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 533—538.
2. Cheung W. Y., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2859—2869.
3. Kakiuchi S., Yamazaki R., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1104—1110.
4. Teo T. S., Wang J. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5950—5955.

5. Wang H.J., Waisman D.M., (1979), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **15**, 47—107.
6. Kuźnicki K., Drabikowski W., (1980), *Post. Bioch.*, **26**, 265—290.
7. Muto S., Miyashi S., (1977), *Plant Physiol.*, **59**, 55—60.
8. Anderson J.M., Cormier M.J. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 595—602.
9. Anderson J.M., Charbonneau H., Jones H.P., McCann R.O., Cormier M.J., (1980), *Biochem.*, **19**, 3113—3120.
10. Cheung W.Y., Lynch T.J., Wallace R.W., (1978), *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **9**, 233—251.
11. Kuźnicki J., Kuźnicki L., Drabikowski W., (1979), *Cell. Biol. Inter. Rep.*, **3**, 17—23.
12. Klee C.B., Crouch T.H., Richman P.G., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 489—515.
13. Dieter P., (1984), *Plant Cell. Environm.*, **7**, 371—380.
14. Cox J.A., Ferraz C., Demaille J.G., Perez R.O., Van Tuinen D., Marme D., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 10694—10700.
15. Wagner G., Valentin P., Dieter P., Marme D., (1984), *Planta*, **162**, 62—67.
16. Marme D., (1982), *What's New Plant Physiol.*, **13**, 37—40.
17. Grand R.J.A., Nairn A.C., Perry S.V., (1980), *Biochem. J.*, **185**, 755—760.
18. Föhr K.J., Enßle M., Schraudolf H., (1980), *Planta*, **171**, 127—129.
19. Dieter P., Cox J.A., Marme D., (1985), *Planta*, **166**, 216—218.
20. Schleicher M., Lukas T.J., Watterson D.M., (1983), *Plant Physiol.*, **73**, 666—670.
21. Nguyen T.D., Siegenthaler P.A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **840**, 99—106.
22. Muto S., Miyachi S., (1984), *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, **114**, s., 421—431.
23. Watterson D.M., Iverson D.B., Van Eldik L.J., (1980), *Biochemistry*, **19**, 5762—5768.
24. Ferrario S., (1986), *Physiol. Vég.*, **24**, 559—567.
25. Dubery I. A., Schabert J.C., (1987), *Phytochem.*, **26**, 37—40.
26. Fry I.J., Villa L., Kuehn G.D., Hageman J.H., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 212—217.
27. Inovye S., Harada W., Zusman D., Inouye M., (1981), *J. Bacteriol.*, **148**, 678—683.
28. Iwasa Y., Yonemitsu K., Matsui K., Fukunga K., Miyamoto E., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 656—660.
29. Lin C.-T., Sun D.Y., Wu J.-Y., (1983), *J. Cell. Biol.*, **97**, 40a.
30. Black C.C., Brand J.J., (1986), w Calcium and Cell Function, red. Cheung W.Y., t. VI, 328—357. Academic Press, Orlando.
31. Cheung W.Y., (1980), *Science*, **207**, 19—27.
32. Luan Y., Matsuura I., Yazawa M., Nakamura T., Yagi K., (1987), *J. Biochem.*, **102**, 1531—1537.
33. Kuźnicki J., (1987), *Post. Biologii Komórki*, **14**, 121—129.
34. Tonaka T., Hidaka H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11078—11080.
35. Astle M.C., Rubery P.H., (1986), *Plant Sci.*, **43**, 165—172.
36. Veluthambi K., Poovaiah B.W., (1984), *Plant Physiol.*, **76**, 359—365.
37. Jarret H. W., Brown C.J., Black C.C., Cormier M.J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13795—13804.
38. Hepler P.K., Wayne R.O., (1985), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 397—439.
39. Roux S.J., Wayne R.O., Datta N., (1986), *Physiol. Plant.*, **66**, 344—348.
40. Muto S., Miyachi S., Usuda H., Edwards G.E., Bassham J.A., (1981), *Plant Physiol.*, **68**, 324—328.
41. Simon P., Dieter P., Bonzon M., Greppin H., Marme D., (1982), *Plant Cell. Rep.*, **1**, 119—122.
42. Simon P., Bonzon M., Greppin H., Marme D., (1984), *FEBS Lett.*, **159**, 332—328.
43. Sauer A., Robinson D.G., (1985), *Planta*, **166**, 227—233.
44. Moore A.L., Åkerman K.E.O. (1984), *Plant Cell Environm.*, **7**, 423—429.
45. Marmé D., (1985), *Physiol. Vég.*, **23**, 945—953.
46. Kauss H., (1987), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **38**, 47—72.

47. Giroud Ch., Siegenthaler P.A., (1987), *C. R. Acad. Sci.*, **305**, Serie III, 399—404.
48. Sane P.V., Kochhar S., Kumar N., Kochhar V.K., (1984), *FEBS Lett.*, **175**, 238—242.
49. Kochhar S., Kochhar V.K., Sane P.V., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **880**, 220—225.
50. Bonner P.L.R., Hetherington A.M., Lea P.J., (1986), *FEBS Lett.*, **195**, 119—121.
51. Moreau R.A., Isett T.F., (1985), *Plant Sci.*, **40**, 95—98.
52. Moreau R.A., (1986), *Plant Sci.*, **47**, 1—9.
53. Morau R.A., Isett T.F., Piazza G.J., (1985), *Phytochemistry.*, **24**, 2555—2558.
54. Sane P.V., Kumar N., Naijal M., Singh K.K., Kochhar V.K., (1987), *Phytochem.*, **26**, 1289—1291.
55. Poliyath G., Poovaiah B.W., (1985), *Plant Cell Physiol.*, **26**, 77—86.
56. Tauliers C., Alibert G., Ranjeva R., (1985), *Plant Cell Rep.*, **4**, 189—201.
57. Ranjeva R., Graziana A., Ranty B., Cavalie G., Boudet A.M., (1984), *Physiol. Vég.*, **22**, 365—376.
58. Kauss H., (1983), *Plant Physiol.*, **71**, 169—172.
59. Hetherington A.M., Mansfield T.A., (1985), *New Phytol.*, **10**, 555—564.
60. Rosseacher R., Wagner G., (1984), *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* **B3**, 664—666.
61. Paliyath G., Poovaiah B.W., (1985), *Plant Cell Physiol.*, **26**, 201—209.
62. Le Roux P. F., Dubery I.A., (1989), *Phytochemistry*, **28**, 705—711.
63. Thompson M. P., Piazza G. J., Brower D. P., Farrell H. M., Jr., (1989), *Plant Physiol.*, 501—505.
64. Brias S. A., Kessler F., Evans D. E., (1988), *Planta*, **176**, 283—285.
65. Brias S. A., Evans D. E., (1989), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 185—191.
66. Ślaski J. J., (1989), *J. Plant Physiol.*, **133**, 696—701.
67. Cocucci M., Negrini N., (1989), *Plant Physiol.*, **88**, 910—914.
68. Marmé D., (1989), *Second Messengers in Plant Growth and Development*, 57—80, Alan R. Liss, Inc. New York.

#### Addendum

Ostatnio wyizolowano kalmodulinę z owoców awokado [62], liści *Papaver somniferum* i *Euphorbia lathyris* [63] oraz określono niektóre jej właściwości. Przedstawiono także nowe dane na temat ATPazy stymulowanej przez  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmodulinę [64, 65] oraz wyniki badań nad wpływem glinu na aktywność zależnej i niezależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny kinazy NAD w korzeniach pszenicy [66]. Ponadto odkryto inhibitor kalmoduliny i wykazano zmiany jego poziomu jak również poziomu kalmoduliny w zarodkach rzodkiewki podczas wczesnych faz kiełkowania nasion [67]. Interesujący przegląd aktualnych informacji dotyczących roli  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny w przenoszeniu sygnałów został zaprezentowany przez Dietera Marmé [68].



ANDRZEJ KONIECZNY\*

## Leghemoglobiny i geny leghemoglobinowe

### Leghemoglobins and leghemoglobin genes

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Leghemoglobina
  - II-1. Występowanie
  - II-2. Analiza sekwencji aminokwasowej
  - II-3. Rozmieszczenie w komórkach brodawki
- III. Geny leghemoglobinowe
  - III-1. Struktura genów Lb
  - III-2. Chromosomalne rozmieszczenie genów rodziny Lb
- IV. Regulacja ekspresji genów leghemoglobinowych
  - IV-1. Ekspresja genów Lb w trakcie rozwoju brodawki korzeniowej
  - IV-2. Udział *Rhizobium* w indukcji genów Lb
    - IV-2.1. Geny *Rhizobium* biorące udział w indukcji genów Lb
    - IV-2.2. Czy grupa hemowa indukuje syntezę Lb?
  - IV-3. Analiza regionów DNA kontrolujących ekspresję genów Lb
- V. Evolucja genów leghemoglobinowych

#### Contents

- I. Introduction
- II. Leghemoglobin
  - II-1. Occurence
  - II-2. Amino acid sequence analysis
  - II-3. Intracellular location in nodule
- III. Leghemoglobin genes
  - III-1. Structure of Lb genes
  - III-2. Chromosomal arrangement of Lb gene family
- IV. Regulation of expression of leghemoglobin genes
  - IV-1. Expression of Lb genes during nodule development
  - IV-2. Involvement of *Rhizobium* microsymbiont in the induction of Lb genes
    - IV-2.1. *Rhizobium* genes involved in the induction of Lb genes
    - IV-2.2. Does heme moiety induce Lb apoprotein synthesis?
  - IV-3. Analysis of regulatory elements in Lb genes
- V. Evolution of leghemoglobin genes

\* Dr, Katedra Biochemii, Akademia Rolnicza, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Wykaz stosowanych skrótów: bakteroid — nowa forma bakterii *Rhizobium* zdolnych do przyswajania azotu atmosferycznego, zlokalizowanych w komórce roślinnej, oddzielonych od cytoplazmy rośliny gospodarza błoną bakteroidową; sekwencja promotorowa, promotor — region DNA, zwykle w kierunku 5' od kodonu inicjującego, zawierający zachowawcze odcinki DNA niezbędne dla optymalnej transkrypcji genu eukariotycznego: CAT — acetylotransferaza chloramfenikolu; gen kodujący CAT — najczęściej stosowany obecnie w transferach genowych jako tzw. „reporter gene” ze względu na prostą i szybką metodę identyfikacji tego enzymu. Pojawienie się aktywności CAT w stransformowanej roślinie jest świadectwem ekspresji chimerycznego genu; pseudogen — gen nie ulegający ekspresji ze względu na mutacje w ważnych dla jego transkrypcji regionach DNA; Lb, gen Lb — leghemoglobina, gen leghemoglobinowy; p.z. — par zasad.

## I. Wstęp

Symbioza bakterii glebowych rodzaju *Rhizobium* i roślin z rodziny motylkowatych prowadzi do wytworzenia wysoce wyspecjalizowanego organu — brodawki korzeniowej. W brodawkach tych odbywa się wiązanie azotu atmosferycznego po uprzedniej jego redukcji przez enzym bakteryjny — nitrogenazę. Zakażenie komórek korzenia bakteriami *Rhizobium* zapoczątkowuje szereg procesów warunkujących morfogenezę brodawki. W trakcie jej rozwoju powstaje około 20—30 polipeptydów (nodulin) nieobecnych w niezakażonym korzeniu [1—5]. Jednym z nich jest związek posiadający, jak wykazano już w 1939 r., właściwości hemoglobiny [6]. Ponieważ występuje w roślinach motylkowych — Leguminosae nazwano go leghemoglobina.

Lata siedemdziesiąte przyniosły wiele nowych informacji dotyczących tego interesującego białka. Wiadomo, że leghemoglobina uczestniczy w wiązaniu azotu atmosferycznego przez utrzymanie odpowiedniego ciśnienia parcjalnego tlenu w otoczeniu bakteroidu, w którym mają miejsce intensywne procesy oddychania, fosforylacji i przyswajania azotu. Ciśnienie tlenu utrzymywane jest przez leghemoglobinę na takim poziomie, aby chronić przed uszkodzeniem wrażliwy na tlen kompleks nitrogenazy, a jednocześnie zapewnić odpowiedni dla procesów fosforylacji i oddychania dopływ tlenu do bakteroidu. Białko to spełnia więc podwójną rolę. Jest to możliwe dzięki temu, że wykazuje ono niezwykle wysokie powinowactwo do tlenu, znacznie wyższe niż np. mioglobina czy hemoglobina [7].

Obecne badania zmierzają w kierunku poznania molekularnego mechanizmu regulacji ekspresji genów leghemoglobinowych i identyfikacji sygnału odpowiedzialnego za ich aktywację w brodawkach korzeniowych. Wyjaśnienie tego problemu może być pomocne w uzyskaniu, drogą manipulacji genetycznych, nowych użytecznych rodzajów symbiozy. Jest bowiem leghemoglobina elementem naturalnych układów symbiotycznych: rośliny motylkowate — bakterie *Rhizobium*.

Celem tego artykułu jest ukazanie miejsca i funkcji leghemoglobiny w symbiotycznym wiązaniu azotu atmosferycznego, a także przedyskutowanie najnowszych poglądów nt. regulacji transkrypcji genów Lb. O ile zwierzące geny

globinowe zostały opisane w artykule przeglądowym w tym czasopiśmie [8], o tyle geny roślinne nie doczekały się takiego opracowania w języku polskim, chociaż w literaturze światowej było ich kilka [7, 9, 10].

## II. Leghemoglobina

### II-1. Występowanie

Obecnie nie ulega wątpliwości, że Lb znajduje się w brodawkach wszystkich roślin przyswajających azot. Wiadomo, że niektóre mutanty *Rhizobium* mogą indukować wytwarzanie brodawek korzeniowych zawierających leghemoglobinę, ale niezdolnych do wiązania azotu [3, 11, 12], nie znana jest natomiast sytuacja odwrotna, tzn. istnienie brodawek pozbawionych leghemoglobiny i przyswajających azot. Świadczy to o jej kluczowej roli w procesie asymilacji azotu. Należy odnotować, że znane są również, współżyjące z *Rhizobium* rośliny motylkowate, np. *Aeschynomene* i *Sesbania*, które wytwarzają zawierające leghemoglobinę brodawki nie tylko na korzeniach, ale również na łodygach [13].

Ostatnio pojawiły się doniesienia o występowaniu hemoglobiny w roślinach innych niż motylkowate [14, 15]. Wiążąca azot atmosferyczny *Parasponia andersonii* z rodziny *Ulmaceae* (rzęd *Utricales*) ulega zakażeniu przez niektóre bakterie *Rhizobium*. Jej brodawki zawierają dimeryczną hemoglobinę, która działa podobnie do leghemoglobiny pełniąc rolę przenośnika tlenu.

Dokładna analiza spektrofotometryczna skrawków brodawek wykazała obecność hemoglobiny w brodawkach kilku roślin np. *Casuarina cunninghamiana* i *Myrica gale* [10, 15], zdolnych do przyswajania azotu w asocjacji z grzybami (*Actinomycetes*) rodzaju *Frankia* [16]. Stosując metodę hybrydyzacji DNA--DNA, znaleziono sekwencje DNA homologiczne do genów Lb u czterech innych roślin z tej rodziny: *Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca*, *Ceanotus americanus* i *Elaeagnus pungens* [17]. Sugeruje to możliwość występowania hemoglobiny również i w tych roślinach. Napływające informacje wskazują, że globiny są znacznie bardziej rozpowszechnione w świecie roślin niż dotąd sądzono.

Dotychczas wyodrębniono leghemoglobinę z soi i fasoli [7], bobu [18], grochu [18, 19], lucerny [20], koniczyny [21], *Sesbania* [13] i łąbinu [7, 20]. Zastosowanie metody izoelektroogniskowania pozwoliło na wykazanie, że u większości roślin leghemoglobina występuje w kilku formach monomerycznych. Na przykład w skład Lb soi wchodzi cztery komponenty główne: a, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, c<sub>3</sub> i cztery uboczne: b, d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, d<sub>3</sub>, które są produktami potranslacyjnej modyfikacji komponentów głównych [23]. Otwarta jest kwestia liczby komponentów Lb w łąbinie. Niektórzy autorzy znajdują dwa [24, 25], inni trzy [22, 26]. Obserwuje się zmiany stosunków ilościowych poszczególnych komponentów w trakcie rozwoju brodawki [27, 28]. Różne jest także ich powinowactwo do tlenu: komponenty Lb powstające głównie w brodawkach starszych mają wyższe



powinowactwo do tlenu niż syntetyzowane w brodawkach młodych [19]. Względne zmiany ilościowe poszczególnych komponentów, zachodzące w rozwijających się brodawkach mogą więc wpływać na zaopatrzenie bakteroidów w tlen, a zatem mogą sprzyjać zwiększeniu efektywności wiązania azotu.

## II-2. Analiza sekwencji aminokwasowej

Dotychczas została oznaczona sekwencja aminokwasów dwu leghemoglobiny, LbI i LbII, z łubinu [24, 25], Lba [29] i Lbc<sub>2</sub> [30] z soi, Lba z fasoli [31], LbI z grochu [32] i bobu [33] oraz hemoglobiny z *Casuarina* [34]. Ponadto poznana została sekwencja DNA genów: Lba, Lbc<sub>1</sub> [35], Lbc<sub>2</sub> i Lbc<sub>3</sub> [36] z soi, Lb z fasoli [37], Lb2 i Lb3 z *Sesbania* [38], hemoglobiny z *Parasponia* [39] oraz cDNA LbI i LbII z łubinu [40, 41]. Poznanie sekwencji nukleotydowej DNA pozwoliło na wydedukowanie sekwencji aminokwasowej białek i ewentualne jej skorygowanie (w przypadku soi i łubinu).

Porównanie sekwencji aminokwasowej poszczególnych komponentów w obrębie gatunku wskazuje, że różnice między nimi są niewielkie. Na przykład LbI i LbII z łubinu (obie mają po 153 reszty aminokwasowe) różnią się 18 aminokwasami. Bardziej różnią się leghemoglobiny pochodzące z różnych roślin: hemoglobina z *Parasponia* różni się od Lb z roślin motylkowych połową swoich aminokwasów. Jeśli natomiast porównamy wszystkie globiny roślinne i zwierzęce, włączając w to również niedawno wyizolowaną hemoglobinę bakteryjną [42], to okaże się, że tylko dwa aminokwasy znajdują się w tym samym miejscu we wszystkich globinach. Są to histydyna, która łączy się kowalencyjnie z grupą hemową i fenyloalanina utrzymująca grupę hemową w jej hydrofobowym „gniazdku”. Zadziwiające jest, że mimo tak znacznych różnic w sekwencji aminokwasowej, konformacja łańcucha polipeptydowego globin jest bardzo podobna. Wykazała to analiza komputerowa globin [43] i analiza rentgenograficzna kryształu leghemoglobiny z łubinu [44]. Na podstawie uzyskanych danych zaproponowano hipotezę, że wszystkie białka globinowe, w tym także roślinne, pochodzące od jednego wspólnego genu globinowego. Konkluzja ta zostanie omówiona w dalszej części artykułu (rozdz. V).

## II-3. Rozmieszczenie w komórkach brodawki

Na ten temat do niedawna zdania były podzielone. Niektórzy autorzy twierdzili, że leghemoglobina znajduje się wyłącznie w cytoplazmie komórek roślinnych zakażonych *Rhizobium*, i nie jest transportowana poprzez błonę otaczającą bakteroidy (tzw. „peribacteroid membrane”) [45, 46]. Inni utrzymywali, że leghemoglobina znajduje się po obu stronach tej błony, tzn. zarówno w cytoplazmie jak i wewnątrz otoczki zamykającej bakteroid lub niewielką grupę bakteroidów [47, 48]. Autorom tym zarzucano jednak, że otrzymany rezultat może być artefaktem, wynikającym z uszkodzenia błony otaczającej bakteroid w trakcie przygotowywania próbek mikroskopowych.

Rozwiązanie tego problemu nastąpiło dzięki zastosowaniu techniki barwienia skrawków brodawek złotem, po reakcji z przeciwciałem skierowanym przeciw leghemoglobinie. Metodą tą precyzyjnie wykazano, że leghemoglobina znajduje się w cytoplazmie i jądrach komórek zakażonych, a nie w przestrzeni otaczającej bakteroidy [49]. Wynik ten jest zgodny z wynikami wcześniejszych badań nad syntezą *in vitro* leghemoglobiny, które wykazały, że powstający łańcuch peptydowy Lb soi [27], a także łubinu [50] nie zawiera sekwencji sygnałowej, umożliwiającej ewentualny transport tego białka przez błonę otaczającą bakteroid. Nie gdzie indziej, jak tylko w cytoplazmie komórek rośliny gospodarza zlokalizowano także niektóre enzymy niezbędne do utrzymania leghemoglobiny w stanie aktywnym (zredukowanym) [51]. W świetle uzyskanych danych kwestia lokalizacji Lb w cytoplazmie komórek zakażonych wydaje się przesądzona. Pozostaje jednak niewyjaśnione czy Lb spełnia jakąkolwiek rolę w jądrach tych komórek, dokąd może przemieścić się na drodze dyfuzji.

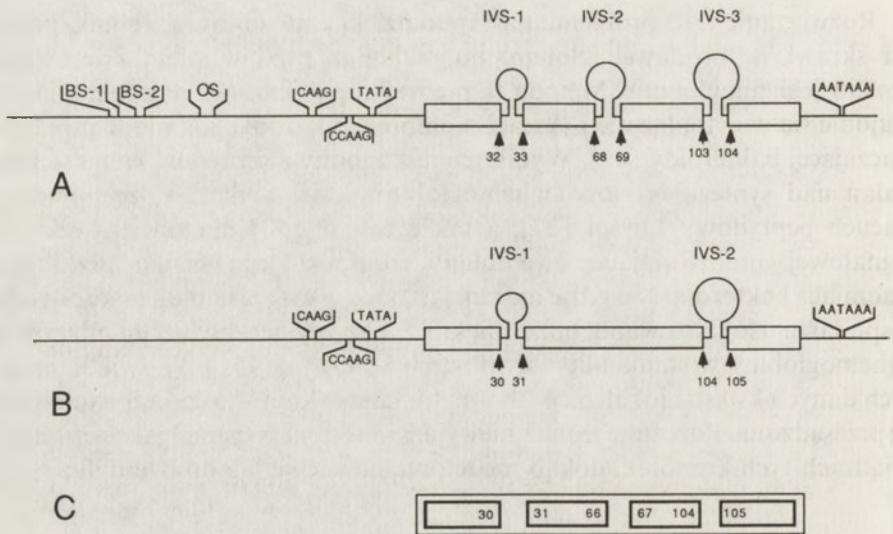
### III. Geny leghemoglobinowe

#### III-1. Struktura genów Lb

A p p l e b y zauważył, że leghemoglobina może być kodowana przez genom roślinny, a nie bakteryjny [9]. Jego sugestia była oparta na doświadczeniach polegających na zakażeniu wybranych roślin różnymi szczepami *Rhizobium* i identyfikacji pojawiającej się leghemoglobiny. Niezależnie od tego jakim szczepem bakterii zakażona jest roślina, zawsze powstaje w brodawkach ta sama, specyficzna dla niej leghemoglobina. Inaczej mówiąc biosynteza Lb kontrolowana jest przez roślinę, a nie przez jej mikrosymbionta *Rhizobium*. Konkluzja ta została w pełni potwierdzona na poziomie molekularnym. Translacja *in vitro* poli(A) mRNA z brodawek soi [52], a także łubinu [50], prowadzi do syntezy apoleghemoglobiny. cDNA przygotowany na matrycy tego mRNA hybryduje wyłącznie z roślinnym DNA a nie z DNA *Rhizobium* [53, 54].

Początek lat osiemdziesiątych przyniósł znaczny postęp w badaniach genów roślinnych. Spośród genów leghemoglobinowych najlepiej poznane zostały geny Lb soi. Stanowią one niewielką rodzinę liczącą conajmniej osiem genów. Cztery z nich kodują główne komponenty leghemoglobiny: a, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub> i c<sub>3</sub> [36, 37]. Ponadto wyizolowano cztery inne geny, które nie są funkcjonalne. Są to dwa pseudogeny:  $\psi_1$ Lb, zmutowany w regionie istotnym dla transkrypcji,  $\psi_2$ Lb posiadający kodon terminujący w drugim eksonie [56] oraz dwa niekompletne geny (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) [53—58].

Struktura wszystkich poznanych genów jest następująca (Ryc. 1): cztery eksony są przedzielone trzema sekwencjami intronowymi (IVS) [59]. Dwa z trzech intronów (IVS-1 i IVS-3) znajdują się dokładnie w takich samych miejscach jak w genach zwierzęcych, tzn. między kodonami 32 i 33 oraz 103 i 104. Natomiast trzeci intron (IVS-2), którego brak we współczesnych genach



**Ryc. 1.** Porównanie budowy roślinnych (A) i zwierzęcych (B) genów globinowych (na podstawie [55–59]) i ich relacja do jednostek strukturalnych znalezionych w globinach [60]. Sekwencje kodujące oznaczono białymi prostokątami; sekwencje niekodujące linią ciągłą. Zaznaczono regiony, którym przypisuje się znaczenie w regulacji transkrypcji. Liczby podają numery kodonów między którymi znajdują się introny (IVS). OS — region DNA odpowiedzialny za tkankowo-specyficzną ekspresję genów Lb zidentyfikowany na podstawie analizy promotora (“deletion analysis”), wg [78]; BS-1, BS-2 — elementy DNA oddziaływujące specyficznie z czynnikami białkowymi z brodawek, wg [81].

kodujących globinę zwierzęcą, znajduje się między 68 i 69 kodonem. Jego pozycja została zadziwiająco dokładnie przewidziana na podstawie analizy komputerowej struktury globiny, która wykazała w globinach zwierzęcych cztery jednostki strukturalne (Ryc. 1.) [60]. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że centralny ekson w zwierzęcych genach globinowych może być wynikiem fuzji dwu eksonów prymitywnego genu globinowego.

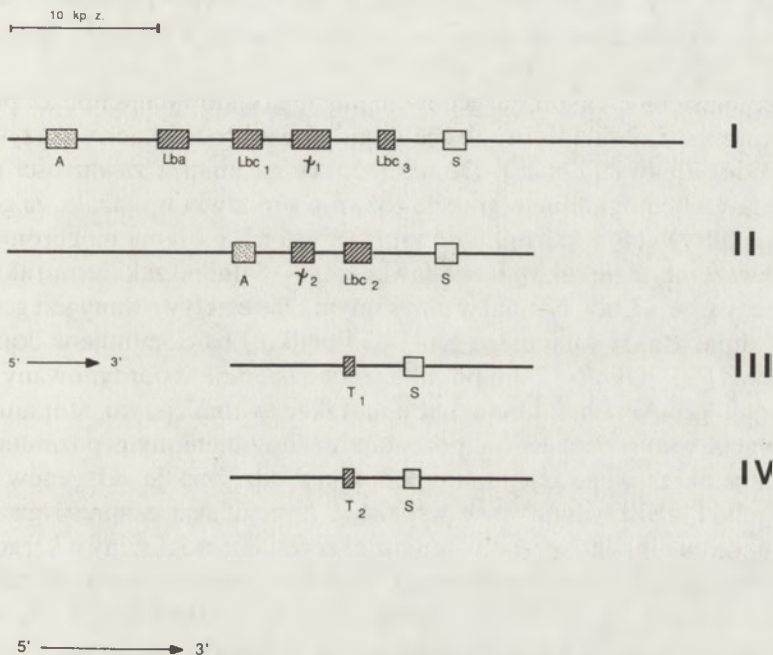
Długość sekwencji intronowych IVS-1 waha się od 94 do 169 p.z., a długość IVS-2 od 100 do 234 p.z. Wyjątkiem jest tu pseudogen  $\psi_1$  Lb, który ma IVS o długości 1370 p.z. Długość IVS-3 waha się od 147 do 778 p.z. Analiza sekwencji złącz intron-ekson ujawniła, że sekwencje intronowe rozpoczynają się dwunukleotydem GT, natomiast kończą się AG, podobnie jak ma to miejsce w innych genach [61]. Geny leghemoglobinowe zawierają domniemane sekwencje regulatorowe, identyczne lub bardzo podobne do tych znalezionych w genach innych organizmów eukariotycznych: sekwencje -CAAG- (tzw. „CAAT-box”), sekwencje -TATA- (tzw. „TATA-box”) oraz pięcionukleotyd -CCAAG-, któremu również przypisuje się udział w inicjacji transkrypcji (Ryc. 1). Ponadto sugeruje się (Rozdz. IV.3.), że niektóre fragmenty DNA promotora leghemoglobinowego odpowiedzialne są prawdopodobnie za organospecyficzną ekspresję genów Lb w brodawkach korzeniowych. Od strony 3' transkrypty genów leghemoglobinowych zawierają niekodujący region zakończony sekwencją poli(A). Miejsce



przyłączenia poli(A) poprzedza charakterystyczna sekwencja -AATAAA- odpowiedzialna, jak się wydaje za poliadenylację (Ryc. 1).

### III-2. Chromosomalne rozmieszczenie genów rodziny Lb

Rodzina genów Lb jest rozmieszczona na chromosomie w czterech regionach (Ryc. 2) [62, 63]. W regionie pierwszym (I) cztery geny ułożone są w następującym porządku: 5'-Lba-Lbc<sub>1</sub>-ψ<sub>1</sub>Lb-Lbc<sub>3</sub>-3'. Drugi region (II) zawiera dwa geny: 5'-ψ<sub>2</sub>Lb-Lbc<sub>2</sub>-3'. Dwa pozostałe niekompletne geny Lb zostały zlokalizowane na dwóch różnych fragmentach DNA (III i IV) nie połączonych ze sobą [63].



Ryc. 2. Rozmieszczenie genów leghemoglobiновых na chromosomie soi, wg [62, 63]. Opis w tekście.

Odległość między poszczególnymi genami w regionie I i II wynosi 2000—3000 p.z. We wszystkich regionach (I—IV) poza genami Lb w kierunku 5' i 3' znaleziono sekwencje DNA (ozn. A i S na Ryc. 2), które ulegają ekspresji nie tylko w brodawkach jak leghemoglobina, ale również w liściach i w korzeniach niezakażonych. Oznacza to, że elementy DNA odpowiedzialne za organospecyficzną ekspresję leghemoglobiny znajdują się w bardzo bliskim sąsiedztwie genów Lb. Ich roli zostanie poświęcona dalsza część artykułu (Rozdz. IV.3.). Dotychczas nie znaleziono genów innych nodulin, leżących na chromosomie blisko genów Lb. Jest więc prawdopodobne, że jeśli te geny znajdują się na tym samym chromosomie, to są „przemieszane” z genami podlegającymi ekspresji także w innych tkankach rośliny, a mechanizm kontrolujący ich skoordynowaną transkrypcję może być niezwykle skomplikowany.

## IV. Regulacja ekspresji genów leghemoglobinowych

### IV-1. Ekspresja genów Lb w trakcie rozwoju brodawki korzeniowej

Ekspresja niemal wszystkich poznanych zwierzęcych genów globinowych podlega zmianom w trakcie rozwoju organizmu [8]. Geny te ułożone są na chromosomie w kolejności zgodnej z kolejnością ich ekspresji w trakcie rozwoju organizmu. I tak np., w rodzinie genów typu  $\alpha$  ekspresja genu kodującego hemoglobinę zarodkowa  $\zeta$  następuje tylko w pierwszych tygodniach rozwoju w pęcherzyku żółtkowym embrionu. Później następuje ekspresja niemal identycznych genów  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ , kodujących polipeptydy hemoglobiny płodowej i dorosłej. Gen kodujący polipeptyd  $\zeta$  znajduje się na chromosomie w kierunku 5' od genów  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ .

Inaczej następuje ekspresja genów leghemoglobinowych, chociaż pierwsze obserwacje zmian zawartości apoleghemoglobiny w brodawkach wskazywały na pewne podobieństwa [27, 28]. Dopiero dokładna analiza zawartości mRNA kodującego leghemoglobinę w trakcie rozwoju brodawki wykazała, że geny Lb soi ulegają aktywacji w kierunku odwrotnym do ich ułożenia na chromosomie [56]. We wczesnej fazie rozwoju brodawki soi (7—8 dni po zakażeniu) aktywacji ulegają geny  $Lbc_3$  i  $Lbc_1$ . Niemal w tym samym czasie aktywowany jest gen  $Lbc_2$ . Po kilku dniach, aktywacji ulega gen  $Lba$  i białko  $Lba$  dominuje w dojrzałych brodawkach [27]. Około 12 dni po zakażeniu następuje skoordynowany wzrost transkrypcji genów  $Lba$ ,  $Lbc_1$ ,  $Lbc_3$ , a także w mniejszym stopniu  $Lbc_2$ . Transkrypcja wszystkich genów pozostaje na niezmiennym poziomie przez niemal cały okres wegetacji rośliny, co także odróżnia je od genów globin zwierzęcych. Przedstawione dane wskazują, że regulacja ekspresji genów Lb następuje według innego mechanizmu niż ekspresja hemoglobiny u kręgowców.

Wykazano również, że transkrypcja genów leghemoglobinowych następuje przed pojawieniem się aktywności nitrogenazy w brodawkach [9, 56, 64, 65]. Okazało się także, że transkrypcja genów Lb i synteza Lb następuje niezależnie od tego czy nitrogenaza jest obecna w brodawkach czy też nie [3, 11, 12]. Można więc sądzić, że zmiany zachodzące w tworzących się bakteroidach, polegające na przestawieniu się metabolizmu bakterii na redukcję azotu atmosferycznego, pozostają bez wpływu na transkrypcję genów Lb.

### IV-2. Udział *Rhizobium* w indukcji genów Lb

#### IV-2.1. Geny *Rhizobium* biorące udział w indukcji genów Lb

Mechanizm aktywacji genów Lb jest nieznan, ale powszechnie przyjmuje się, że indukcja następuje na sygnał pochodzący z *Rhizobium*. Jak dotychczas nie ma doniesień, które by przeczyły tej hipotezie. *Agrobacterium tumefaciens*, bakterie blisko spokrewnione z *Rhizobium*, indukują powstawanie guzowatości szyjki korzeniowej u roślin dwuliściennych. W guzach tych nie stwierdzono obecności żadnych nodulin ani mRNA kodującego noduliny [66]. Również

warunki fizjologiczne symulujące procesy zachodzące w otoczeniu bakteroidu (niskie stężenie tlenu) nie indukują ekspresji genów nodulinowych w korzeniach grochu [67].

Z powyższych danych można wywnioskować, że mechanizm indukcji genów nodulinowych, w tym również genów Lb, nie jest związany jedynie z reakcją obronną rośliny przed organizmami patogennymi (np. *Agrobacterium tumefaciens*), czy warunkami stresowymi panującymi w brodawkach, takimi jak np. niski poziom tlenu. Nie ulega wątpliwości, że sygnał, który bezpośrednio lub pośrednio uczestniczy w indukcji genów nodulinowych pochodzi od *Rhizobium*.

W celu wyjaśnienia, które geny bakteryjne (lub ich produkty) są odpowiedzialne za aktywację genów nodulinowych i leghemoglobinowych zastosowano podejście eksperymentalne, które warte jest omówienia [68]. Punktem wyjścia była obserwacja że w szybko rosnących szczepach *Rhizobium*, geny biorące udział w procesie symbiozy mieszczą się na tzw. plazmidzie symbiotycznym („Sym” plazmid, megaplazmid) [69]. Fragment tego plazmidu, zawierający region DNA niezbędny dla zajścia procesu brodawkowania („nod region”) sklonowano i przeniesiono do szczepu *Rhizobium*, który wcześniej został pozbawiony tego plazmidu. Szczep biorcy odzyskuje wtedy zdolność brodawkowania, jednakże utworzone brodawki nie przaswajają azotu, ponieważ brakuje odpowiedniego regionu DNA odpowiedzialnego za wiązanie azotu (tzw. regionu „nif” i „fix”) [70]. Autorzy wspomnianej pracy zakazili rośliny grochu takim właśnie szczepem *Rhizobium* i wykazali, że w utworzonych brodawkach obecne są wszystkie noduliny, w tym również leghemoglobina. Konkluzja jest więc następująca: poza regionem „nod”, regiony „nif” i „fix”, a także inne geny obecne na megaplazmidzie nie biorą udziału w indukcji genów nodulinowych. Można więc z dużym prawdopodobieństwem powiedzieć, że sygnał aktywujący geny nodulinowe pochodzi z regionu „nod” plazmidu symbiotycznego *Rhizobium*, chociaż nie można wykluczyć, że również inne geny umiejscowione na chromosomie *Rhizobium* mogą brać udział w tym procesie.

#### IV-2.2. Czy grupa hemowa indukuje syntezę Lb

Do niedawna sądzono, że głównym czynnikiem stymulującym syntezę leghemoglobiny może być cząsteczka hemu, stanowiąca grupę prostetyczną leghemoglobin. Przypuszczenia te oparte były na obserwacji, że grupa hemowa niezbędna do utworzenia funkcjonalnej Lb jest syntetyzowana przez *Rhizobium* [9, 71], szczególnie intensywnie w warunkach podobnych do tych, jakie panują w rozwijających się brodawkach korzeniowych (niskie stężenie tlenu) [72]. Późniejsze doniesienia nie potwierdziły tej hipotezy. Otóż w brodawkach utworzonych po zakażeniu soi zmutowanym szczepem *Rhizobium japonicum*, w którym endogenny poziom hemu jest znacznie niższy niż w szczepie dzikim, stężenie leghemoglobiny w cytoplazmie, nie odbiega od normy [73].

Stwierdzono ponadto, że transkrypcja chimerycznego genu, składającego się z promotora leghemoglobinowego i znajdującego się pod jego kontrolą genu tzw.



„reporter gene” kodującego fosfotransferazę neomycyny (NPTII) nie jest, jak się spodziewano, indukowana przez podanie hemu [74]. Ekspresję tego genu badano w drożdżach, gdzie funkcjonuje kilka hemoprotein, których synteza jest kontrolowana na poziomie transkrypcji przez wewnątrzkomórkowy hem. Na marginesie należy dodać, że ci sami autorzy postulują, iż ekspresja wspomnianego genu chimerycznego jest regulowana przez hem na poziomie translacji. Brak jednak dowodów, że podobny mechanizm regulacji za pośrednictwem hemu działa w warunkach naturalnych, tzn. w brodawkach korzeniowych soi. Problem udziału hemu w indukcji genów Lb pozostaje więc nadal otwarty.

#### IV-3. Analiza regionów DNA kontrolujących ekspresję genów Lb

Pojawienie się nodulin wyłącznie w brodawkach korzeniowych, a nie w innych częściach roślin jest przykładem tkankowo-specyficznej ekspresji genów eukariotycznych. W literaturze opisane zostały przykłady tego typu ekspresji niektórych genów roślinnych [75]. Chociaż dokładny mechanizm regulacji nie został poznany, wykazano np., że ekspresja genów biorących udział w fotosyntezie indukowana jest przez światło, dzięki obecności światłoczułych sekwencji w obrębie ich regionu promotorowego [76]. Te krótkie odcinki DNA (sekwencje *cis*) zdolne są do oddziaływania z aktywatorem („*trans-acting factor*”), który może kontrolować proces transkrypcji określonego genu.

Dzięki osiągnięciom inżynierii genetycznej można obecnie zidentyfikować te fragmenty genu, które biorą udział w regulacji transkrypcji i decydują o jego organospecyficznej ekspresji. Możliwe jest bowiem wprowadzenie do chromosomu rośliny obcego genu i badanie jego aktywności *in vivo*. I tak w celu znalezienia regionów DNA odpowiedzialnych za tkankowo-specyficzną ekspresję genów Lbc<sub>3</sub> soi, skonstruowano chimeryczny gen o następującej strukturze: 5'-niekodująca sekwencja Lbc<sub>3</sub> (ok. 2000 p.z.)--sekwencja kodująca CAT-3'-niekodujący region Lbc<sub>3</sub> (ok. 1000 p.z.) [77]. Gen ten został wprowadzony do genomu innej rośliny motylkowatej *Lotus corniculatus* za pomocą plazmidu Ri jako wektora. Dzięki obecności sekwencji kodującej CAT można było łatwo monitorować jego aktywność. Autorzy wykazali, że ekspresja nowego genu zachodzi wyłącznie w brodawkach transformowanej rośliny (a nie w innych jej tkankach) i jest regulowana na poziomie RNA. Co więcej, sekwencja promotorowa Lbc<sub>3</sub> kontroluje również prawidłową ekspresję chimerycznego genu w trakcie rozwoju brodawki. Ekspresja następuje bowiem przed pojawieniem się aktywności nitrogenazy, podobnie jak to ma miejsce w przypadku Lbc<sub>3</sub> w macierzystej soi.

Dokładna analiza różnych fragmentów regionu promotorowego („deletion analysis”) wykazała, że za tkankowo-specyficzną ekspresję genu Lbc<sub>3</sub> w transformowanych roślinach odpowiedzialny jest fragment DNA o długości 37 p.z., który znajduje się w odległości 102 p.z. w kierunku 5' od kodonu inicjatorowego [78]. Region ten obecny jest również w innych genach Lb i nodulinowych, których sekwencja została poznana. Być może ten właśnie fragment promotora

stanowi miejsce receptorowe dla cząsteczki aktywatora pozytywnie kontrolującego skoordynowaną ekspresję tej grupy genów w brodawkach. Jak wiadomo, transkrypcja genów kodujących Lb i niektóre noduliny w soi [79], a także w łubinie [65] zachodzi niemal jednocześnie. Jest więc prawdopodobne, że ich ekspresja może być kontrolowana przez jedną cząsteczkę aktywatora. Z najnowszych badań wynika również, że takie czynniki aktywujące są obecne w brodawkach soi. Wykazano bowiem, że inkubacja jąder izolowanych z zarodków soi z ekstraktem z brodawek prowadzi do indukcji genów Lb i dwu innych nodulin [80]. Aktywacja następuje pod wpływem czynnika zawartego w brodawkach, ponieważ ekstrakty z innych części roślin nie dały takiego efektu. Co więcej, badanie kompleksów typu DNA-białko, pozwoliło na precyzyjne określenie, z którym regionem genu  $Lbc_3$  oddziałują domniemane czynniki aktywujące z brodawek [81]. Są to dwa elementy promotora o długości 24 i 16 p.z. znajdujące się w odległości 223 i 169 nukleotydów w kierunku 5' od kodonu ATG (Ryc. 1.). Jak się jednak okazuje, żaden z tych fagmentów nie jest identyczny z regionem DNA odpowiedzialnym za tkankowo-specyficzną ekspresję genu  $Lbc_3$ , znalezionym na podstawie badań promotora („deletion analysis”).

Reasumując można jednak powiedzieć, że uzyskane rezultaty potwierdzają istnienie w brodawkach korzeniowych czynników białkowych zdolnych do specyficznego oddziaływania z regionem promotorowym genów leghemoglobiновых. Zostały również zidentyfikowane te fragmenty promotora Lb, które mają znaczenie dla jego ekspresji w brodawkach. Można oczekiwać, że oczyszczenie czynników aktywujących transkrypcję, poznanie ich budowy i mechanizmu oddziaływania z elementami *cis* DNA będzie następnym krokiem zmierzającym do wyjaśnienia, jak następuje tkankowo-specyficzna ekspresja tych genów.

## V. Ewolucja genów leghemoglobiновых

Białka globinowe są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Znana jest tetrametryczna hemoglobina u wyższych kręgowców, monomeryczna jej forma u niektórych strunowców i różnych bezkręgowców, monomeryczna mioglobina i leghemoglobina. Ostatnio znaleziono także hemoglobinę u roślin niemotylkowatych [14, 15], bakterii [42] i owadów [82]. Komputerowa analiza sekwencji aminokwasów poznanych globin zwierzęcych i roślinnych wykazała ich podobieństwo strukturalne [43]. Na tej podstawie wysunięto sugestię, że wszystkie globiny pochodzą od wspólnej pierwotnej praglobiny.

Porównanie sekwencji DNA roślinnych i zwierzęcych genów globiновых pozwoliło na sformułowanie dalszych uogólnień. Po pierwsze — różnicowanie się tych dwu grup genów rozpoczęło się w przybliżeniu 1400 milionów lat temu (przy założeniu, że szybkość procesów ewolucyjnych zachodzących w obu grupach organizmów była taka sama). Po drugie — geny roślinne podlegały



ewolucji w podobny sposób jak geny zwierzęce. Częstość zmian nukleotydów (addycje, delecje i substytucje) w regionie kodującym jest zbliżona, a struktura intronów jest podobna [83]. Obecność krótkich sekwencji potwarzających się („direct repeat”) w obrębie intronów nasuwa przypuszczenie o udziale elementów mobilnych w tworzeniu tej struktury. Po trzecie — obecność dwu bardzo podobnych regionów zawierających geny Lb (region I i II, Ryc. 2) wskazuje, że w rozwoju ewolucyjnym soi zaszła duplikacja dużych regionów chromosomu. Ponieważ soja jest rośliną tetraploidalną [84], obie grupy genów mogły powstać przez duplikację genomu w prymitywnym gatunku soi, ale mogła też nastąpić duplikacja tylko części chromosomu zawierającej geny Lb.

Do niedawna sądzono, że leghemoglobina występuje jedynie w roślinach motylkowatych, które pojawiły się ok. 200 milionów lat temu [9]. Powstało w związku z tym kilka interesujących teorii, próbujących wyjaśnić w jaki sposób rośliny motylkowate nabyły gen globinowy. Warto przytoczyć niektóre z nich chociaż w świetle dzisiejszych danych wydają się mało prawdopodobne.

Jeffreys [85] zasugerował, że gen Lb został przeniesiony ze świata zwierząt za pośrednictwem wirusa jako wektora. Źródłem genu — dawcą, miały być wg. autora np. owady. Jednakże niedawno okazało się, że struktura genu globinowego z *Chironomus* (ochotek) jest zupełnie niepodobna do struktury genów Lb: brak jej intronów [82]. Czyni to mało prawdopodobną teorię „transferu horyzontalnego”.

Appleby [9] wysunął interesującą sugestię, że gen globinopodobny (np. kodujący białko oddechowe) został przeniesiony z *Rhizobium* do genomu prymitywnej rośliny motylkowej, po czym zmiany ewolucyjne doprowadziły do powstania współczesnej Lb. Teoretycznie możliwe byłoby przeniesienie fragmentu DNA z bakterii do genomu roślinnego w podobny sposób jak to czyni *Agrobacterium tumefaciens*. Do niedawna sądzono, że globiny są białkami eukariotycznymi, ale ostatnio opisano takie białko w bakteriach [42], co mogłoby przemawiać za opisaną możliwością. Jednakże obecność sekwencji intronowych w genach Lb świadczy przeciwko tej hipotezie, gdyż w organizmach prokariotycznych powszechne jest występowanie genów bez intronów.

Można też przyjmować, że pojawienie się leghemoglobiny w roślinach motylkowatych jest wynikiem ewolucji zbieżnej (“convergent”). Według tej teorii gen Lb miałby powstać przez rekombinację istniejących w roślinach dwóch eksonów kodujących domeny białkowe wiążące hem i dwóch innych elementów roślinnego DNA. Podobną hipotezę proponuje Blake dla wyjaśnienia dużej heterogenności białek wiążących hem [86]. Co więcej, dane o występowaniu genów globinowych w roślinach niemotylkowatych (Rozdz. II), pozwalają uważać za prawdopodobne, że leghemoglobina, taka jaką odnajdujemy w roślinach motylkowych jest produktem ekspresji genu obecnego w świecie roślin od momentu kiedy wszystkie organizmy eukariotyczne miały wspólnego przodka. W toku ewolucji gen ten został być może usunięty z genomu niektórych roślin lub nie podlega w nich ekspresji.



Nie ulega wątpliwości, że dalsze badania struktury i mechanizmu ekspresji genów globinowych w roślinach powinny ułatwić zrozumienie procesów ewolucyjnych, które doprowadziły do symbiotycznego wiązania azotu.

Artykuł otrzymano 16 września 1987 r.

Zaakceptowano do druku 6 września 1988 r.

## PIŚMIENICTWO

1. Stróżycki P., Konieczny A., Legocki A.B., (1985), *Acta Biochim. Polon.*, **32**, 27—34.
2. Legocki R.P., Verma D.P.S., (1980), *Cell*, **20**, 153—163.
3. Bisseling T., Been C., Klugkist J., van Kammen A., Nadler K., (1983), *The EMBO J.*, **2**, 961—966.
4. Lang-Unnash N., Ausubel F.M., (1985), *Plant Physiol.*, **77**, 833—839.
5. Govers F., Gloudemans T., Moerman M., van Kammen A., Bisseling T., (1985), *The EMBO J.*, **4**, 861—867.
6. Kubo H., (1939), *Acta Phytochim.*, **11**, 195—198.
7. Dilworth M.J., (1980), *Methods Enzymol.*, **69C**, 812—823.
8. Boguta M., Putrament A., (1984) *Post Bioch.*, **30**, 27—52.
9. Appleby C.A., (1974), w *The Biology of Nitrogen Fixation*, red. Quispel A., str. 521—554, Elsevier/North Holland, New York.
10. Appleby C.A., (1984), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 443—478.
11. Maier R.J., Brill W.J., (1976), *J. Bacteriol.*, **127**, 763—769.
12. Fuller F., Verma D.P.S., (1984), *Plant Mol. Biol.*, **3**, 21—28.
13. Legocki R.P., Szalay A.A., (1984), w *Genes Involved in Microbe Plant Interactions*, red. Verma D.P.S. i Hohn T. str. 255—268, Springer-Verlag, Wien New York.
14. Appleby C.A., Tjepkema J.D., Trinick J.D., (1983), *Science*, **220**, 951—953.
15. Tjepkema J.D., (1983), *Cad. J. Bot.*, **63**, 2924—2929.
16. Moiroud A., Gianinazzi-Pearson V., w *Genes Involved in Microbe-Plant Interactions*, red. Verma D.P.S. i Hohn Th., str. 295—223, Springer-Verlag, Wien New York.
17. Roberts M.P., Jafar S., Mullin B.C., (1985), *Plant Mol. Biol.*, **5**, 333—337.
18. Lehtovaara P., Perttila U., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 359—364.
19. Uheda E.P., Syono K., (1982), *Plant Cell Physiol.*, **23**, 75—84.
20. Jing Y., Paau A.S., Brill W.J., (1982) *Plant Sci. Lett.*, **25**, 119—132.
21. Thulborn K.L., Minasian E., Leach S.J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 476—483.
22. Szybiak-Stróżycka U., Stróżycki P., Sikorski M., Golinska B., Mądrzak C.J., Legocki A.B., (1987), *Acta Biochim. Polon.*, **34**, 79—85.
23. Whittaker R.G., Lennox S., Appleby C.A., (1981), *Biochem. Int.*, **3**, 117—124.
24. Egorov U.A., Feigina M.Yu., Kazakov V.K., Shakparonov M.I., Mitaleva S.I., Ovchinnikov Yu.A., (1976), *Bioorg. Khim.*, **2**, 125—128.
25. Egorov U.A., Kazakov V.K., Shakparonov M.I., Feigina M.Yu., Kosteuksi O.W., (1978), *Bioorg. Khim.*, **4**, 476—481.
26. Kuranova I.P., Grebenko A.I., Konarewa N.F., Syromyatnikova I.F., Barynin V.V., (1976), *Biokhimiya*, **41**, 1603—1606.
27. Verma D.P.S., Ball S., Guerin C., Wanamaker L., (1979), *Biochem.*, **18**, 476—483.
28. Fuchsman W.H., Appleby C.A., (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **579**, 314—324.
29. Ellfolk N., Sievers G., (1971), *Acta Chem. Scand.*, **25**, 3532—3535.
30. Hurrel J.G.R., Leach S.J., (1977), *FEBS Lett.*, **80**, 2326.
31. Lehtovaara P., Ellfolk N., (1975). *Eur. J. Biochem.*, **54**, 577—584.

32. Lehtovaara P., Lappalainen A., Ellfolk N., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **623**, 98—196.
33. Richardson M., Dilworth M.J., Saven M.D., (1975) *FEBS Lett.*, **57**, 33—37.
34. Appleby C.A., informacja prywatna.
35. Hyldig-Nielsen J.J., Jensen E.O., Paludan K., Wiborg O., Garret R., Jorgensen P., Marcker K.A., (1982), *Nucl. Acids Res.*, **10**, 689—702.
36. Wiborg O., Hyldig-Nielsen J.J., Jensen E.O., Paludan K., Marcker K.A., (1982), *Nucl. Acids Res.*, **10**, 3487—3494.
37. Lee Y.S., Verma D.P.S., (1984), *EMBO J.*, **3**, 2745—2752.
38. de Bruijn F.J., informacja prywatna.
39. Landsmann J., Dennis E.S., Higgins T.J.U., Appleby C.A., Kort A.A., Peacock W.J., (1986), *Nature*, **324**, 166—168.
40. Konieczny A., Jensen E.O., Marcker K.A., Legocki A.B., (1987), *Molec. Biol. Rep.*, **12**, 61—66.
41. Konieczny A., (1987), *Nucl. Acids Res.*, **15**, 6742.
42. Wakabayashi S., Matsubara H., Webster D.A., (1986), *Nature*, **324**, 481—483.
43. Hunt L.T., Hurst-Calderone S., Dayhoff M.O., (1978), w Atlas of Protein Sequence and Structure, red Dayhoff M.O., t. 5. str. 229—249, National Biomed. Res. Found., Washington.
44. Vainshtein B.K., Harutyunyan E.H., Kuranova I.P., Borisov V.V., Sosfenov N.I., Parlovsky A.G., Grebenko A.T., Konareva N.V., (1975), *Nature*, **254**, 163—164.
45. Verma D.P.S., Kazanian V., Zogbi V., Bal A.K., (1978), *J. Cell. Biol.*, **78**, 919—936.
46. Melik-Sarkisyan S.S., Tikhomirova A.I., Kretovich W.L., (1981), *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **259**, 1498—1501.
47. Bergersen F.J., Appleby C.A., (1981), *Planta*, **152**, 534—543.
48. Livanova G.I., Zhiznevskaya G.Ya., Andreeva I.N., (1979), *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **245**, 739—742.
49. Robertson J.G., Wells B., Bisseling T., Farnden K.J.F., Johnston A.W.B., (1984), *Nature*, **311**, 254—256.
50. Konieczny A., Legocki A.B., (1978), *Acta Biochim. Polon.*, **25**, 379—390.
51. Puppo A., Dimitrijevic L., Rigaud J., (1982) *Planta*, **156**, 374—379.
52. Verma D.P.S., Nash D.T., Schulman H.M., (1974), *Nature*, **251**, 74—77.
53. Baulcombe D., Verma D.P.S., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 4141—4153.
54. Sidloi-Lumbroso R., Kleiman L., Schulman H.M., (1978), *Nature*, **273**, 558—560.
55. Wiborg O., Hyldig-Nielsen J.J., Jensen E.O., Paludan K., Marcker K.A., (1983), *The EMBO J.*, **2**, 449—452.
56. Marcker A., Lund M., Jensen E.O., Marcker K.A., (1984), *The EMBO J.*, **3**, 1691—1695.
57. Brisson N., Verma D.P.S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 4055—4059.
58. Sullivan D., Brisson N., Goodchild B., Verma D.P.S., Thomas D.Y., (1981), *Nature*, **289**, 516—518.
59. Jensen E.O., Paludan K., Hyldig-Nielsen J.J., Jorgensen P., Marcker K.A., (1981), *Nature*, **291**, 677—679.
60. Go M., (1981), *Nature*, **291**, 90—92.
61. Breatnach R., Benoist C., O'Hare K., Cannon F., Chambon P., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 4853—4860.
62. Bojsen K., Abildsten D., Jensen E.O., Paludan K., Marcker K.A., (1983), *The EMBO J.*, **2**, 1165—1168.
63. Lee J.S., Brown G.G., Verma D.P.S., (1983), *Nucl. Acids Res.*, **11**, 5541—5553.
64. Bisseling T., Moen A.A., van den Bos R.C., van Kammen A., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, **118**, 377—381.

65. Konieczny A., Szczyglowski K., Boron L., Przybylska M., Legocki A.B., (1988), *Plant Sci.*, **55**, 145—149.
66. Bisseling T., Franssen H., Govers F., Gloudemans T., Louwerse J., Moerman M., Nao J.P., van Kammen A., (1985), w *Nitrogen Fixation Research Progress*, red. Evans H.J., Bottomley P.J., Newton W.E., str. 53—59 Nijhoff Publishers, Dordrecht.
67. Govers F., Moerman M., Hooymans J., van Kammen A., Bisseling T., (1986), *Planta*, **169**, 513—517.
68. Govers F., Moerman M., Downie J.A., Hooykaas P., Franssen H.J., Louwerse J., van Kammen A., Bisseling T., (1986), *Nature*, **323**, 564—566.
69. Rolfe B.G., Shine J., (1984), w *Genes Involved in Microbe-Plant Interactions*, red. Verma D.P.S. i Hohn Th., str. 95—128, Springer-Verlag, Wien New York.
70. Downie J.A., Hombrecher G., Qing-Sheng M., Knight C.D., Wells B., Johnston A.B.W., (1983), *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 359—365.
71. Nadler K.D., Avissar Y.J., (1974), *Plant Physiol.* **60**, 433—436.
72. Keithley J.H., Nadler K.D., (1983), *J. Bacteriol.*, **154**, 838—845.
73. Noel K.D., Stacey G., Tandon S.R., Silver L.E., Brill W.J., (1982), *J. Bacteriol.*, **152**, 485—494.
74. Jensen E.O., Marcker K.A., Villadsen I.S., (1986), *The EMBO J.*, **5**, 843—847.
75. Kuhlemeier C., Green P.J., Chua N-H., (1987), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **38**, 221—257.
76. Fluhr R., Kuhlemeier C., Nagy F., Chua N-H., (1986), *Science*, **232**, 1106—1112.
77. Stougaard J., Marcker K.A., Otten L., Shell J., (1986), *Nature*, **321**, 669—674.
78. Stougaard J., Sandal N.N., Gron A., Kuhle A., Marcker K.A., (1987), *The EMBO J.*, **6**, 3565—3569.
79. Mauro V.P., Nguyen T., Katinakis P., Verma D.P.S., (1985) *Nucl. Acids Res.*, **13**, 239—249.
80. Mauro V.P., Verma D.P.S., (1988), *Mol. Plant-Microbe interactions*, **1**, 46—51
81. Jensen E.O., Marcker K.A., Shell J., de Bruijn F.J., (1988), *The EMBO J.*, **7**, 1265—1271.
82. Antoine M., Niessing J., (1984), *Nature*, **310**, 795—798.
83. Brown G.G., Lee J.S., Brisson N., Verma D.P.S., (1984), *J. Mol. Evol.*, **5**, 120—126.
84. Datta P.L., Saha N., (1973), *Genet. Iber.*, **25**, 37—62.
85. Jeffreys A.J., Wilson V., Wood D., Simons J.P., Kay R.M., Williams J.G., (1980), *Cell*, **21**, 555—564.
86. Blake C.C.F., (1981), *Nature*, **324**, 166—169.



[Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is too light to transcribe accurately.]

[Large block of faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is too light to transcribe accurately.]

TADEUSZ SZUMIŁO\*

## Struktura i biosynteza glikoprotein roślinnych połączonych N-glikozydowo

### Structure and biosynthesis of plant N-linked glycoproteins

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Struktura glikoprotein
- III. Udział poliprenoli w biosyntezie prekursorowego oligosacharydu glikoprotein
  - III-1. Poliprenylofosfomonosacharydy
  - III-2. Poliprenyldifosfooligosacharydy
- IV. Przeniesienie oligosacharydy z nośnika lipidowego na białko
- V. Przetwarzanie (processing) oligosacharydu glikoprotein

#### Contens

- I. Introduction
- II. Structure of glycoproteins
- III. Participation of polyprenols in biosynthesis of oligosaccharide precursor of glycoproteins
  - III-1. Polyprenylphosphomonosaccharides
  - III-2. Polyprenyldiphosphooligosaccharides
- IV. Transfer of oligosaccharide from lipid donor to protein
- V. Processing of N-linked glycoproteins

Wykaz stosowanych skrótów: Asn — asparagina, Dol-P — fosforan dolicholu, Dol-PP — difosforan dolicholu, Fuc — fukoza, Gal — galaktoza, Glc — glukoza, GlcNAc — N-acetyloglukozamina, Man — mannoza, SA — kwas N-acetylneuraminowy, Xyl — ksyloza, UDP-GlcNAc — urydylodifosfo-N-acetyloglukozamina

## I. Wstęp

Glikoproteiny, to liczne, zróżnicowane strukturalnie i funkcjonalnie białka. Są wśród nich m.in. enzymy, hormony, immunoglobuliny, białka osocza krwi, wydzieliny śluzowych, błon biologicznych i wiele innych [1—4]. Na ich konformację i funkcję biologiczną w różnym stopniu wpływają oligosacharydowe grupy prostetyczne. Sądzi się, że te ostatnie w jakiejś mierze decydują o takich ważnych zjawiskach biologicznych, jak: rozpoznanie międzykomórkowe i adhezja ko-

\* Doc. dr hab., Zakład Biochemii i Metabolizmu Leków, Akademia Medyczna, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin

mórek, różnicowanie komórkowe, rozpoznawanie zewnątrzkomórkowych sygnałów i ich transmisja do komórek, wewnątrzkomórkowy transport i segregacja białek, czy też usuwanie glikoprotein z krwi [5].

Jednostki cukrowe glikoprotein wykazują znaczne zróżnicowanie, jeśli chodzi o ich wielkość i strukturę, poczynając od mono- i disacharydów, do rozgałęzionych oligosacharydów zawierających na ogół nie więcej niż 20 reszt monosacharydowych. Zawartość tych jednostek w poszczególnych glikoproteinach może być jakościowo i ilościowo różna. Podobna heterogenność może występować w obrębie ich struktury oligomerycznej.

Intensywne badania, prowadzone przy użyciu zarówno klasycznych, jak i nowych metod odszczepiania i analizy składnika cukrowego, pozwoliły poznać, zwłaszcza w ostatnim dziesięcioleciu, kilkaset struktur oligosacharydowych występujących w glikoproteinach [6]. W ogólnym zarysie poznano również ich biosyntezę [1, 2]. Szczególnie interesująca i złożona okazała się biosynteza oligosacharydów wchodzących w skład glikoprotein połączonych N-glikozydowo. Na ogół obejmuje ona trzy etapy: formowanie się prekursorowego oligosacharydu na nośniku lipidowym, jego przeniesienie na białko i przetwarzanie (processing). W tych badaniach cenne usługi oddały nowoodkryte naturalne i syntetyczne inhibitory biosyntezy glikoprotein [7, 8].

Strukturę i biosyntezę glikoprotein poznano, badając głównie materiał pochodzenia zwierzęcego i drożdże. Pod tym względem rośliny były badane niesystematycznie i w sposób raczej powierzchowny, co znalazło wyraz we wcześniejszych artykułach przeglądowych [9, 10]. Niniejszy artykuł przedstawia, w świetle dotychczasowych badań, zagadnienia struktury i biosyntezy glikoprotein roślinnych połączonych N-glikozydowo.

## II. Struktura glikoprotein

Istotnym elementem struktury glikoprotein jest rodzaj wiązania kowalencyjnego łączącego część cukrową z łańcuchem polipeptydowym. Glikoproteiny szczególnie szeroko rozpowszechnione w organizmach eukariotycznych zawierają wiązanie N-glikozydowe między resztą N-acetyloglukozoaminy (GlcNAc) i asparaginy. W innych glikoproteinach takich, jak np. mucyna i substancje grupowe krwi, występują wiązania O-glikozydowe, które tworzą reszty N-acetylogalaktozoaminy i seryny lub treoniny. Te, i inne, mniej rozpowszechnione O-glikoproteiny nie będą omawiane w niniejszym artykule. Warto dodać, że w cząsteczce pojedynczej glikoproteiny mogą występować równocześnie O- i N-glikozydowo połączone oligosacharydy.

Analiza poznanych dotąd kilkuset łańcuchów oligosacharydowych N-glikoprotein komórek zwierzęcych pozwoliła zakwalifikować je, pomimo jej znacznej heterogenności, do trzech podstawowych typów strukturalnych. Mianowicie do oligosacharydów: polimannozowych (high-mannose type), złożonych (complex type) i mieszanych (hybride type). Wspólnym elementem struktury wszystkich



trzech typów jest pentasacharyd  $\text{Man}\alpha 1-3/\text{Man}\alpha 1-6/-\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{-GlcNAc-Asn}$  — określane jako rdzeń (core) [11].

Oligosacharydy polimannozowe zawierają w swojej cząsteczce, oprócz rdzenia, od dwóch do 6-ciu dalszych  $\alpha$ -glikozydowo połączonych reszt mannozowych, wobec czego oligosacharydy te można przedstawić wzorem sumarycznym:  $\text{Man}_{5-9}/\text{GlcNAc}/_2$  [12]. W oligosacharydach złożonych występują dodatkowo, obok Man i GlcNAc, reszty galaktozy (Gal), fukozy (Fuc) i kwasu N-acetylu-neuraminowego (SA). Ich struktura jest mniej lub bardziej rozgałęziona, a ilość odgałęzień (anten) może wahać się od 2 do 6-ciu. Liczne przykłady tych złożonych struktur znajdzie Czytelnik w pracach przeglądowych [2, 6]. Oligosacharydy mieszane charakteryzują się obecnością elementów obydwu poprzednich struktur.

Badania strukturalne N-glikoprotein roślinnych datują się od roku 1964,

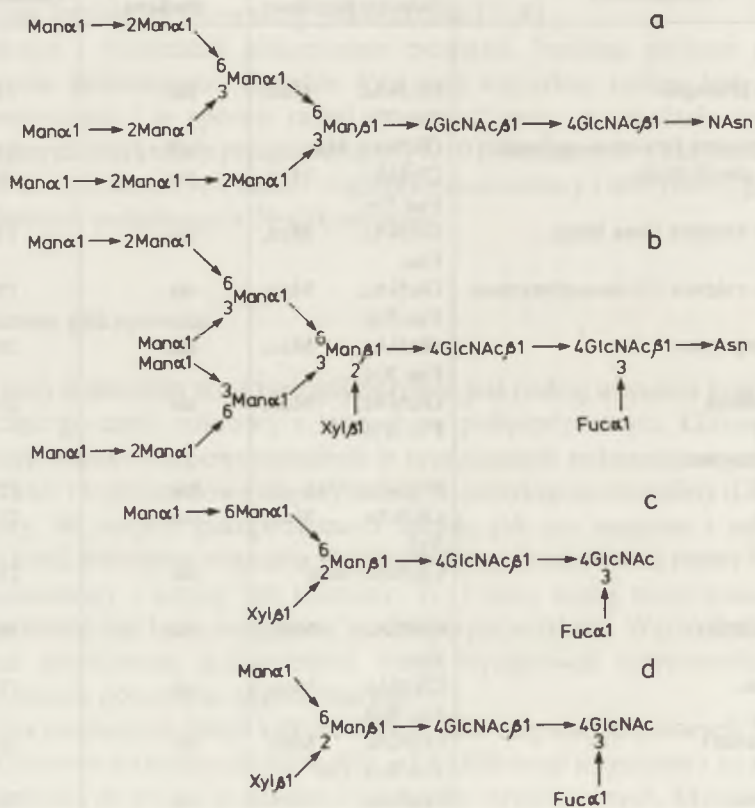
Tabela 1

Glikoproteiny roślinne połączone N-glikozydowo

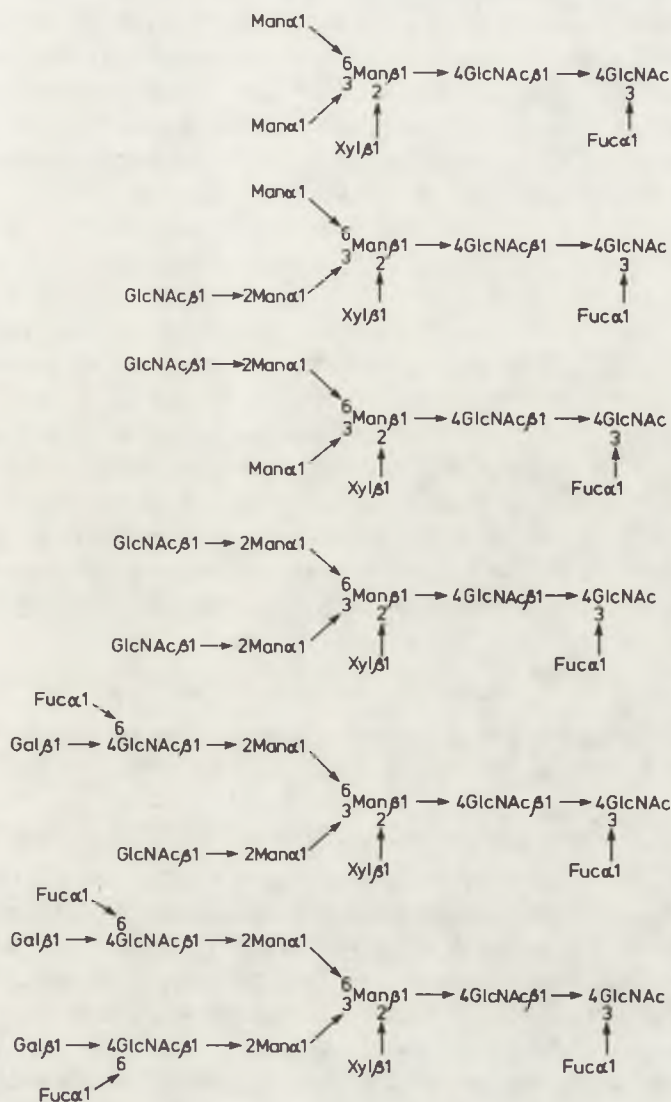
Glikoproteiny	Skład monosacharydowy	Struktura zbadana	Piśmiennictwo
Lektyny			
<i>Erythrina cristagalli</i>	GlcNAc, Man, Fuc Xyl	nie	14
<i>Glycine maxima</i> (soy bean agglutinin)	GlcNAc, Man	tak	15
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GlcNAc, Man, Fuc Xyl	nie	16
<i>Phaseolus limensis</i> (lima bean)	GlcNAc, Man, Fuc.	tak	17
<i>Phaseolus vulgaris</i> (fitohemaglutynina)	GlcNAc, Man, Fuc Xyl	tak	19
<i>Sophora japonica</i>	GlcNAc, Man, Fuc Xyl	tak	20
<i>Vicia graminea</i>	GlcNAc, Man, Fuc Xyl	nie	21
Białka zapasowe			
Białko 7S	GlcNAc, Man	nie	22
Fazeolina	GlcNAc, Man, Xyl	tak	23
Wicilina	GlcNAc, Man	nie	25, 31
Enzymy			
$\alpha$ -amylaza (ryż)	GlcNAc, Man, Fuc	nie	26
Bromelaina	GlcNAc, Man, Fuc Xyl	tak	27, 32
Lakaza (jawor)	GlcNAc, Man, Fuc Xyl, Gal	tak	28
Peroksydaza	GlcNAc, Man, Fuc Xyl, Ara	nie	29
Taka-amylaza	GlcNAc, Man	tak	30

kiedy to w pracowni S h a r o n a [13] poraz pierwszy zidentyfikowano połączenie asparaginylo-oligosacharydowe w hemaglutynie z soi. Dalszy postęp w tej dziedzinie osiągnięto jednak dopiero w roku 1975, opisując pierwszą strukturę oligosacharydową N-glikoproteiny roślinnej, bromelainy z drzewa ananasowego. Na przełomie lat 70/80 poznano kompletną strukturę szeregu dalszych oligosacharydów, a w niektórych przypadkach zdołano przynajmniej ustalić ich skład jakościowy. Scharakteryzowane oligosacharydy występują w lektynach, białkach zapasowych i enzymach roślinnych (Tabela I). We wszystkich oligosacharydach znaleziono GlcNAc i Man, u większości również Fuc i ksylozę (Xyl), w jednym przypadku (lakaza) — Gal i w jednym (peroksydaza) — arabinozę (Ara).

Ryc. 1 przedstawia wybrane struktury oligosacharydowe niektórych glikoprotein roślinnych. Lektyna z soi (soy bean agglutinin) zawiera typowy oligosacharyd polimannozowy o składzie  $\text{Man}_9/\text{GlcNAc}/_2$  (Ryc. 1a). Podobny oligosacharyd znaleziono w lektynie z *Phaseolus vulgaris* (tóra bean). Zwraca tu jednak uwagę obecność związanych z rdzeniem reszt Fuc i Xyl (Ryc. 1b). Dwa oligosacharydy wyizolowane z bromelainy są całkowicie pozbawione odgałęzień



Ryc. 1. Struktury oligosacharydowe N-glikoprotein roślinnych a. Lektyna soi; b. Lektyna fasoli (tóra bean); c i d. bromelaina ananasa.



Ryc. 2. Oligosacharydy laktazy *Acer pseudoplatanus*.

nia  $\alpha$ 1,3 przy  $\beta$ -mannozie. Z tą ostatnią jest natomiast połączona  $\beta$ 1,2-glikozydowo — Xyl (Ryc. 1cd).

W 1986 roku Takahashi i wsp. [28] po raz pierwszy wykazali w glikoproteinach roślinnych struktury oligosacharydowe złożone dwuantenowe. Znaleźli je w lakazie z drzewa jaworowego *Acer pseudoplatanus* (Ryc. 2). Występuje w nich ksyloza, która powiązana jest  $\beta$ 1,2-glikozydowo z  $\beta$ -mannozą, podobnie jak to ma miejsce w bromelainie i lektynie fasoli (toro bean). Warto tu podkreślić, że obecność ksylozy jest charakterystyczną cechą glikoprotein



roślinnych. Monosacharyd ten w glikoproteinach zwierzęcych znaleziono tylko w jednym przypadku —  $\alpha$ -hemocyjaniny hemolimfy ślimaka (*Helix pomatia*) [33]. Inną, godną uwagi cechą oligosacharydów lakazy (a także wymienionych wyżej dwóch dalszych glikoprotein roślinnych) jest powiązanie Fuc z terminalną GlcNAc wiązaniem  $\alpha$ 1,3-glikozydowym, a nie, jak to jest w oligosacharydach glikoprotein zwierzęcych, wiązaniem  $\alpha$ 1,6-glikozydowym.

Reasumując, dotychczasowe wyniki badań strukturalnych wykazały, że w materiale roślinnym występują glikoproteiny zawierające oligosacharydy o różnej budowie, podobnie jak to ma miejsce w przypadku glikoprotein zwierzęcych. Różnice pomiędzy oligosacharydami z tych dwóch źródeł dotyczą jedynie kilku cech. Tak więc oligosacharydy roślinne są znacznie mniej rozgałęzione i nie występują w nich typowe dla zwierzęcych — reszty sialowe. Z kolei ksyloza jest w oligosacharydach roślinnych szeroko rozpowszechniona, podczas gdy w zwierzęcych znaleziono ją, jak dotychczas, tylko w jednym przypadku. Wreszcie w tych pierwszych fukoza jest powiązana z terminalną GlcNAc wiązaniem  $\alpha$ 1,3-glikozydowym, zaś w tych drugich — wiązaniem  $\alpha$ 1,6-glikozydowym. Natomiast występowanie w obu grupach oligosacharydów identycznego pentasacharydowego rdzenia sugeruje, że ich biosynteza, przynajmniej na pewnym etapie, przebiega podobnie.

### III. Udział poliprenoli w biosyntezie prekursorowego oligosacharydu glikoprotein

#### III-1. Poliprenylofosfomonosacharydy

W latach 1969—71 pojawiło się szereg prac, w których autorzy obserwowali w różnych organizmach eukariotycznych przeniesienie radioaktywnych monosacharydów — mannozy, glukozy i N-acetyloglukozoaminy — z ich połączeń nukleotydowych do frakcji lipidowej. Wkrótce udało się udowodnić, że powstałe w ten sposób glikolipidy to odpowiednio: poliprenylofosfomannoza — i glukoza, oraz poliprenylofosfo-N-acetyloglukozoamina. Badania te dotyczą głównie materiału zwierzęcego i omówiono je w artykule przeglądowym opublikowanym w *Postęпах Biochemii* [34]. Biosynteza prenylofosfomannozy u roślin (preparaty z kielków fasoli i włókien bawełny) omówiona również we wspomnianym artykule, była przedmiotem badań głównie w pracowniach Elbeina i Villameza. Prace te nie doprowadziły jednak do wyizolowania poszczególnych mannlipidów i ustalenia ich struktury. Biorąc ponadto pod uwagę fakt, że przeniesienie mannozy z GDP-mannozy do frakcji lipidowej stymulował zarówno fikaprenylofosforan, jak dolichylofosforan, trudno jest w tej chwili powiedzieć, które typy poliprenoli (nasycone czy nienasycone) są naturalnymi akceptorami reszt mannozowych i niezbędne są dalsze badania w tym kierunku. Nic nie wiadomo również o mannozylotransferazie katalizującej syntezę mannlipidów roślinnych.

Powstawanie glikolipidu przy udziale UDP-glukozy i endogennego akcep-

tora lipidowego poraz pierwszy obserwowano w mikrosomach włókien bawełny [9]. Wyizolowany z soi akceptor lipidowy glukozy przypominał swoimi własnościami nasycony prenylmonofosforan [10]. Z kolei w wyniku inkubacji mikrosomalnych preparatów grochu z izopentylenodifosforanem otrzymano dolichylofosforan (Dol-P). Ten, był akceptorem reszt glukozy z UDP-glukozy, dając Dol-P-glukozę. Co do tego ostatniego produktu istnieje jednak kontrowersja, gdyż był on również identyfikowany jako dolichylofosfoglucoza (Dol-PP-glukoza) [ref. 9].

Przeniesienie GlcNAc-1-P z UDP-GlcNAc na endogenne akceptory lipidowe katalizowały preparaty mikrosomalne z różnych gatunków roślin [ref. 9, 10]. W reakcji tej uczestniczy odpowiednia GlcNAc-1-P transferaza, którą zsolubilizowano Tritonem X-100 z rosnących w zawiesinie komórek soi [36]. Enzym wykazywał optimum pH 7.6, był hamowany przez EDTA i aktywowany jonami  $Mg^{2+}$ . Jego działanie było stymulowane przez fosfatydyloglicerol i fosfatydyloinozytol. Podobnie jak odpowiedni enzym u zwierząt, był on silnie hamowany przez tunikamycynę — nukleozydowy antybiotyk pochodzenia grzybowego [7].

### III-2. Poliprenylofosfoligosacharydy

Biosynteza poliprenylofosfoligosacharydów oraz ich udział w glikolizacji białek u drożdży i zwierząt została omówiona w artykule opublikowanym w *Postępkach Biochemii* [4]. Tutaj zostanie przedstawiona biosynteza tych związków w materiale roślinnym.

Procesy biosyntezy oligosacharydów na nośnikach poliprenoidowych oraz przeniesienie tych oligosacharydów na różne białka akceptorowe są już dobrze udokumentowane. W biosyntezie bierze udział szereg enzymów, glikozylotransferaz, związanych z retikulum endoplazmatycznym, które kolejno dokonują przeniesienia 2 reszt GlcNAc, 9 reszt Man i 3 reszt Glc z ich połączeń nukleotydu lub lipidowych na Dol-P, tworząc  $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ -PP-Dol. Część oligosacharydowa jest następnie przenoszona w całości na akceptor białkowy. U zwierząt poszczególne reakcje szlaku dolicholowego i jego metabolity zostały w dużym stopniu poznane [1, 2]. U roślin przemiana ta występuje również, lecz wiele jej członów nie zostało dostatecznie scharakteryzowanych. Tym niemniej końcowy oligosacharyd został wyizolowany z materiału roślinnego i jego struktura została poznana.

Reakcją inicjującą szlaku dolicholowego jest wymienione już w poprzednim rozdziale przeniesienie GlcNAc-1P z UDP-GlcNAc na Dol-P i wytworzenie GlcNAc-PP-Dol. Ten, jest akceptorem drugiej reszty GlcNAc, dając GlcNAc-GlcNAc-PP-Dol. Odpowiednią transferazę przenoszącą drugą resztę GlcNAc wyekstrahowano i częściowo oczyszczono z mikrosomów kiełków fasoli [37]. Enzym wykazywał optimum pH 7.4—7.6, był aktywowany jonami  $Mg^{2+}$  oraz niejonowymi detergentami Noidet P-40 i Triton X-100. Nukleotydy urydylowe silnie hamowały enzym, przy czym UDP i UDP-Glc były silniejszymi inhibitorami aniżeli UMP i UTP.



W kolejnej reakcji szlaku dolicholowego z udziałem GDP-mannozy tworzy się  $\text{Man } \beta\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ . Reakcję tę katalizowały mikrosomalne preparaty z włókien bawełny i ekstrakty z *Phaseolus aureus* [ref. 9]. Dol-P-mannoza nie była donorem reszt mannozowych w tej reakcji. Enzym —  $\beta$ -mannozylotransferazę otrzymano z frakcji mikrosomalnej aorty [38], został on również znaleziony w komórkach soi (G. P. K a u s h a l, doniesienie ustne).

Jednym z produktów tworzących się *in vitro* podczas inkubacji preparatów błonnych pochodzenia zwierzęcego z donorami cukrów jest  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  [1, 9]. Donorem wszystkich reszt mannozowych jest tu GDP-mannoza [39, 40]. Preparaty enzymatyczne z nasion soi i włókien bawełny [41], liścieni grochu i fasoli [42—44] oraz kiełków fasoli [45] również syntetyzowały różne oligosacharydy związane z poliprenoidami. Istnieje przekonanie, że także u roślin dawcą pierwszych 5-ciu reszt mannozowych dla prekursorowego oligosacharydu jest GDP-mannoza. Świadczą o tym wyniki doświadczeń z użyciem EDTA lub afomycyny — związków blokujących syntezę Dol-P-mannozy. Solubilizowane preparaty frakcji mikrosomalnej komórek soi, zdolne do syntezy szeregu oligosacharydów od  $\text{ManGlcNAc}_2$  do  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ , w obecności wspomnianych inhibitorów syntetyzowały jedynie  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  i  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  [41]. W komórkach zwierzęcych heptasacharyd może być dalej wydłużany przy udziale Dol-P-mannozy i Dol-P-glukozy, aż do wytworzenia  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  [1]. U roślin ten ostatni związek wyizolowano z kiełków koniczyny [46], oraz hodowli komórek tytoniu [47] i soi [48]. Natomiast sam proces wydłużania oligosacharydu o 3 reszty Glc nie był przedmiotem badań.

#### IV. Przeniesienie oligosacharydu z nośnika lipidowego na białko

Glikolizacja białek jest na ogół procesem kotranslacyjnym i polega na przeniesieniu *en bloc* kompletnego łańcucha oligosacharydowego z donora lipidowego na rosnący polipeptyd akceptorowy [1]. W procesie tym oligosacharylotransferaza (dolichylodifosfooligosacharyd: białko oligosacharylotransferaza) zlokalizowana w retikulum endoplazmatycznym wchodzi w interakcję ze znajdującym się w tym samym środowisku oligosacharydo-lipidem oraz tworzącym się na polisomach łańcuchem polipeptydowym. Mechanizm tej reakcji jest jeszcze słabo poznany. Istnieje przekonanie, że specyficzność glikozylacji jest przede wszystkim związana z budową cząsteczkową białka akceptorowego, a w mniejszym stopniu z budową oligosacharydu [49].

Glikozylacja reszt asparaginy odbywa się w obrębie tzw. „sekwencji markerowej”  $\text{Asn-X-Ser/Thr}$  [11]. Mechanizm reakcji związany jest z wytworzeniem wiązania wodorowego między grupą amidową asparaginy i grupą hydroksylową hydroksyaminokwasu, co zwiększa reaktywność tej pierwszej w stosunku do donora reszt glikozylowych [50]. Tworzeniu się tego wiązania sprzyja konformacja typu pętli (loop) lub zgięcia ( $\beta$ -turn) w okolicy „sekwencji markerowej” i fakt ten został potwierdzony statystycznie [11].



Badania wielu autorów [ref. 2] świadczą, że obecność reszt glukozy w łańcuchu oligosacharydu powiązanego z lipidem znacznie ułatwia przeniesienie tego oligosacharydu na cząsteczkę białka poprzez obniżenie wartości  $K_m$  w stosunku do donora reszt glikozylowych. Jednakże obecność reszt glukozowych nie jest warunkiem sine qua non przeniesienia. Tak na przykład uzyskano szereg mutantów komórek drożdżowych, deficytowych na wielu etapach syntezy oligosacharydo-lipidu i stwierdzono, że nieglukozylowane oligosacharydy o długości od  $\text{Man}_{1-2}\text{GlcNAc}_2$  do  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  były przenoszone na białko. Podobne zjawisko obserwowano u pierwotniaków, a ostatnio również u zwierząt [52]. Sądzi się również, że glikozylacja chroni oligosacharyd przed enzymatyczną degradacją [2].

O ile reszty glukozy ułatwiają przeniesienie oligosacharydu na białko, o tyle reszty mannozy wydają się nie wpływać na ten proces. Dla przykładu usunięcie peryferyjnych reszt mannozowych z prekursorowego oligosacharydu przy pomocy  $\alpha$ -mannozydazy nie wpływało na aktywność donorową glikolipidu. Zielone wiciowce *Volvox carteri* syntetyzowały oligosacharyd  $\text{GlcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ , który był przenoszony na białko. Podobnie komórki organizmów eukariotycznych inkubowane w obecności inhibitorów wywołujących deficyt energetyczny (CCCP, antymycyna A) syntetyzowały  $\text{GlcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ , który brał udział w glikozylacji białek [ref. 2].

Badań nad przeniesieniem oligosacharydu z donora lipidowego na białko w materiale roślinnym nie prowadzono, jedynie w jednej pracy stwierdzono, że przeniesienie oligosacharydu o nieznanym bliżej składzie na zdenaturowaną rybonukleazę A katalizowała frakcja mikrosomalna z kiełków ręcznika [53]. Jednakże występowaniu tej reakcji u roślin świadczy wykazanie prekursorowego oligosacharydu związanego z białkiem. Nie opisano też oligosacharylotransferazy roślinnej. Natomiast enzym ten wyizolowano z materiału zwierzęcego [49].

## V. Przetwarzanie (processing) oligosacharydu N-glikoprotein

Oligosacharyd po przeniesieniu na białko ulega przetwarzaniu. [1, 2]. Zasadniczo dokonuje się ono w dwóch fazach: w pierwszej — następuje skrócenie łańcucha przy pomocy kilku specyficznych glikozydaz (trimming) i w drugiej — odbywa się dodawanie nowych reszt monosacharydowych przy udziale swoistych glikozylotransferaz (dojrzewanie).

Reakcje przetwarzania były badane przy użyciu komórek soi [55]. Zawieszoną komórek inkubowano najpierw z  $2\text{-}^3\text{H}$ -mannozą, a następnie z nieznaczoną mannozą. W różnych odstępach czasu komórki trawiono pronazą i ciężar cząsteczkowy uzyskiwanych glikopeptydów oznaczono przy pomocy kalibrowanej kolumny Biogel P-4. Obserwowano stopniowe usuwanie wszystkich reszt glukozy, a także jednej lub dwu reszt mannozy. W przypadku aglutyniny soi usuwane były jedynie reszty glukozowe, dając  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  występujący w

dojrzałym białku [16]. Potwierdza to przypuszczenie, że przetwarzanie glikoprotein roślinnych przebiega podobnie jak u zwierząt.

Wcześniejsze obserwacje Davies i Delmer [56] wskazują na występowanie u roślin reakcji charakterystycznej dla późnej fazy przetwarzania. Wymienieni autorzy wykazali obecność niewrażliwej na tunikamycynę reakcji przeniesienia GlcNAc z UDP-GlcNAc na nieredukujący koniec oligosacharydów glikoprotein endogennych w *Phaseolus aureus*. Resztę GlcNAc można było następnie usunąć przez traktowanie glikoprotein  $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidazą. Jednakże autorzy ci nie ustalili struktury oligosacharydów będących akceptorami reszt GlcNAc. Vitale i Chrispeels [57] badali syntezę fitohemaglutyniny w *Phaseolus vulgaris* i stwierdzili, że białko to było akceptorem reszt GlcNAc, zaś reakcja transferazowa przebiegała w aparacie Golgiego. Fitohemaglutynina była następnie transportowana do ziaren aleuronowych (protein bodies), stanowiących w pewnym sensie odpowiedniki lizosomów zwierzęcych, gdzie reszty GlcNAc były następnie usuwane przez obecną tam  $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidazę.

Innym, bezpośrednim podejściem do badania reakcji przetwarzania były doświadczenia z użyciem zdefiniowanego substratu  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_{1-2}$  i preparatów błonowych różnych tkanek, jako źródła enzymów. Uwolnienie jednej lub więcej reszt glikozytowych było miarą aktywności enzymatycznej i umożliwiło śledzenie procesu oczyszczania glikozydaz izolowanych z frakcji mikrosomalnej.

Reakcję przetwarzania inicjuje specyficzna  $\alpha$ 1,2-glikozydaza, zwana glukozydazą I, która odszczepia terminalną resztę glukozową [58, 59]. Aktywność glukozydazy I znaleziono w mikrosomach kiełków fasoli i po solubilizacji Tritonem X-100 oczyszczono ten enzym ok. 200 razy [60]. Enzym usuwał jedną resztę glukozy z  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}$  i był hamowany przez kojibiozę (kojibiose) — disacharyd glukozy połączony wiązaniem  $\alpha$ -1,2-glikozydowym. Inne, badane disacharydy zawierające glukozę, jak: nigerozą, maltozą i izomaltozą, nie były inhibitorami glukozydazy I. Enzym był również bardzo wrażliwy na działanie znanych silnych inhibitorów zwierzęcej glukozydazy I — kastanosperminy (castanospermine) i deoksynojirimycyny (deoxynojirimycin). Analogiczny enzym otrzymano w stanie hamogennym z wątroby cielęcej [61].

Kolejne dwie reszty glukozy w oligosacharydach są połączone wiązaniem  $\alpha$ 1,3-glikozydowym. Hydrolizę tych wiązań katalizuje jeden enzym glukozydaza II. Enzym ten otrzymano z wątroby szczura [62] i kiełków *Phaseolus aureus* [60]. Glukozydaza zwierzęca działała na  $\text{Glc}_{1-2}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , p-nitrofenylo- $\alpha$ -D-glukopyranozyd, 4-metyloumbeliferylo- $\alpha$ -D-glukopyranozyd i maltozę, zaś glukozydaza roślinna tylko na ten pierwszy związek. Oba enzymy są przypuszczalnie glikoproteinami.

Następnym etapem przetwarzania jest odszczepienie z  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  czterech reszt mannozy połączonych  $\alpha$ 1,2-glikozydowo i wytworzenie  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . U zwierząt reakcję tę katalizują trzy enzymy:  $\alpha$ -mannozydaza retikulum endoplazmatycznego oraz mannozydazy 1A i 1B, które to enzymy



odszczępiają w aparacie Golgiego trzy dalsze reszty mannozowe [63—66]. Szumiło i w s p. [67] wyizolowali mannozydazę I z frakcji mikrosomalnej *Phaseolus aureus*, która odcinała wszystkie cztery jednostki mannozowe. Enzym wymagał dla swojej aktywności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i działał jedynie na  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_{1-2}$ . Na jego budowę glikoproteinową wskazuje zdolność wiązania się z konkanawaliną A — lektyną z *Canavalia ensiformis*.

$\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  jest akceptorem reszt GlcNAc z UDP-GlcNAc w reakcji katalizowanej przez GlcNAc-transferazę I, dając  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  [68]. Produkt ten gromadził się w mieszaninie inkubacyjnej zawierającej solubilizowane preparaty z *Phaseolus aureus* oraz swainsoninę (swainsonine) która blokując mannozydazę II, zapobiegała dalszemu odszczepieniu reszt mannozowych i tworzeniu się dalszych produktów tej przemiany [69]. Na utworzony oligosacharyd  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  działa z kolei mannozydaza II, która odcina kolejne dwie reszty mannozowe połączone wiązaniami glikozydowymi  $\alpha 1,3$  i  $\alpha 1,6$  [68]. Oczyszczony preparat z kiełków fasoli złocistej wykazywał optimum pH 6,0, był aktywowany Tritonem X-100 i hamowany przez swainsoninę — alkaloid z *Astragalus sp.*, a także przez trójmannozyd zawierający wiązania glikozydowe  $\alpha 1,3$  [70].

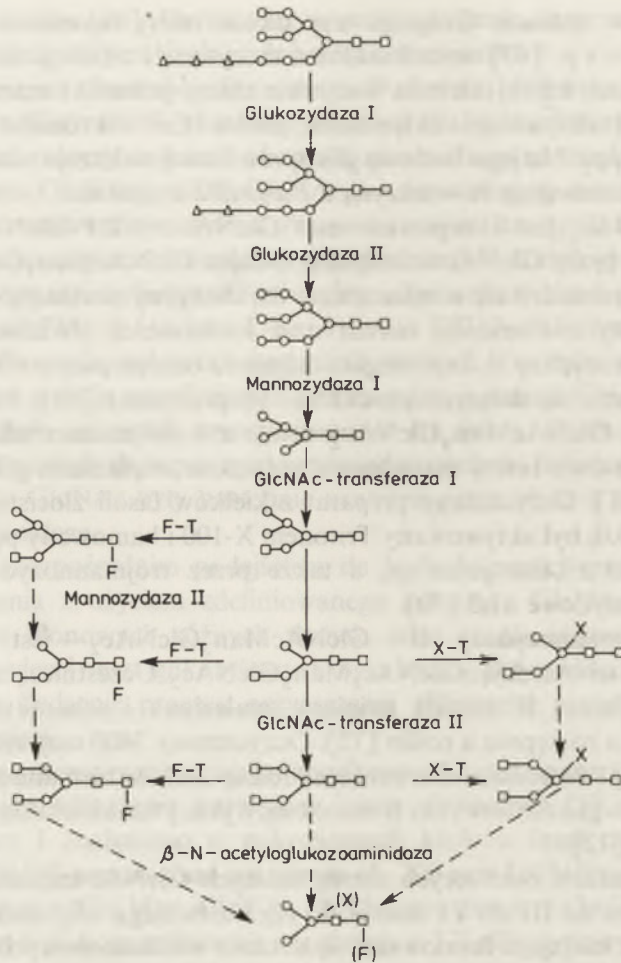
Produkt mannozydazy II —  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  — jest akceptorem nowej reszty GlcNAc, dając  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Uczestnicząca w tej reakcji GlcNAc-transferaza II została najpierw znaleziona i scharakteryzowana u zwierząt [71], a następnie u roślin [72]. Oczyszczony 3400 razy enzym z frakcji mikrosomalnej *Phaseolus aureus* przenosił resztę GlcNAc na mannozę połączoną wiązaniem  $\alpha 1,6$ -glikozydowym z  $\beta$ -mannozą; wykazywał absolutną zależność od jonów  $\text{Mn}^{2+}$  [72].

W organizmach zwierzęcych szereg dalszych GlcNAc-transferaz oznaczonych numerami od III do VI dodaje do tego ostatniego oligosacharydu nowe reszty GlcNAc inicjujące formowanie się struktur wieloantennowych [11]. Z kolei wydłużanie się rozgałęzień o reszty galaktozy, fukozy czy kwasu sjałowego odbywa się przy udziale specyficznych glikozylotransferaz zlokalizowanych w aparacie Golgiego. Cukry te są przenoszone na rosnący glikosacharyd z odpowiednich połączeń nukleotydowych, t.j. UDP-galaktozy, GDP-fukozy i CMP-kwasu sjałowego [11]. U roślin reakcje te są jeszcze mało poznane.

Badania wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia enzymów przetwarzania glikoprotein roślinnych (glikozydaz i glikozylotransferaz) zostały przeprowadzone w liścieniach *Phaseolus vulgaris* [73]. Wykazały one, że glikozydazy I i II występują w retikulum endoplazmatycznym, natomiast wszystkie pozostałe — w aparacie Golgiego. Te ostatnie były jednocie rozmieszczone w obrębie aparatu Golgiego [73].

Wyniki dotychczasowych badań przeprowadzonych przez zespół E l b e i n a wskazują, że przetwarzanie oligosacharydowych łańcuchów N-glikoprotein roślinnych i zwierzęcych biegnie szlakiem analogicznym aż do etapu wytworzenia  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (Ryc. 3). Uzupełnieniem i rozwinięciem tych badań są prace grupy Chrispeelsa wyjaśniające strukturę i biosyntezę fitohemaglutyni-





Ryc. 3. Reakcje przetwarzania prekursorowego oligosacharydu N-glikoprotein obserwowane w preparatach fasoli. □ — N-acetyloglukozoamina; ○ — mannoza; Δ — glukoza; F — fukoza; F-T — fukozylotransferaza; X — ksyloza; X-T — ksylozylotransferaza.

ny i fazeoliny — dwóch glikoprotein zapasowych, gromadzonych w ziarnach aleuronowych liścieni *Phaseolus vulgaris* [23, 25, 74].

Fitohemaglutynina jest tetramerem, w którym każdy łańcuch polipeptydowy zawiera dwa oligosacharydy związane N-glikozydowo: jeden — polimannozowy i drugi — zmodyfikowany. W retikulum endoplazmatycznym każdy z czterech polipeptydów otrzymuje kotranslacyjne dwa oligosacharydy polimannozowe [74]. Następnie jeden oligosacharyd z każdej pary ulega w aparacie Golgiego obróbce polegającej na skróceniu łańcuchów oraz uzyskaniu przezeń reszt fukozy, ksylozy oraz peryferyjnych reszt GlcNAc. Podstawienie fukozą może odbywać się na poziomie  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  i  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , zaś ksylozą — tylko na poziomie dwóch ostatnich oligosacharydów [74].

Inne, także tetrametryczne białko zapasowe *Phaseolus vulgaris* — fazeolina zawiera trzy rodzaje N-glikozydowo związanych oligosacharydów:  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  i  $\text{Xyl-Man}_3\text{GlcNAc}_2$  [23]. Interesującym jest fakt, że przetwarzanie oligosacharydu 3-ciego dokonuje się (z wyjątkiem reakcji glikozydaz) w aparacie Golgiego, podczas gdy usuwanie dwóch reszt mannozowych w oligosacharydzie 2-gim ma miejsce dopiero w ziarnach aleuronowych [23].

Warto podkreślić, że preparaty mikrosomalne z fasoli nie były zdolne do katalizowania przeniesienia dalszych reszt  $\text{GlcNAc}$  na  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , co świadczyłoby, że nie zawierają one aktywności  $\text{GlcNAc}$ -transferaz III i IV. Brak tych enzymów byłby przeszkodą w syntezie u roślin oligosacharydów trójantenowych oraz oligosacharydów posiadających dodatkową resztę  $\text{GlcNAc}$  przy centralnej  $\beta$ -mannozie w rdzeniu (bisected). W istocie, takich oligosacharydów dotąd u roślin nie stwierdzono.

Kimura i wsp. [75] w oparciu o analizę strukturalną szeregu oligosacharydów lektyn *Ricinus communis* zaproponowali odmienny szlak ich przetwarzania. Nie uwzględnia on ani reakcji glikozydazowych pierwszej fazy (trimming), ani też udziału w tym procesie  $\text{GlcNAc}$ -transferaz I i II. W odczuciu autora szlak ten świadczy raczej o dalszej hydrolitycznej modyfikacji oligosacharydów w ziarnach aleuronowych po ich uprzednim przetworzeniu w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego.

Z badań Chrispeels i wsp. [57] wynika, że obie peryferyjne reszty  $\text{GlcNAc}$  w zmodyfikowanym łańcuchu oligosacharydowym fitohemaglutyniny ulegają odszczepieniu w ziarnach aleuronowych, gdzie białko to gromadzi się jako materiał zapasowy. To samo zjawisko obserwowano również w przypadku fazeoliny [23]. Można jedynie spekulować, czy reszty te nie spełniają przypadkiem funkcji sygnału decydującego o transporcie glikoprotein do ziaren aleuronowych. W przypadku hydrolaz lizosomów zwierzęcych funkcję tę pełni reszta mannozo-6-fosforanowa [2]. Taka rola wydaje się jednak mało prawdopodobna, ponieważ tunikamycyna — silny inhibitor glikolizacji białek na poziomie  $\text{GlcNAc-1-P}$  transferazy przemiany dolicholowej — nie hamuje transportu nieglikozylowanej fitohemaglutyniny do ziaren aleuronowych [76]. Ponadto, w strukturach tych występują białka nie będące glikoproteinami (glicynina soi, legumina grochu). Raczej można przypuszczać, że terminalne reszty  $\text{GlcNAc}$  pełnią funkcję sygnałowe decydujące o przebiegu późnych reakcji przetwarzania oligosacharydów w aparacie Golgiego (np. fukozytacji i ksylozytacji).

W oparciu o dotychczasowe badania można stwierdzić, że w N-glikoproteinach roślinnych występują struktury oligosacharydowe charakterystyczne dla glikoprotein zwierzęcych. Są one jednak znacznie mniej rozgałęzione, nie zawierają typowych dla zwierzęcych reszt sjałowych, lecz są bogate w reszty ksylozowe, które z kolei w zwierzęcych glikoproteinach występują niezwykle rzadko.

Biosynteza oligosacharydów u roślin obejmuje, podobnie jak u zwierząt, trzy fazy: formowanie się prekursorowego oligosacharydu na nośniku polipreno-

idowym, jego przeniesienie na białko i przetwarzanie. Również wewnątrzkomórkowa organizacja biosyntezy jest podobna: reakcje dwóch pierwszych faz są zlokalizowane w rektikulum endoplazmatycznym, trzeciej — zainicjowane w retikulum endoplazmatycznym, przebiegają głównie w aparacie Golgiego. W przypadku N-glikoprotein zapasowych roślin końca hydrolityczna modyfikacja oligosacharydów może odbywać się w ziarnach aleuronowych.

Autor wyraża serdeczne podziękowanie Prof. dr Alanowi D. Elbeinowi z Health Science Center at San Antonio, USA, za przyznanie stypendium i możliwość odbycia 2-letniego stażu w Jego laboratorium, gdzie wykonano badania cytowane w niniejszym artykule.

Artykuł otrzymano 13 października 1987 r.  
Zaakceptowano do druku 9 września 1988 r.

## PIŚMIENNICTWO

- Hubbard A.C., Ivat R.J. (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 555—583.
- Kornfeld R., Kornfeld S., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 631—664.
- Jeleńska M.M., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 291—307.
- Palamarczyk G., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 443—463.
- Wytkins W.W., (1986), *Carbohydr. Res.*, **149**, 1—12.
- Krotkiewski H., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, 433—463.
- Elbein A.D., (1984), *CRC Critical Rev. Biochem.*, **16**, 21—49.
- Schwarz R.T., Datema R., (1984), *Trends in Biochem. Sci.*, **2**, 32—34.
- Elbein A.D., (1979), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 239—272.
- Lehle L., Tanner W., (1983), *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 568—574.
- Palamarczyk G., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 297—307.
- Parodi A.J., Leloir L.F., (1979), *Biochem. Biophys. Acta*, **559**, 1—37.
- Lis H., Sharon N., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3468—3476.
- Iglesias J.L., Lis H., Sharon N., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 247—252.
- Dorland L., Halbeck H.V., Vliegenthart J.F.G., Lis H., Sharon N., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7708—7711.
- Shibata S., Goldstein J., Baker D.A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9324—9329.
- Misaki A., Goldstein J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6995—6999.
- Ohtani K., Misaki A., (1980), *Carbohydr. Res.*, **87**, 257—285.
- Vitale A., Werner T.G., Chrispeels M., (1984), *Planta*, **160**, 256—263.
- Fournet B., Leroy Y., Wieruszkeski J., Montreuil J., Poretz R.D., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **166**, 321—324.
- Prigent M.J., Montreuil J., Strecker G., (1984), *Carbohydr. Res.*, **131**, 83—92.
- Yamauchi F., Thanth V.H., Kawase M., Shibasaki K., (1976), *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 691—696.
- Sturm A., Van Kuik J.A., Vliegenthart J.F.G., Chrispeels M., (1987), *J. Chem.*, **262**, 13392—13403.
- Browder S.K., Beevers L., (1978), *FEBS Lett.*, **9**, 145—148.
- Chrispeels M., Higgins T.J., Craig G., Spencer D., (1982), *J. Cell. Biol.*, **93**, 5—14.
- Mitsui T., Akazawa T., Christeller J.T., Tartakoff A.M., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 315—328.
- Fakuda M., Kondo T., Asawa T., (1976), *J. Biochem.*, **80**, 1223—1232.
- Takahashi N., Hotta T., Ishihara H., Mori Mi, Tejima S., Bligny K., Azawa T., Endo S., Arata S., (1986), *Biochemistry*, **25**, 388—395.



29. Clark J., Shanon L. M., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 428—442.
30. Minobe S., Nakajima H., Itoh N., Funakoshi I., Yamashima I., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 1851—1854.
31. Ericson M. C., Delmer D. P., (1978), *Plant Physiol.*, **61**, 819—823.
32. Ishihara H., Takahashi N., Oguri N., Tejima S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10715—10719.
33. Van Kuik J. A., Van Halbeck H., Kamerling J. P., Vliegenthart J. P. G., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 13984—13988.
34. Gonta-Grabiec „ (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 61—80.
35. Turowska G., (1971), *Post Biochem.*, **17**, 483—495.
36. Kaushal G. P., Elbein A. D., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 748—752.
37. Kaushal G. P., Elbein A. D., (1986), *Plant Physiol.*, **81**, 1086—1091.
38. Kaushal G. P., Elbein A. D., (1986), *Plant Physiol.*, **81**, 748—752.
39. Li E., Kornfeld S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1600—1606.
40. Chapman A., Li E., Kornfeld S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10243—10249.
41. Bailey D. S., DeLuca V., Durr M., Verma D. P. S., MacLachlan G. A., (1980), *Plant Physiol.*, **66**, 1113—1118.
42. Beevers L., Mense R. M., (1978), *Plant Physiol.*, **60**, 703—708.
43. Browder S. K., Beevers L., (1980), *Plant Physiol.*, **65**, 924—930.
44. Ericson M. C., Delmer D. P., (1977), *Plant Physiol.*, **59**, 341—347.
45. Hori H., Elbein A. D., (1982), *Plant Physiology*, **70**, 12—20.
46. Staneloni R. J., Tolmasky M. E., Petriella C., Ugalde R. A., Leloir L. F., (1980), *Biochem. J.*, **191**, 257—260.
47. Lehle L., (1981), *FEBS Lett.*, **123**, 63—66.
48. Hori H., James D. W., Elbein A. D., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, 12—21.
49. Kaplan A. H., Welpy J. K., Lennarz W. J., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 161—173.
50. Bause E., Legler G., (1981), *Biochem. J.*, **195**, 639—644.
51. Huffaker T. C., Robbins P. W., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**, 7466—7470.
52. Romero P. A., Herscovic A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 15936—15940.
53. Meller R. B., Roberts L. M., Lord J. M., (1979), *Biochem. J.*, **182**, 629—631.
54. Hubbard S. C., Robbins P. W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4568—4576.
55. Hori H., Elbein A. D., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **220**, 415—425.
56. Davies H. M., Delmer D. P., (1981), *Plant Physiol.*, **68**, 284—291.
57. Vitale A., Chrispeels M., (1984), *J. Cell. Biol.*, **99**, 133—140.
58. Grinna L. S., Robbins P. W., (1979), *J. Cell. Biol.*, **254**, 8814—8818.
59. Elting J. J., Chen W. W., Lennarz W., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2325—2332.
60. Szumiło T., Kaushal G. P., Elbein A. D., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 261—272.
61. Hettkamp H., Legler G., Bause E., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **142**, 85—90.
62. Burns D. M., Touster G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9991—1000.
63. Tulsiani D. R. P., Ophem D. J., Touster G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3227—3233.
64. Tabas J., Kornfeld S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11655—11663.
65. Bischoff J., Kornfeld R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7907—7910.
66. Forsee W. T., Schutzbach J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6577—6582.
67. Szumiło T., Kaushal G. P., Hori H., Elbein A. D., (1986), *Plant Physiol.*, **81**, 383—389.
68. Harpaz H., Schachter R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4885—4893.
69. Szumiło T., Kaushal G. P., Elbein A. D., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 1395—1403.
70. Szumiło T., Elbein A. D., (1987), w Materiały XXIII Zjazdu Pol. Tow. Biochem., Białystok.
71. Oppenheimer C. L., Hill R. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 799—804.
72. Szumiło T., Kaushal G. P., Elbein A. D., (1987), *Biochemistry*, **26**, 5498—5504
73. Sturm A., Johnson K. D., Szumiło T., Elbein A. D., Chrispeels M., (1987), *Plant Physiol.*, **85**, 741—745.

74. Johnson K.D., Chrispeels M., (1986), *Plant Physiol.*, **80**, Suppl. 84 (abstr.).
75. Kimura T., Hase S., Kobayashi Y., Kougoku Y., Fumatsu G., Ikenaka T., (1987), *J. Biochem.*, **94**, 1051—1054.
76. Bollini R., Ceriotti A., Daminati M.G., Vitale A., (1985), *Physiol. Plant.*, **65**, 15—22.

ANNA TUKENDORF\*

## Białka i peptydy wiążące metale ciężkie

### Proteins and peptides binding heavy metals

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Białka wiążące metale ciężkie u zwierząt i mikroorganizmów roślinnych
  - II-1. Metalotioneiny\*\*
  - II-2. Białka ubogie w cysteinę wiążące metale ciężkie
- III. Białka wiążące metale ciężkie u roślin wyższych
- IV. Fitochelatyny
- V. Homo-fitochelatyny
- VI. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Heavy metal-binding proteins in animals and plant microorganisms
  - II-1. Metallothioneins
  - II-2. Heavy metal-binding proteins with low cysteine content
- III. Heavy metal-binding proteins in higher plants
- IV. Phytochelatins
- V. Homo-phytochelatins
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Cd-BP — białko wiążące kadm (cadmium binding protein), D — dalton, kD — kilodalton, GSH =  $\gamma$ -glu-cys / gly — glutation, h-GSH =  $\gamma$ -glu-cys /  $\beta$ -ala — homo-glutation.

## I. Wstęp

Wzrost roślin w środowiskach skażonych metalami ciężkimi, jest zjawiskiem szeroko rozpowszechnionym, a zarazem przykładem ewolucji na drodze naturalnej selekcji [1]. Towarzyszy temu wytwarzanie ekotypów roślinnych adaptują-

\* Dr, Instytut Biologii, Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

\*\* Na temat metalotioneiny ukazał się w 1976 roku obszerny artykuł przeglądowy: Piotrowski J. K., Mogilnicka E. M., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 401—419.



cych się do przeżywania takich warunków bez objawów toksyczności, a ekotypy te określa się mianem tolerancyjnych.

Mechanizmy pozwalające roślinom przeżywać w środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi są bardzo różne [2]. Polegają one między innymi na wydzielaniu przez korzenie nadmiaru pobranych jonów [3], unieruchamianiu metali w ścianach komórkowych [4, 5] lub wakuolach [6—8]. Często spotykaną adaptacją są zmiany enzymatyczne, polegające bądź na syntezie nowych enzymów, bądź dotyczące ilości czy intensywności ich wytwarzania [9]. Bardzo powszechnym sposobem detoksykacji organizmów roślinnych jest wiązanie wolnych toksycznych jonów metali ciężkich w nietoksyczne kompleksy ze składnikami chemicznymi komórek. Wzrostowi stężenia jonów pewnych metali (zwłaszcza cynku i niklu) w środowisku odżywczym roślin towarzyszy wzmożona synteza kwasu jabłkowego i malonowego w cytoplazmie oraz kwasu szczawioowego w wakuoli [6, 8, 10, 11]. Kwasy te, są czynnikami wiążącymi jony metali w tych przedziałach komórkowych, eliminując tym samym jony z ogólnego metabolizmu. Znaną odpowiedzią na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów miedzi jest wiązanie jej z aminokwasami, zwłaszcza takimi jak cysteina i histydyna. Powstające kompleksy pełnią rolę zarówno w unieruchamianiu wolnych toksycznych jonów miedzi oraz są połączeniami, w postaci których miedź jest transportowana w roślinie przez floem [12].

Inną, najbardziej chyba powszechną, formą znoszenia toksycznego działania jonów metali ciężkich u roślin są ich połączenia z białkami. Białka te, to bądź peptydy obecne w komórkach w naturalnych warunkach [13—16], bądź też peptydy indukowane przez jony metali [17—21].

Szerszemu omówieniu tego ostatniego zagadnienia, poświęcony jest obecny artykuł.

## II. Białka wiążące metale ciężkie u zwierząt i mikroorganizmów roślinnych

### II-1. Metalotioneiny

W 1957 roku Margoshes i Vallee [22] wyizolowali z końskiej nerki białko związane z kadmem. Po dokładnym oczyszczeniu i scharakteryzowaniu [23, 24] nazwane zostało metalotioneiną, z powodu stwierdzonych w nim niezwykle dużych ilości metalu i siarki. Dalsze badania wykazały, że metalotioneiny są obecne w niektórych tkankach zwierzęcych w warunkach fizjologicznych. Niewielkie ich ilości stwierdzono w wątrobie, nerkach i szpiku kostnym, gdzie funkcjonują jako główne formy przechowywania niezbędnych śladowych pierwiastków, głównie  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ , lub są formą wiązania toksycznych jonów, np.  $Cd^{2+}$  w celu wyłączenia ich z ogólnego metabolizmu. Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów metali ciężkich, indukuje w nich intensywność syntezy metalotionein. Taka zdolność, wytwarzania zwiększonych ilości białek

chelatujących toksyczne wolne jony, jest fizjologiczną podstawą zmniejszenia wrażliwości na metale ciężkie u zwierząt [25].

Stać obecność metalotionein w niektórych tkankach zwierzęcych, wyklucza pogląd, że rola metalotionein jest wyłącznie protekcyjna. Metalotioneinom przypisuje się też udział w zewnątrzkomórkowej (homeostatycznej) i wewnątrzkomórkowej regulacji metabolizmu pierwiastków śladowych w organizmie w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe zmiany ich stężeń. Te, zwykle „krótko żyjące” połączenia, mogą po degradacji uwalniać jony metali niezbędnych dla potrzeb metaloenzymów, zapewniając organizmowi homeostazę w gospodarce mikroelementami [25, 26].

Metalotioneiny, oraz inne metaloproteiny o właściwościach podobnych do metalotioneiny wyizolowanej z końskiej nerki, spotyka się u sinic [17], grzybów [18—20], bezkręgowców [27, 28] i zwierząt kręgowych [22, 23, 29, 30, 31]. Kompleksy takie, niezależnie od organizmu z jakiego pochodzą, oraz niezależnie od rodzaju jonu który je indukuje, charakteryzuje wiele wspólnych cech:

1) są to białka termostabilne, których masa cząsteczkowa wyliczona na podstawie składu aminokwasowego wynosi 6—7 kD, a oznaczona metodą filtracji żelowej wynosi 10 kD,

2) są indukowane przez wiele metali, a zwłaszcza  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Bi^{3+}$ ,  $Hg^{+}$ ,  $Au^{+}$ ,  $Ag^{+}$ ,

3) duża ilość zawartej w nich siarki jest wynikiem obecności cysteiny, która stanowi około 33% całkowitej zawartości reszt aminokwasowych budujących łańcuch polipeptydowy złożony z 61—62 reszt aminokwasowych,

4) w I-rzędowej strukturze białka metalotionein zwraca uwagę powtarzająca się sekwencja cysteina-X-cysteina, gdzie X jest aminokwasem innym niż cysteina (najczęściej są to lizyna, arginina lub seryna),

5) sekwencja cysteina-X-cysteina są miejscami wiązania jonów metali z białkiem a wiązania te mają charakter połączeń typu merkaptydowego,

6) stosunek molarny zawartej w polipeptydzie cysteiny do ilości wiązanych przez jej reszty jonów metali dwuwartościowych wynosi 3 : 1,

7) brak, lub bardzo niska zawartość w składzie aminokwasowym aminokwasów aromatycznych i histydyny,

8) merkaptydowe wiązanie metalu z cysteiną oraz brak aminokwasów aromatycznych powodują, że metalotioneiny charakteryzuje wysoka absorbancja przy 250 nm, a niska przy 280 nm. W zwierzęcych metalotioneinach stosunek  $A_{250}/A_{280}$  wynosi około 10.

Metalotioneiny są kodowane przez geny strukturalne, których ekspresję i transkrypcję regulują wewnątrzkomórkowe zmiany stężeń jonów metali. Wykazano ponadto, że u zwierząt czynniki stresowe i towarzyszący im wzrost poziomu hormonów glukokortykosterydowych, mogą wzmacniać intensywność syntezy wątrobowych metalotionein. Podobny wpływ, na zwiększenie ilości metalotionein w organizmach zwierzęcych, ma iniekcja bakteryjnego lipopolisacharydu [32—35]. Również infekcje wirusowe wywołują wzrost poziomu transkrypcji



genów metalotionein, a za indukcję tę odpowiada prawdopodobnie interferon syntetyzowany w odpowiedzi na infekcje [35, 36].

U roślin obecność metalotionein ograniczona jest wyłącznie do niektórych mikroorganizmów. Jony miedzi, obecne w środowisku wzrostu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, indukują wytwarzanie w komórkach tego grzyba białka wiążącego metal, a właściwości tego kompleksu pozwalają zaliczyć go do miedziotionein. Wyizolowane białko ma masę cząsteczkową 10 kD, w składzie aminokwasowym zawiera 24,3% cysteiny i wiąże 10 atomów metalu [18]. Kompleks, o właściwościach podobnych do tych jakie cechują metalotioneiny zwierzęce, izolowano również z komórek grzyba *Neurospora crassa* rosnącego w obecności znacznej zawartości jonów miedzi w podłożu [19, 20]. Wydaje się, że również i u tego mikroorganizmu roślinnego, zdolność przeżywania w takich warunkach może być wynikiem możliwości syntezy miedzioproteiny. Miedzioproteinę tę nazwano miedziotioneiną, mimo wielu odmiennych jej właściwości różniących ją od metalotionein zwierzęcych. Tioneinę *Neurospora crassa* charakteryzuje, podobnie jak metalotioneiny zwierzęce, wysoka zawartość cysteiny (28%). Łańcuch polipeptydowy zbudowany jest tu jednak nie z 61 (jak u zwierząt), ale z 25 reszt aminokwasowych, czego konsekwencją jest, znacznie niższa niż u zwierząt, masa cząsteczkowa kompleksu (2.2 kD). Również w komórkach sinicy *Synechococcus sp.*, rosnącej w środowisku o zwiększonej zawartości kadmu, wykryto obecność kadmotioneiny o masie cząsteczkowej 8.54 kD i zawartości cysteiny wynoszącej 11.4% [17].

## II-2. Białka ubogie w cysteinę wiążące metale ciężkie

U zwierząt bezkręgowych i niektórych grzybów, spotyka się również białka wiążące metale ciężkie, lecz nie charakteryzujące się jednak, tak jak metalotioneiny, wysoką zawartością cysteiny. Kompleksy te posiadają też całkowicie odmiennie właściwości. U trąbika *Buccinum tenuissimum* stwierdzono obecność dwu ( $FII_A$  i  $FII_B$ ) plazmatycznych glikoprotein wiążących kadm [37]. Glikoproteina  $FII_A$  zawiera ok. 80% białka i ok. 20% cukrów (wśród których przeważają glukoza, fruktoza, galaktoza, mannoza, glukozamina i galaktozamina). Masa cząsteczkowa tej glikoproteiny wynosi 8 kD i wiąże ona 6 atomów kadmu. Glikoproteina  $FII_B$ , złożona z ok. 92% białka i ok. 8% podobnych rodzajów cukrów, wiąże 8 atomów kadmu. W obu glikoproteinach stwierdza się jedynie śladowe ilości cysteiny.

Podobną glikoproteinę, związaną z jonami kadmu, a zawierającą nieznaczne ilości cysteiny, wykazano u larwy owada *Pteronarcys californica* [38].

W gruczołach trawiennych mięczaka *Pecten maximus*, wykryto zawierające jony kadmu białko o masie cząsteczkowej 55 kD [39]. Białko to zawiera również pewne ilości węglowodanów i można je uważać za glikoproteinę. Zawartość reszt cysteinowych w składzie aminokwasowym wynosi około 9%.

Również i w komórkach grzybów, rosnących w obecności jonów kadmu, stwierdza się obecność fosfoglikoproteiny wiążącej ten metal. U grzyba *Agaricus*



*macrosporus* taki Cd-fosfoglikoproteinowy kompleks nazwano mykofosfatyną. Nie wykazano w nim obecności cysteiny a w wiązaniu metalu uczestniczą reszty fosfoseryny [40]. Właściwości mykofosfatyny porównywane są z właściwościami białek uczestniczących w transporcie wapnia u zwierząt [41]. Przypuszczalna rola tej kadmoproteiny grzybów polega na gromadzeniu jonów kadmu, którego obecność wielokrotnie wykazano, stymuluje wzrost mycelium [42].

### III. Białka wiążące metale ciężkie u roślin wyższych

Lata 80-te przyniosły bardzo dużo doniesień o, podobnym jak u zwierząt, mechanizmie detoksykacji organizmów roślinnych narażonych na wzrost w środowiskach skażonych metalami ciężkimi. W 1980 roku R a u s e r i C u r v e t t o [21] opisali właściwości metaloproteiny, którą wyizolowali z korzeni trawy *Agrostis gigantea* rosnącej w warunkach skażonego miedzią podłoża. Autorzy nazwali odkryty kompleks miedziotioneiną wykazując, że to roślinne białko ma właściwości charakterystyczne dla metalotionein zwierzęcych. Przemawiały za tym termostabilność i niska masa cząsteczkowa miedzioproteiny oraz wysoka zawartość cysteiny w jej składzie aminokwasowym. Syntezę tego białka *de novo* indukował wzrost stężenia jonów miedzi w podłożu, a obecności jego nie stwierdzano u roślin nie narażonych na działanie nefizjologicznych dawek metalu.

Odkrycie R a u s e r a i C u r v e t t o, metalotioneiny w tkankach roślin wyższej, zainspirowało wielu badaczy do szukania potwierdzenia, że w organizmach roślin wyższych istnieje, podobny jak u zwierząt, mechanizm detoksykacji. Wynikiem tego, było pojawienie się w ostatnich kilku latach, bardzo dużej ilości publikacji w których opisywano właściwości wyizolowanych z tkanek roślin wyższych metaloprotein, tworzących się w obecności metali ciężkich. Ich obecność stwierdzono w korzeniach trawy *Agrostis gigantea* [43—45], kukurydzy [46], pomidora [47], fasoli [48, 49], soi [50], *Silene cucubalus* [51], tytoniu [52], ryżu [53] i w liściach kapusty [54].

Wykrywane metaloproteiny roślin wyższych, wielu autorów nie nazywało jednak metalotioneinami, lecz kompleksami podobnymi do metalotionein („metallothionein-like complexes”), ze względu na znaczące różnice ich składu aminokwasowego w porównaniu z metalotioneinami zwierzęcymi. Charakteryzuje je wprawdzie wysoka zawartość cysteiny [25—40%], jednak stwierdza się w ich składzie aminokwasowym niezwykle dużą zawartość kwasu glutaminowego [20—54%].

Masy cząsteczkowe tych roślinnych metaloprotein określano jako podobne do mas cząsteczkowych metalotionein zwierzęcych. Zwracano jednak uwagę, że wyznaczenie mas cząsteczkowych roślinnych metaloprotein zależne jest w dużym stopniu od sposobu ich izolowania z tkanek [16, 45, 55, 56]. Obecność dużej zawartości kwasu glutaminowego w budowie roślinnych metaloprotein sprawia, że mają one charakter anionowy i przez to wykazują wysokie

powinowactwo względem DEAE-zasadowych jonowymieniaczy używanych do ich rozdziału. Niezbędne staje się więc stosowanie buforów o znacznie wyższej, niż w przypadku metalotionein zwierzęcych, sile jonowej do elucji roślinnych kompleksów z zasadowych wymieniaczy jonowych. Zastosowanie zaś buforów o niskiej sile jonowej, sprzyja agregacji lub oligomeryzacji cząsteczek o anionowych ładunkach, co może być powodem, że oznaczone masy cząsteczkowe są znacznie wyższe niż w rzeczywistości. Po uwzględnieniu odpowiednich warunków preparatyki okazało się, że masy cząsteczkowe, prawie wszystkich opisanych dotąd metaloprotein roślin wyższych, są znacznie niższe (600—4000) niż metalotionein zwierzęcych (10000).

W naszej pracowni wykryliśmy miedzioproteiny w korzeniach owsa [13] i szpinaku [14, 15] w warunkach wzrostu w środowisku o znacznej zawartości miedzi. Nie wykazaliśmy jednak, aby białka wiążące powstawały *de novo* i miały właściwości metalotionein zwierzęcych. Stwierdzamy, że są to białka cytosolu komórek mające zdolność wiązania metalu przez grupy sulfhydrylowe. Ich anionowy charakter sprawiał nam również trudności w wyznaczeniu masy cząsteczkowej metodą filtracji żelowej. Zastosowanie buforów o wysokiej sile jonowej do elucji wskazuje, że ich masy cząsteczkowe mają wartość około 2000.

Badania ostatnich lat wydają się dodatkowo potwierdzać różnice we właściwościach metaloprotein roślinnych i zwierzęcych, a różnice te skłaniają wielu autorów do kwestionowania obecności metalotionein typu zwierzęcego u roślin wyższych [16, 55, 57—59].

#### IV. Fitochelatyny

Począwszy od 1985 roku, pojawiło się w literaturze wiele informacji o peptydach wiążących metale ciężkie w tkankach roślin wyższych. Synteza tych peptydów oraz ich właściwości, różnią je znacznie od metalotionein zwierząt i mikroorganizmów roślinnych, oraz od metaloprotein opisanych dotąd u roślin. Ponadto ich struktura znakomicie uzasadniła, stwierdzaną dotychczas przez wielu autorów, wysoką zawartość cysteiny i kwasu glutaminowego w budowie metaloprotein roślinnych, oraz ich niską masę cząsteczkową. Peptydy te nazwano fitochelatynami [59].

Fitochelatyny wiążą najczęściej kationy takie jak:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , a także aniony  $\text{AsO}_4^{3-}$  i  $\text{SeO}_3^{2-}$ . Nie obserwowano syntezy fitochelatyn pod wpływem stresów, np. temperaturowych, które wywołują wytwarzanie specyficznych białek w organizmach zwierzęcych. Synteza fitochelatyn nie jest indukowana przez metale *de novo*, lecz tworzą się one z wykorzystaniem, powszechnie występującego w komórkach trójpeptydu — glutationu [16, 60—62].

Glutation jest syntetyzowany w komórkach roślinnych głównie w chloroplastach i cytoplazmie [63—65]. W stanie zredukowanym (GSH) działa w komórkach jako czynnik utrzymujący reszty cysteinowe białek w formie





Od czasu odkrycia fitochelatyn w tkankach roślin wyższych przez Grilla i wsp. [59], obecność peptydów o budowie poli( $\gamma$ -glu-cys)gly wiążących metale ciężkie, potwierdzono u tych organizmów wielokrotnie. Stwierdzono je w badaniach kultur komórkowych wielu gatunków roślin okrytonasiennych hodowanych w obecności jonów kadmu [55, 57, 59, 75–77]. Opisano też fitochelatyny wiążące kadm, wykryte w korzeniach wielu gatunkach roślin jedno- i dwuliściennych [78–80], oraz wiążące miedź w korzeniach *Mimulus guttatus* [81, 82]. Wszystkie, z opisanych dotychczas fitochelatyn, mają niską masę cząsteczkową a ich skład aminokwasowy pozwala na zaproponowanie struktury ich łańcuchów peptydowych.

Skoro, jak uważa wielu autorów, glutation jest bezpośrednio zaangażowany w syntezę fitochelatyn, intensywność syntezy i zużycia glutationu komórkowego powinna ulegać zmianie w obecności toksycznych stężeń metali ciężkich. Przypuszczenia te poparły ostatnie badania równoczesnego określania poziomu komórkowego glutationu i tworzonych fitochelatyn w obecności metali ciężkich [16, 62]. Równocześnie z syntezą peptydów wiążących metale spada zawartość glutationu w komórkach. Wówczas, najszybciej tworzy się fitochelatyna o najkrótszym łańcuchu, tzn. ( $\gamma$ -glu-cys)<sub>2</sub>gly. Fitochelatyny o dłuższych łańcuchach powstają później.

Za udziałem glutationu w syntezie fitochelatyn przemawia też fakt, że po zastosowaniu inhibitorów syntezy glutationu, nie obserwuje się wytwarzania metalopeptydów [16, 76, 77]. Specyficznym inhibitorem syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej jest preparat o nazwie buthionin sulfoximin. Inhibitor ten, użyty w stężeniu 2 mM powoduje, że w komórkach *Rauwolfia serpentina*, rosnących w obecności toksycznych stężeń jonów srebra, obserwuje się 94% spadek produkcji fitochelatyn [16].

Fitochelatyny, podobnie jak glutation, nie są syntetyzowane na drodze ekspresji genów strukturalnych w obecności metali ciężkich. Również obecność wiązań  $\gamma$ -karboksamidowych w ich budowie wyklucza możliwość kodowania tego peptydu przez geny strukturalne [55, 57, 58]. Regulacyjna funkcja jonów metali ciężkich w biosyntezie fitochelatyn, może się przejawiać wpływem na aktywność enzymów uczestniczących w wytwarzaniu prekursora tych metalopeptydów — glutationu [62, 81].

## V. Homo-fitochelatyny

Wytwarzanie peptydów wiążących jony  $\text{Cd}^{2+}$ , podobnych, lecz nie identycznych z fitochelatynami, zaobserwowano w obecności jonów kadmu w tkankach roślin niektórych gatunków rzędu *Fabales* (np. fasoli, soi, koniczyny). Okazało się, że znalezione peptydy są homologami fitochelatyn, a prekursorem ich syntezy jest nie glutation, lecz jego homolog zwany homo-glutationem (h-GSH) [60]. Po raz pierwszy jego obecność w roślinach stwierdzono w 1963 roku [83], ale wobec nieznamości budowy chemicznej, otrzymał on wówczas nazwę faseotion (izolowany z roślin fasoli związek bogaty w siarkę).

Tabela 1

Fitochelatyny roślin wyższych — masa cząsteczkowa, skład aminokwasowy i struktura łańcucha peptydowego

% reszt aminokwasowych	<i>Datura innoxia</i> [55]	<i>Rauvolfia serpentina</i> [59]	<i>Solanum tuberosum</i> [80]	<i>Cryptotaenia canad.</i> [80]
Cys	39.5	44.4	42.8	39.5
Glu	41.9	44.4	42.9	43.0
Gly	18.5	11.2	11.4	12.6
masa cząsteczkowa /D/ Glu/Cys/Gly	600—800 2.3/2.1/1.0	3600 4/4/1	4000 3.8/3.8/1.0	3300 3.4/3.2/1.0
struktura peptydu	(Glu-Cys) <sub>2</sub> Gly-(Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly	(Glu-Cys) <sub>4</sub> Gly	(Glu-Cys) <sub>4</sub> Gly	(Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly

Homoglutation jest trójpeptydem złożonym z L-glutaminianu i L-cysteiny połączonych, podobnie jak w GSH, wiązaniem  $\gamma$ -karboksamidowym, lecz w odróżnieniu od GSH, terminalnym aminokwasem w jego cząsteczce jest  $\beta$ -alanina. (Ryc. 1B). Ogólny wzór homo-fitochelatyn, pochodnych homo-glutationu, ma postać  $(\gamma\text{-glu-cys})_n\beta\text{-ala}$ , gdzie  $n = 2-7$ .

Występowanie w homo-fitochelatynach wiązań  $\gamma$ -karboksamidowych, oraz obecność  $\beta$ -alaniny (dla której nie istnieje kodujący triplet na m-RNA) przemawiają za tym, że homo-fitochelatyny nie mogą być syntezowane *de novo* na drodze ekspresji genów strukturalnych. Synteza tych metalopeptydów przebiega równoległe ze zużyciem komórkowego h-GSH [16, 60].

Nie wszystkie rośliny z rzędu *Fabales* mają zdolność wytwarzania homo-fitochelatyn, wiele z nich wytwarza fitochelatyny. Okazało się, że rodzaj prekursora obecnego w komórkach, determinuje tworzenie fito- czy homo-fitochelatyn. Rośliny fasoli, soi i koniczyny, zawierają w komórkach tylko homo-glutation i syntezują tylko homo-fitochelatyny. Inne pokrewne rośliny, zawierające tylko GSH, tworzą wyłącznie fitochelatyny, a te, u których obecny jest GSH i h-GSH, wytwarzają oba rodzaje peptydów wiążących metale [60].

Homo-fitochelatyny, podobnie jak fitochelatyny, dzięki zdolności wiązania jonów metali, uczestniczą w detoksykacji organizmów roślinnych rosnących w środowiskach skażonych metalami ciężkimi. Pełnią również rolę w prawidłowej gospodarce mikroelementami, unieruchamiając jony w warunkach wzrostu ich wewnątrzkomórkowego stężenia, lub uwalniając je z metalopeptydów dla potrzeb komórki [60].

## VI. Uwagi końcowe

Metalotioneiny, czyli proteiny wiążące metale ciężkie, występują powszechnie w organizmach zwierząt. Dotąd również nie zakwestionowano ich obecności w komórkach mikroorganizmów roślinnych.

Rośliny wyższe wytwarzają peptydy wiążące metale ciężkie, które są funkcjonalnymi analogami metalotionein zwierzęcych, ale znacznie różnią się od nich sposobem powstawania i budową. Opisane metalotioneiny czy „metallothionein-like complexes” u roślin wyższych, po ponownych badaniach, okazały się fitochelatynami lub homo-fitochelatynami.

Nie można jednak chyba zupełnie popierać poglądu niektórych autorów, że organizmy roślinne, począwszy od jednokomórkowych glonów aż do roślin okrytonasiennych, wytwarzają wyłącznie chelatyny w odpowiedzi na skażenie środowiska metalami ciężkimi. Przykładem mogą być komórki *Datura innoxia* w których, po działaniu jonów kadmu, stwierdzono dwa rodzaje metalopeptydów. [55]. Jeden z nich, wiążący ponad 80% pobranego przez komórki kadmu, jest fitochelatyną o masie cząsteczkowej 600—800 D i strukturze  $(\gamma\text{-glu-cys})_2\text{gly}$  —  $(\gamma\text{-glu-cys})_3\text{gly}$ . Jednak, około 15% wnikałającego do komórek *Datura innoxia* kadmu, wiąże się z polipeptydem o właściwościach metalotionein zwierzęcych.



Dwa rodzaje białek, wiążących kadm w komórkach *Datura innoxia*, pozwalają przypuszczać, że rośliny, w odpowiedzi na skażenie środowiska metalami ciężkimi, mogą wytwarzać różne rodzaje kompleksów metaloproteinowych.

Również, stwierdzonego w korzeniach *Agrostis gigantea* [84] białka wiążące kadm, nie można zaliczyć ani do połączeń o budowie chelatyn, ani do metalotionein. Być może, kompleksy metalobiałkowe traw, posiadają odmienne właściwości od tych, jakie charakteryzują tego rodzaju połączenia u innych roślin jednoliściennych czy dwuliściennych. Byłoby to podstawą do przypuszczeń, że rodzaje tworzonych kompleksów zależą również od gatunku rośliny.

Opracowanie wykonano w ramach programu CPBP 05.02.

Artykuł otrzymano 30 marca 1988 r  
Zaakceptowano do druku 13 września 1988 r

## PIŚMIENNICTWO

1. Bradshaw A. D., (1984), w *Origins and Development of Adaptation* (red. Evered D., Collins G. M.), str. 4—19, Pitman, London.
2. Antonovics J., Bradshaw A. D., Turner R. G., (1971), *Adv. Ecol. Res.*, **7**, 1—85.
3. Baker A. J. M., (1978), *New Phytol.*, **80**, 635—642.
4. Turner R. G., (1970), *New Phytol.*, **69**, 725—731.
5. Poulter A., Collin H. A., Thurman D. A., Hardwick K., (1985), *Plant Science*, **42**, 61—66.
6. Mathys W., (1977), *Physiol. Plant.*, **40**, 130—136.
7. Brookes A., Collins J. C., Thurman D. A., (1981), *J. Plant Nutr.*, **3**, 695—705.
8. Godbold D. L., Horst W. J., Collins J. C., Thurman D. A., Marschner H., (1984), *J. Plant Physiol.*, **116**, 59—69.
9. Wainwright S. J., Woolhouse H. H. W., (1975), w *The Ecology of Resource Degradation and Renewal* (red. Chadwick M. J., Goodman G. T.), str. 231—259, Blackwell, Oxford.
10. Brooks R. R., Shaw S., Marfil A. A., (1981), *Physiol. Plant.*, **51**, 167—170.
11. Kishinami I., Widholm J. M., (1987), *Plant Cell Physiol.*, **28**, 203—210.
12. Reilly C., (1972), *Z. Pflanzenphysiol.*, **66**, 294—296.
13. Tukendorf A., Łyszcz S., Baszyński T., (1984), *J. Plant Physiol.*, **115**, 351—360.
14. Tukendorf A., Baszyński T., (1985), *J. Plant Physiol.*, **120**, 57—63.
15. Tukendorf A., (1987), *J. Plant Physiol.*, **130**, 201—209.
16. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 439—443.
17. Olafson R. W., Loya S., Sim R. G., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1495—1503.
18. Weser U., Hartmann H. J., Fretzdorff A., Strobel G. J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **493**, 465—477.
19. Lerch K., (1980), *Nature*, **284**, 368—370.
20. Beltramini M., Lerch K., (1981), *FEBS Lett.*, **127**, 201—203.
21. Rauser W. E., Curvetto N. R., (1980), *Nature*, **287**, 563—564.
22. Margoshes M., Vallee B. L., (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813—4814.
23. Kāgi J. H. R., Himmelhoch S. R., Whanger P. D., Bethune J. L., Vallee B. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3537—3542.
24. Kojima Y., Berger C., Vallee B. L., Kāgi J. H. R., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3413—3417.

25. K ägi J., Coombs T.L., Overnell J., Webb M., (1981), *Nature*, **292**, 495—496.
26. Karin M., (1985), **41**, 9—10.
27. George S.G., Carpeno E., Coombs T.L., Overnell J., Youngson A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **580**, 225—233.
28. Lerch K., Ammer D., Olafson R.W., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2420—2426.
29. Pulido P., K ägi J.H.R., Vallee B.L., (1966), *Biochemistry*, **5**, 1768—1777.
30. Winge D.R., Premakumar R., Rajagopalan K.V., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 242—252.
31. Huang I.-Y., Yoshida A., Tsunoo H., Nakajima H., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8217—8221.
32. Failla M.L., Cousins R.J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **538**, 435—444.
33. Etzel K.R., Shapiro S.G., Cousins R.J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1120—1126.
34. Karin M., Herschman H.R., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 395—401.
35. Hamer D.H., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 913—951.
36. Durnam D.M., Hoffman R.L., Quaife C.J., Benditt E.P., Chen H.Y., Brinster R.L., Palmiter R.D., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1053—1056.
37. Dohi Y., Ohba K., Yoneyama Y., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **745**, 50—60.
38. Clubb R.W., Lords J.L., Gaufin A.R., (1975), *J. Insect. Physiol.*, **21**, 53—60.
39. Stone H., Overnell J., (1985), *Comp. Biochem. Physiol.*, **80**, C, 9—14.
40. Meisch H.V., Beckmann I., Schmitt J.A., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **745**, 259—266.
41. Zanetti M., De Bernard B., Jontell M., Linde A., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **113**, 541—545.
42. Meisch H.U., Scholl A.R., Schmitt J.A., (1981), *Z. Naturforsch.*, **36**, C, 765—771.
43. Rauser W.E. (1984), *Plant Sci. Lett.*, **33**, 239—247.
44. Rauser W.E., (1984), *J. Plant Physiol.*, **115**, 143—152.
45. Rauser W.E., (1984), *Plant Physiol.*, **74**, 1025—1029.
46. Rauser W.E., Glover J., (1983), *Can. J. Bot.*, **62**, 1645—1650.
47. Bartolf M., Brennan E., Price C.A., (1980), *Plant Physiol.*, **66**, 438—441.
48. Weigel H.J., J äger H.J., (1980), *Plant Physiol.*, **65**, 480—482.
49. Weigel H.J., J äger H.J., (1980), *Z. Pflanzenphysiol.*, **97**, 103—113.
50. Casterline J.L., Barnett M.N., (1982), *Plant Physiol.*, **69**, 1004—1007.
51. Lolkema P.C., Donker M.H., Schouten A.J., Ernst W.H.O., (1984), *Planta*, **162**, 174—179.
52. Wagner G.J., Trotter M.M., (1982), *Plant Physiol.*, **69**, 804—809.
53. Kaneta M., Hikichi H., Endo S., Sugiyama N., (1983), *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 417—418.
54. Wagner G.J., (1984), *Plant Physiol.*, **76**, 797—805.
55. Robinson N.J., Jackson P.J., (1986), *Physiol. Plant.*, **67**, 499—506.
56. Lue-Kim H., Rauser W.E., (1986), *Plant Physiol.*, **81**, 896—900.
57. Jackson P.J., Unkefer C.J., Doolen J.A., Watt K., Robinson N.J., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6619—6623.
58. Grill E., Zenk M.H., (1985), *Naturwissenschaften*, **72**, 432—433.
59. Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H., (1985), *Science*, **230**, 674—676.
60. Grill E., Gekeler W., Winnacker E.L., Zenk M.H., (1986), *FEBS Lett.*, **205**, 47—50.
61. Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H., (1986), *FEBS Lett.*, **197**, 115—120.
62. Rauser W.E., (1987), *Plant Science*, **51**, 171—175.
63. Law M.Y., Halliwell B., (1986), *Plant Science*, **43**, 185—191.
64. Klapheck S., Latus C., Bergmann L., (1987), *J. Plant. Physiol.*, **131**, 123—131.
65. Macnicol P.K., (1987), *Plant Science*, **53**, 229—235.
66. Kalt-Torres W., Burke J.J., Anderson J.M., (1984), *Physiol. Plant.*, **61**, 271—278.
67. Bielawski W., Joy K.W., (1986), *Phytochemistry*, **25**, 2261—2265.

68. Breaux E.J., Patanella J.E., Sanders E.F., (1987), *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 474—478.
69. Rennenberg H., (1982), *Phytochemistry*, **21**, 2771—2781.
70. Rennenberg H., Schmitz K., Bergmann L., (1979), *Planta*, **147**, 57—62.
71. Bonas U., Schmitz K., Rennenberg H., Bergmann L., (1982), *Planta*, **155**, 82—88.
72. Macnicol P.K., Bergmann L., (1984), *Plant Sci. Lett.*, **36**, 219—223.
73. Kondo N., Imai K., Isobe M., Goto T., (1984), *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3869—3872.
74. Kondo N., Isobe M., Imai K., Goto T., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 71—83.
75. Jackson P.J., Roth E.J., McClure P.R., Naranjo C. M., (1984), *Plant Physiol.*, **75**, 914—918.
76. Steffens J.C., Hunt D.F., Williams B.G., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 13879—13882.
77. Huang B., Hatch E., Goldsbrough P.B., (1987), *Plant Science*, **52**, 211—221.
78. Fujita M., (1985), *Plant Cell Physiol.*, **26**, 295—300.
79. Fujita M., Kawanishi T., (1986), *Plant Cell Physiol.*, **27** 1317—1325.
80. Fujita M., Kawanishi T., (1987), *Plant Cell Physiol.*, **28**, 379—382.
81. Robinson N.J., Thurman D.A., (1986), *Planta*, **169**, 192—197.
82. Robinson N. J., Thurman D. A., (1986), *Proc. R. Soc. Lond.*, **B 227**, 493—501.
83. Carnegie P.R., (1963), *Biochem. J.*, **89**, 471—478.
84. Rauser W. E., Hunziker P. E., Kägi J. H. R., (1986), *Plant Science*, **45**, 105—109.



68. ...  
 69. ...  
 70. ...  
 71. ...  
 72. ...  
 73. ...  
 74. ...  
 75. ...  
 76. ...  
 77. ...  
 78. ...  
 79. ...  
 80. ...  
 81. ...  
 82. ...  
 83. ...  
 84. ...

KRYSTYNA JANAS\*

## **Regulacja aktywności amoniakolizy L-fenylalaniny i poziomu czerwonych pigmentów w roślinach przez kwas 1-amino-2-fenyletylofosfoniowy**

**Control of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and red pigments level in higher plants by 1-amino-2-phenylethylphosphonic acid**

### *Spis treści*

- I. Wstęp
- II. Wpływ PheP na aktywność PAL *in vitro*
- III. Wpływ PheP na aktywność PAL *in vivo*
  - III-1. Okolodobowe zmiany aktywności PAL
  - III-2. Poziom antocyjanów i endogennej fenylalaniny
- IV. Uwagi końcowe

### *Contents*

- I. Introduction
- II. Effects of PheP on PAL activity *in vitro*
- III. Effects of PheP on activity *in vivo*
  - III-1. Circadian rhythmicity of PAL
  - III-2. Levels of anthocyanins and endogenous phenylalanine
- IV. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: PAL — amoniakolizy L-fenylalaniny, AOPP — kwas L- $\alpha$ -aminooksy- $\beta$ -fenylpropionowy, Phe — L-fenylalanina, PheP — kwas 1-amino-2-fenyletylofosfoniowy

## **I. Wstęp**

Amoniakolizy L-fenylalaniny (PAL; EC 4.3.1.5) jest enzymem zajmującym centralną pozycję w biosyntezie związków fenylpropanowych i ich pochodnych, m.in. lignin. Związki te zaliczamy do kategorii substancji zwanych metabolitami wtórnymi, chociaż wiele z nich (np. fitohormony, fitoaleksyny, i inne)

---

\* Dr, Pracownia Regulatorów Wzrostu Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

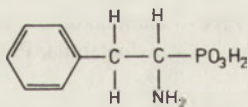
nie odgrywa roli drugorzędnej, zwłaszcza w procesach regulacyjnych [6]. PAL jest ogniwem łączącym przemiany podstawowe feniloalaniny z metabolizmem wtórnym. Enzym ten katalizuje reakcje dezaminacji Phe do kwasu trans-cynamonowego z wydzieleniem amoniaku.

W związku z dużym znaczeniem fizjologicznym PAL, enzym ten jest intensywnie badany zarówno przez biochemików jak i fizjologów, tak w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Badania prowadzone *in vitro* mają na celu głównie rozszyfrowanie struktury enzymu, poznanie aktywnych centrów katalitycznych oraz mechanizmów współdziałania podjednostek strukturalnych w ramach natywnej molekuly, złożonej na ogół z 4 podjednostek [5]. W analizach tych duży postęp zanotowano dzięki zastosowaniu mniej lub bardziej wybiórczych inhibitorów aktywności enzymu, takich, jak np. kwas L- $\alpha$ -aminooksy- $\beta$ -fenylopropionowy (AOPP). W 1977 roku Amrhein i Goedecke wykazali wpływ AOPP, hydroksyaminowego analogu Phe na aktywność PAL *in vitro* i *in vivo*. Stwierdzili oni, iż związek ten jest kompetycyjnym inhibitorem PAL w ekstraktach z *Rhodotorula glutinis* oraz w hypokotylach gryki, *Fagopyrum esculentum* Moench. [1].

Badania nad aktywnością PAL *in vivo* koncentrują się głównie na poznaniu mechanizmów endogennej regulacji aktywności enzymu przez takie czynniki jak światło, fotoperiod, temperatura, fitohormony, a także inhibitory wzrostu oraz endogenne białkowe inhibitory PAL [11]. W tym ostatnim przypadku znów duże usługi oddaje technika wybiórczych, syntetycznych inhibitorów enzymu jak AOPP.

Duże znaczenie fizjologiczne PAL powoduje, iż syntetyzuje się substancje o działaniu inhibitorowym lub stymulatorowym dla PAL. Szczególnie istotna jest synteza inhibitorów kompetycyjnych enzymu. Jednym z takich inhibitorów jest wzmiankowany już L-AOPP, analog strukturalny L-Phe, który w zakresie stężeń od  $10^{-8}$  do  $10^{-7}$  M kompetycyjnie hamuje aktywność PAL *in vitro* [1].

W latach 70-dziesiątych został zsyntetyzowany inny analog strukturalny Phe, kwas 1-amino-2-fenyletylofosfoniowy (PheP)\*



Wzór I. Kwas 1-amino-2-fenyletylofosfoniowy (PheP).

D, L-PheP jest inhibitorem kompetycyjnym syntetazy feniloalanylo-tRNA ( $K_i = 17 \mu\text{M}$ ), z kasztanowca zwyczajnego (*Aeculus hippocastanum* L.) i kaszta-

\* W roku 1981 grupa chemików z Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej kierowana przez prof. Przemysława Mastalera opracowała oryginalną metodę syntezy szeregu fosfonowych i fosfoniowych pochodnych aminokwasów w tym również analogi L- i D-Phe, między innymi PheP (I). Substancja ta została również zsyntetyzowana w laboratoriach firmy Ciba-Geigy.



nowca drobnokwiatowego (*A. parviflora* L.) [3]. Zadziwiająco, że inne syntetazy aminoacylo-tRNA z *A. hippocastanum* nie są wrażliwe na fosfoniowe analogi ich naturalnych substratów aminokwasowych. Stwierdzono też, iż PheP w zależności od stężenia wpływa stymulująco lub hamująco na kinazę pirogronianową z mięśni królika [3].

D, L-PheP powoduje silny wzrost aktywności rybonukleazy (RNazy) w roślinie wodnej hodowanej w warunkach *in vitro*, *Spirodela oligorrhiza* (Kurz) Hegelm., przy czym pojawia się RNaza o MW około 60 000, która nie występuje w roślinach kontrolnych [17].

PheP w stężeniach wyższych  $10^{-3}$  M działa hamująco na wzrost *S. oligorrhiza* i powoduje zmiany morfologiczne. Stare człony pędowe stają się ciemnozielone w porównaniu z kontrolnymi, podczas gdy młode są jasnozielone. Ponieważ nowe człony pędowe nie oddzielają się od matecznych, rośliny tworzą „grona” (zlepki: ang. clusters) złożone z wielu potomnych członów pędowych. PheP w stężeniach niższych słabo wpływa na wzrost roślin [12, 14].

W siewkach soi (*Glycine max.* L. Merrill cv. Harosoy 63) porażonych zoosporami zjadliwego szczepu *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (*Pmg 1*) L PheP obniża zawartość gliceoliny (jest to fitoaleksyna, która gromadzi się w siewkach soi, po porażeniu fitopatogenami np. grzybami). PheP nie jest toksyczna ani dla siewek soi ani zoosor *P. megasperma* [16].

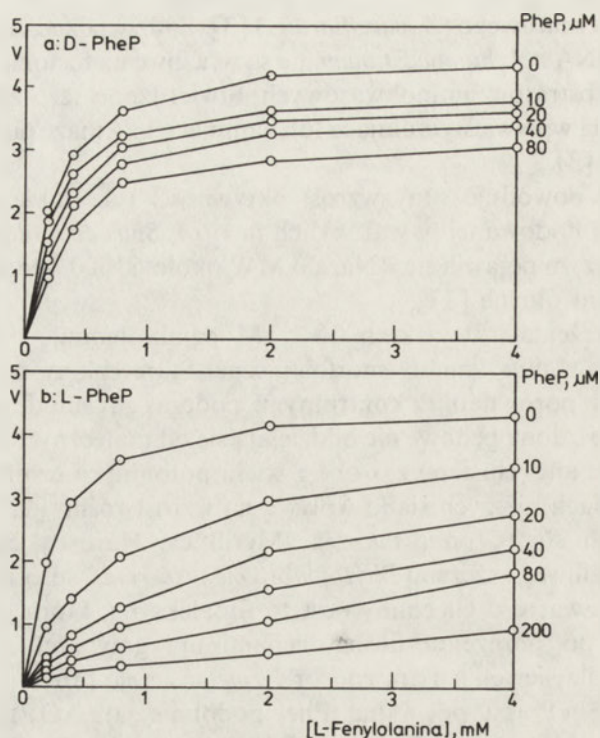
Ponieważ PheP jest pochodną Phe, podobnie jak AOPP, nasunęło się przypuszczenie, iż PheP może działać na PAL jako jej kompetycyjny inhibitor. O wpływie tej substancji na aktywność PAL *in vitro* będzie mowa w rozdziale II.

## II. Wpływ PheP na aktywność PAL *in vitro*

W badaniach wpływu PheP na aktywność PAL *in vitro* używano ekstraktów z bulw ziemniaka pokrojonych w cienkie plastry i hodowanych na świetle białym [7]. Stwierdzono, iż forma lewoskrętna PheP jest bardziej efektywna niż prawoskrętna. Racemat (D, L)-PheP hamuje aktywność PAL pośrednio między formą D-i L. Podobne rezultaty nad wpływem różnych form optycznych PheP na aktywność PAL z 6-dniowych hypokotyli *Fagopyrum esculentum* Moench, naświetlanych światłem białym, otrzymał L a b e r [14]. D- i L-PheP hamują również aktywność PAL *in vitro* w nieoczyszczonych homogenatach z korzeni soi porażonych *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* (*Pmg 1*) [16].

D- i L-PheP mogą działać zarówno jako kompetycyjne, jak i jako niekompetycyjne inhibitory PAL, w zależności od stosunku stężeń L-Phe do PheP i od stężenia PheP (przy stałym stężeniu L-Phe). W stężeniach L.Phe rzędu  $10^{-3}$  M, PheP w stężeniu  $10^{-5}$  M jest inhibitorem kompetycyjnym PAL [9].

W zależności od stężenia PheP, krzywe obrazujące szybkość reakcji enzymatycznej ( $v$ ) do stężenia substratu ( $s$ ) są wygięte w górę, co wskazuje, iż PAL nie stosuje się do praw kinetyki enzymatycznej opisaną przez Michaelisa-Menten



Ryc. 1 Krzywa szybkości reakcji enzymatycznej ( $v$ ) do stężenia substratu ( $I$ ), uzyskana w typowych doświadczeniach nad zahamowaniem aktywności PAL przed D- (a) i L- (b) enancjomery PheP.

Tabela 1

Poziomy  $K_i$  dla D-, L-, D,L-PheP

Enancjomer PheP	Wartość $K_i$	
	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Fagopyrum esculentum</i>
D-	$3,3 \times 10^{-5}$ M	$11,6 \times 10^{-5}$ M
L-	$6,5 \times 10^{-5}$ M	$1,5 \times 10^{-5}$ M
D,L- (racemat)	$1,6 \times 10^{-5}$ M	$2,6 \times 10^{-5}$ M

PAL wyekstrahowano z bulw ziemniaka (*Solanum tuberosum*) pociętych na cienkie plastry i hodowanych na świetle białym [9] oraz hypokotyli gryki (*Fagopyrum esculentum*) [14].

(Ryc. 1) [15, 9]. W pewnym jednak ograniczonym zakresie stężeń można PAL traktować tak, jak gdyby był to enzym typu „Michaelisowskiego” i wyliczyć przybliżoną wartość  $K_i$ . Wartość  $K_i$  dla PAL z roślin dwóch gatunków przedstawiono w Tabeli 1.

D, L-PheP hamuje również aktywność PAL *in vitro* i z innych gatunków roślin, np. *Spirodela oligorrhiza*. Efektywność D, L-PheP zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia inhibitora [12].

### III. Wpływ PheP na aktywność PAL *in vivo*

#### III-1. Okołodobowe zmiany aktywności PAL

Badania wpływu PheP na aktywność PAL *in vivo* w *S. oligorrhiza* wykazały, iż enzym ten podlega cyklicznym 48-godz. zmianom. W obecności PheP już po pierwszej dobie obserwuje się wzrost aktywności PAL oraz zniesienie endogennej fluktuacji aktywności tego enzymu [13]. Przy czym wzrost oraz czas utrzymywania się wyższej aktywności PAL zależą od stężenia podanego inhibitora oraz od tego, czy zastosowano jego D-, czy L- enancjomer (gdy rośliny rosną w obecności D, L-PheP w stężeniu  $10^{-4}$  M stymulacja aktywności zanika po 4 dniach hodowli) [12].

W siewkach szarłatu, *Amaranthus caudatus* L., etiolowanych i wzbudzonych światłem białym stwierdzono bardzo wyraźną fluktuację aktywności PAL [4]. Odpowiednie analizy wykazały, że fluktuacje aktywności PAL występują również w 3-dniowych siewkach szarłatu po indukcji światłem białym, przy czym D, L-PheP silnie podwyższa aktywność enzymu w ciemności i na świetle (dane własne, nie publikowane).

#### III-2. Poziom antocyjanów i endogennej Phe

PAL zapoczątkowuje ciąg przemian prowadzących od L-Phe do związków fenolowych o szkielecie fenylopropanowym  $C_6 C_3$ , takich jak garbniki, ligniny, flawonoidy (w tym m. innymi antocyjany oraz betalainy, w skład których wchodzi amarantyna). Specyficzna interferencja PheP z PAL *in vivo* prowadzi do zmniejszenia poziomu związków fenylopropanoidowych, m. innymi antocy-

Tabela 2

Poziom fenyloalaniny w siewkach i liściach różnych gatunków roślin po 24-h inkubacji na roztworze D, L-PheP, 1 mM [14]

Gatunek	Zawartość fenyloalaniny ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ św. masy)	
	- PheP	+ PheP
liście		
szpinak	0,26	4,01
pszenica	0,21	1,35
kukurydza	0,32	1,55
pomidor	0,15	2,80
heban	0,85	1,73
całe rośliny		
gryka	0,03	1,33
fasola	1,11	2,92
szarłat <sup>1</sup>	0,09	0,67
<i>S. oligorrhiza</i> <sup>1</sup>	0,11	0,30

<sup>1</sup> dane własne, nie publikowane



janów i innych flawonoidów oraz do wzrostu Phe występującej w roślinach. PheP powoduje obniżenie poziomu antocyjanów w siewkach roślin różnych gatunków jak np. w hypokotylach gryki (*Fagopyrum esculentum* L.), kapusty czerwonej (*Brassica oleracea* var. *capitata*), kalarepy (*Brassica oleracea* var. *caulo-rapa*) [12, 14] oraz w znacznie słabszym stopniu następuje obniżenie poziomu amarantyny w siewkach szarlatu (*Amaranthus caudatus* L.). Obniżenie poziomu antocyjanów jest współzależne ze stopniem zdolności do hamowania aktywności PAL *in vitro* w siewkach kalarepy [14].

D, L-PheP powoduje silny wzrost poziomu wolnej fenyloalaniny w liściach pomidora, szpinaku, pszenicy, kukurydzy oraz hebana [14] i siewkach roślin kilku gatunków jak np. gryki, fasoli [14], szarlatu oraz *Spirodela oligorrhiza* [dane własne, nie publikowane] (Tabela 2).

#### IV. Uwagi końcowe

PheP powoduje „superindukcję”, tj. kilkakrotny wzrost aktywności PAL *in vivo*, towarzyszy temu silne obniżenie aktywności enzymu *in vitro*. Wyjątek stanowią tylko siewki kapusty czerwonej, w której PheP nie powoduje wzrostu aktywności PAL *in vivo*, a przeciwnie — obserwuje się obniżenie aktywności enzymu. W siewkach tych stosunkowo słabemu zahamowaniu aktywności PAL towarzyszy znacznie silniejszy spadek zawartości antocyjanów [12].

Dane uzyskane w mojej pracowni zasadniczo podobne są do tych, które zostały stwierdzone przez Labera. Na podstawie spadku antocyjanów z jednoczesnym silnym podwyższeniem zawartości Phe wywnioskowano, iż PheP hamuje aktywność PAL *in vivo* [14]. Jeżeli słuszne jest, iż od aktywności PAL zależy poziom wolnej Phe i odwrotnie to powyższe wyniki są pozornie sprzeczne. Wydaje się możliwe, że PheP hamuje aktywność PAL *in vivo* tworząc labilny kompleks, który rozpada się podczas ekstrakcji tkanek, w warunkach *in vitro*. Założenie o tworzeniu się labilnego, łatwo rozpadającego się kompleksu mogłaby wyjaśnić zjawisko „superindukcji”. Za słusznością wyżej wymienionej hipotezy przemawia pośrednio spadek włączania  $^{14}\text{C}$  leucyny do białek *S. oligorrhiza* po 24 godz. hodowli w obecności D, L-PheP. Słuszność tego założenia można byłoby sprawdzić oznaczając aktywność PAL metodą *in vivo*, wprowadzając L-[ $3\text{-}^3\text{H}$ ] fenyloalaninę do całych komórek [2].

Artykuł otrzymano 14 czerwca 1988 r.

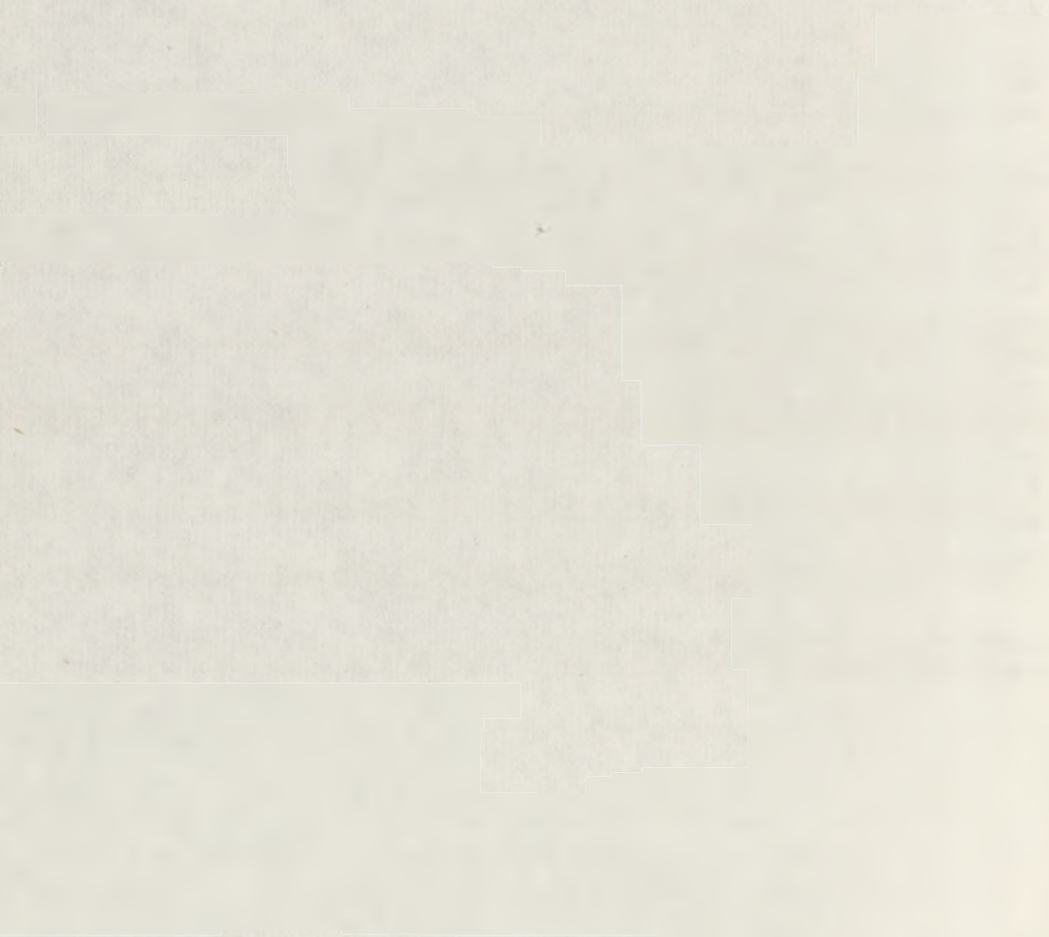
Zaakceptowano do druku 15 października 1988 r.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Amrhein N., Goedecke K. H., (1977), *Plant. Sci. Lett.*, **8**, 313—317.
2. Amrhein N., Goedecke K. H., Gerhard J., (1976), *Planta*, **131**, 33—40.
3. Anderson J. W., Fowden L., (1970), *Chem.-Biol. Interactions*, **2**, 53—55.
4. Bopp M., Meier F., (1973), *Portugal. Acta Biol. Ser. A*, **13**, 9—24.

5. Camm E., Towers G.H.N., (1973), *Phytochemistry*, **12**, 961—973
6. Creasy L.L., (1987), *Physiol. Plant.*, **71**, 389—392.
7. Havir E.A., Hanson K.R., (1968), *Biochemistry*, **7**, 1904—1914.
8. Izbicka-Dimitrijević E., Mastalerz P., Kochman M., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **114**, 565—568.
9. Janas K.M., Filipiak A., Kowalik J., Mastalerz P., Knypl J.S., (1985), *Acta Biochim. Pol.*, **32**, 131—143.
10. Janas K.M., Wolska M., Knypl J.S., (1985), *Acta Univ. Agricult. (Brno)*, **33**, 147—152.
11. Jones D.H., (1984), *Phytochem.*, **23**, 1349—1359.
12. Knypl J.S., Janas K.M., (1986), *Biol. Plant. (Praha)*, **28**, 91—94. 1986.
13. Knypl J.S., Janas K.M., Wolska M., (1985), *Physiol. Plant.*, **66**, 543—549.
14. Laber B., Kiltz H.H., Amrhein N., (1986), *Z. Naturforsch.*, **41c**, 49—55.
15. Nari J., Monttet C., Fouchier F., Ricard J., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 499—515.
16. Waldmueller T., Griesebach H., (1987), *Planta*, **1972**, 424—430.
17. Wilczek J.M., Filipiak A., Kowalik J., Mastalerz P., Knypl J.S., (1984),  
Streszczenia referatów, XX Zjazd PTBioch. (18—20.09.1984, Olsztyn), s. 105.

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. ...  
 51. ...  
 52. ...  
 53. ...  
 54. ...  
 55. ...  
 56. ...  
 57. ...  
 58. ...  
 59. ...  
 60. ...  
 61. ...  
 62. ...  
 63. ...  
 64. ...  
 65. ...  
 66. ...  
 67. ...  
 68. ...  
 69. ...  
 70. ...  
 71. ...  
 72. ...  
 73. ...  
 74. ...  
 75. ...  
 76. ...  
 77. ...  
 78. ...  
 79. ...  
 80. ...  
 81. ...  
 82. ...  
 83. ...  
 84. ...  
 85. ...  
 86. ...  
 87. ...  
 88. ...  
 89. ...  
 90. ...  
 91. ...  
 92. ...  
 93. ...  
 94. ...  
 95. ...  
 96. ...  
 97. ...  
 98. ...  
 99. ...  
 100. ...





## SŁOWNICTWO

### I. Słownictwo prenoli

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): "Prenol Nomenclature, Recommendations 1986), opublikowanego w Eur. J. Biochem., 167, 181—184, (1987) i w innych czasopismach.

Opracował Zdzisław A. Wojciechowski

Komisja Słownictwa Biochemicznego uprzejmie dziękuje profesorowi dr Osmanowi Achmatowiczowi za konsultację przy opracowaniu dokumentu

#### Spis treści

##### Wstęp

##### Nazwy ogólne

- Pr-1. Prenol
- Pr-2. Poliprenol
- Pr-3. Estry i ich pochodne
- Pr-4. Liczba reszt

##### Stereochemia

- Pr-5. Podwójne wiązania
- Pr-6. Kolejność przedrostków stereochemicznych
- Pr-7. Przedrostki wielokrotniające

##### Specyficzne związki

- Pr-8. Nazwy zwyczajowe
- Pr-9. Difosforan izopentenylu
- Pr-10. Relacja pomiędzy poliprenolami i izoprenoidami
- Pr-11. Hormony juvenilne
- Pr-12. Dolichole

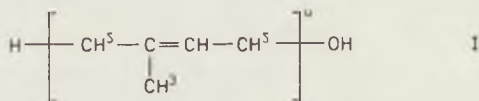
##### Wstęp

Aktualna praktyka w zakresie słownictwa prenoli w niewielkim tylko stopniu uwzględnia stereochemię tych związków. Komisja uznała więc za celowe dokonanie przeglądu istniejących zasad słownictwa i uzupełnienie ich zaleceniami co do sposobu określania stereochemii. Niektóre z tych zaleceń zostały już uwzględnione w nomenklaturze enzymów [1].

##### Nazwy ogólne

###### Pr-1. Prenol

Szeroko już obecnie używaną nazwę prenol (patrz m.in. [2, 3, 5, 6]) zaleca się dla związków o budowie przedstawionej wzorem I. Nazwa ta stanowi skrót określenia: alkohol izoprenoidowy (ang. *isoprenoid alcohol*) [2].



Atomy węgla numeruje się wzdłuż głównego łańcucha poczynając od C-1, t.j. od atomu węgla do którego dołączona jest grupa hydroksylowa (por. z regułą C-15.11 w [8]). Grupa metylowa związana z atomem C-3 zawiera atom C-3<sup>1</sup> a grupa metylowa przy C-7 zawiera atom C-7<sup>1</sup> itd.

U w a g a: Użycie wskaźnika liczbowego u góry odpowiada zaleceniu dla słownictwa tetrapiroli ujętemu regułą TP-2.1 [9]. Powtarzającą się jednostkę C<sub>5</sub>H<sub>8</sub> (ujęta we wzorze I w nawias) określa się jako jednostkę lub resztę izoprenową. Prenole i ich estry są prekursorami wielu różnych związków, w tym także terpenów i steroidów, u których znaczna część szkieletu węglowego pozostaje bez zmian. Związki te określa się jako izoprenoidy.

### Pr-2. Poliprenol

Poliprenole stanowią podgrupę w obrębie prenoli. Nazwę poliprenol, która jest już w powszechnym użyciu (np. [2]), zaleca się stosować do związków o budowie odpowiadającej wzorowi I, gdzie n wynosi więcej niż 4.

### Pr-3. Estry i ich pochodne

Powszechnie już stosowane nazwy difosforan prenylu (lub difosfoprenol) oraz difosforan poliprenyłu (lub difosfopoliprenol) zaleca się dla estrów I z kwasem difosforowym a także dla soli i anionów tych estrów. Zalecenie to jest zgodne z zasadami przyjętymi w słownictwie związków zawierających fosfor [7].

### Pr-4. Liczba reszt

Liczbę reszt izoprenowych w cząsteczce danego poliprenolu lub jego pochodnej, t.j. wartość n we wzorze I, wskazuje się za pomocą odpowiedniego przedrostka określającego krotność [10], który zastępuje mający ogólne znaczenie przedrostek poli- (patrz reguła Pr-2), np. heksaprenol, difosforan heptaprenyłu.

## Stereochemia

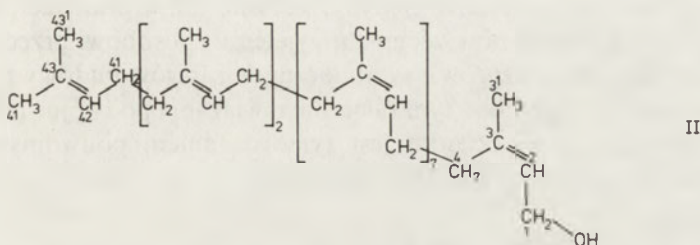
### Pr-5. Podwójne wiązania

Podwójne wiązania występujące w danej reszcie izoprenowej określa się jako *cis* lub *trans* w zależności od tego czy wokół tego wiązania główny łańcuch przyjmuje konfigurację *cis* czy *trans*. Resztę zawierającą wiązanie podwójne *cis* można nazwać resztą *cis* a resztę zawierającą wiązanie podwójne *trans* — resztą *trans*.

Oznaczenia *cis* lub *trans* odnoszą się do konfiguracji głównego łańcucha wokół wiązania podwójnego i dlatego, w odróżnieniu od oznaczeń *Z* i *E* [11], nie wpływają na nie żadne ewentualne podstawienia występujące w cząsteczce. Zalecenie powyższe nie wyklucza stosowania oznaczeń *Z* i *E*.

#### Pr-6. Kolejność przedrostków określających stereochemię

Resztę najbardziej oddaloną od grupy hydroksylowej określa się jako resztę  $\omega$  a oznaczenia stereochemiczne podaje w kolejności od reszty bezpośrednio sąsiadującej z resztą  $\omega$  do reszty zawierającej grupę hydroksylową, np. *ditrans, policis*-undekaprenol (II).



#### U w a g i:

1. W przypadku reszty  $\omega$  nie istnieją formy *cis* i *trans* o ile jedna z grup metylowych nie jest podstawiona. Oznaczenia stereochemiczne podaje się więc poczynając od reszty sąsiadującej z resztą  $\omega$ .

2. Nie zaleca się pomijania oznaczeń stereochemicznych gdyż może to prowadzić do wieloznaczności. Nazwa difosforan heptaprenyłu, którą stosowano w odniesieniu do występującego w bakteriach związku *all-trans* [12] mogła być myląca w odniesieniu do difosforanu *ditrans, policis*-heptaprenyłu wykrytego w brzozie i w innych roślinach wyższych [13]. Z kolei nazwę difosforan undekaprenyłu używano w odniesieniu do bakteryjnych związków *ditrans, policis*- [14] i użycie tej nazwy w odniesieniu do związku *tritrans, policis*-występującego w liściach roślin wyższych [15] mogło by prowadzić do nieporozumień.

3. Jakkolwiek w wyniku kolejnego przyłączania nowych reszt, z których każda może być resztą *cis* lub *trans*, powstawać mogą liczne stereoizomery (Rys.1), najbardziej rozpowszechnione prenole ograniczają się do czterech podstawowych grup (Ryc.2), t.j. do: I) *all-trans*-prenoli, II) *ditrans, policis*-prenoli, III) *tritrans, policis*-prenoli i IV) *all-cis*-prenoli. Występujące na Ryc. 2 literowe symbole W, T i C a także czwarty symbol S, stanowią wygodny zestaw służący do skrótowego oznaczania budowy poliprenoli (patrz Tablica 1).

W związkach grupy I *all-trans* oznacza, że wszystkie reszty, z wyjątkiem reszty  $\omega$ , znajdują się w konfiguracji *trans*. W związkach grup II i III reszty *trans* są zgrupowane w sąsiedztwie reszty  $\omega$ . Związki grupy IV są słabiej poznane lecz występują prawdopodobnie jako prekursorzy naturalnego kauczuku.



Tabela 1

Symbol	Znaczenie
W	reszta $\omega$
T	reszta <i>trans</i>
C	reszta <i>cis</i>
S	reszta nasycona (dihydro)

4. Zalecenie aby przedrostki określające stereochemię podawać w kolejności odwrotnej do odpowiednich lokantów jest zaleceniem przeciwnym wobec zaleceń przyjętych w innych przypadkach. O takim jego sformułowaniu zdecydowały jednak następujące względy: 1) jest ono już w praktyce powszechnie stosowane, 2) odpowiada powszechnie przyjętemu sposobowi przedstawiania z lewej strony ku prawej wzorów i symbolicznych zapisów budowy prenoli i ich difosforanów oraz 3) zgodnie z tym zaleceniem wiązania podwójne powstające w procesie biosyntezy na początku jest tym wiązaniem podwójnym, którego stereochemię określa się w pierwszej kolejności.

Przykłady:

Nazwa *all-trans-nonaprenol* oznacza występujący w roślinach tzw. solanensol — prenol zawierający dziewięć reszt izoprenowych, z których osiem jest resztami *trans* a dziewiąta jest resztą  $\omega$ .

#### Pr-7. Przedrostki zwielokrotniające

Przedrostek poli — można zastąpić odpowiednim przedrostkiem określającym krotność — np. występujący w bakteriach baktoprenol należy raczej określić jako *ditrans, oktacis-undekaprenol* niż jako *ditrans, policis-undekaprenol*. Przy stosowaniu się do tego zalecenia nie radzi się pomijać przedrostków określających ogólną liczbę reszt występujących w cząsteczce — nawet wtedy gdy utworzona nazwa zawiera w sobie nadmierną ilość informacji. Na przykład w cząsteczce *ditrans, oktacis-undekaprenolu*, t.j. prenolu zawierającego jedną resztę  $\omega$ , dwie reszty *trans* i osiem reszt *cis*, ogółem musi wystąpić jedenaście reszt.

#### Specyficzne związki

##### Pr-8. Nazwy zwyczajowe

Niektóre prenole krótkołańcuchowe mają swoje nazwy zwyczajowe. Na przykład difosforany prenoli zawierających od jednej do pięciu reszt izoprenowych mają nazwy zwyczajowe podane w Tablicy 2.

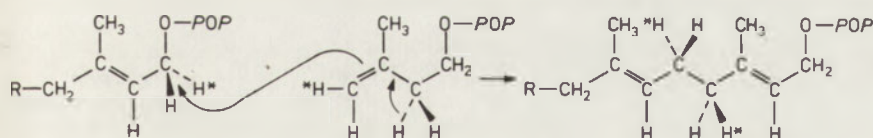
Nazwy takie jak difosforan dimetyloallilu (ściśle: difosforan 3,3-dimetyloallilu), difosforan geranylu i difosforan nerylu określają odpowiednie związki w sposób całkowicie jednoznaczny, bez konieczności podawania oznaczeń stereo-

Tabela 2

Liczba reszt	Stereochemia	Nazwa zwyczajowa
1	brak	difosforan dimetyloallilu
2	<i>trans</i> <i>cis</i>	difosforan geranylu difosforan nerylu
3	<i>2-trans, 6-trans</i> <i>2-cis, 6-trans</i> <i>2-trans, 6-cis</i> <i>2-cis, 6-cis</i>	difosforan farnezylu
4	<i>2-trans, 6-trans, 10-trans</i>  <i>2-cis, 6-trans, 10-trans</i>	difosforan geranylogeranylu difosforan geranylonerylu
5	<i>2-trans, 6-trans, 10-trans, 14-trans</i> <i>2-cis, 6-trans, 10-trans, 14-trans</i> <i>2-trans, 6-cis, 10-trans, 14-trans</i> <i>2-cis, 6-cis, 10-trans, 14-trans</i>	difosforan geranylofarnezylu

chemicznych. Nazwa dimetyloallil, która jest zwyczajową nazwą 3-metylobut-2-enylu, nie odpowiada zasadom przyjętym w [8] i jest niejednoznaczna gdy stosuje ją bez biochemicznego kontekstu.

Nazwa difosforan farnezylu obejmuje cztery stereoizomery  $C_{15}$ . Izomery te przyjęto określając jako *trans,trans*, *cis,trans*, *trans,cis*, i *cis,cis*, przy czym pierwsze oznaczenie odnosi się do C-2 a drugie do C-6 [16] — t.j. w odwrotnej kolejności niż przyjęto dla poliprenoli (patrz reguła Pr-6), co może być mylące. Zaleca się więc aby, dla uniknięcia ewentualnych nieporozumień, podawać odpowiednie lokanty — np. difosforan *2-cis,6-trans*-farnezylu (cząsteczka tego związku tworzy w wydłużającym się poliprenolu kraniec ω stając się *trans,cis*).

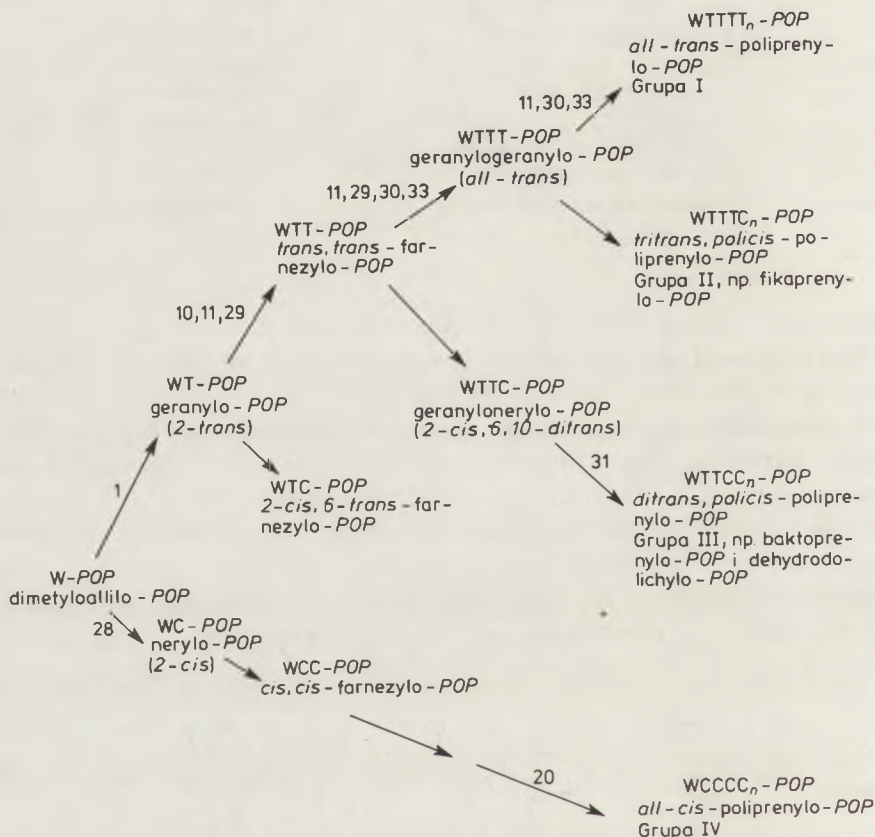


Ryc. 1. Etap wydłużania łańcucha podczas biosyntezy prenioli.

Dwie jednostki prenylowe  $C_{20}$  określa się jako geranylogeranyl i geranyloneryl. W jednostkach tych druga, licząc od atomu tlenu, reszta izoprenowa jest zawsze *trans*, tzn. obie omawiane jednostki są *6-trans*. Stosowanie wymienionych nazw zwyczajowych jest tak powszechne i tak silnie ugruntowane, że ich odrzucenie spowodowało by prawdopodobnie załamanie zalecanych zmian. Pozostałym związkom należy jednak nadawać nazwy stosownie do reguł

Pr-4 — Pr-7. Tak na przykład związek o stereochemii 2-*trans*, 6, 10-*dicis* należy nazwać difosforanem *dicis,trans*-tetraprenyłu.

Uwaga: Komisja uważa iż słownictwo zalecane dla poliprenoli (reguły Pr-4-Pr-7) mogłoby być bez szkody stosowane również w odniesieniu do związków  $C_{20}$  poprzez określenie ich jako tetraprenoli. Wyeliminowałoby to niezgodność polegającą na odwróceniu kolejności oznaczeń stereochemicznych dla związków o liczbie reszt izoprenowych mniejszej niż pięć.

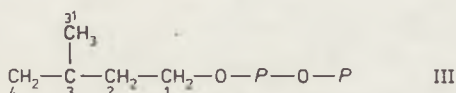


**Ryc. 2.** Stereochemia biosyntezy poliprenoli. Każda strzałka symbolizuje przekształcenie typu przedstawionego na Ryc. 1. Strzałki skierowane ku górze symbolizują przyłączenie *trans* reszty pochodzącej z difosforanu izopentenylu (patrz reguła Pr-9), strzałki skierowane do dołu symbolizują przyłączenie *cis*. Liczby arabskie przy strzałkach odpowiadają enzymom katalizującym dane reakcje wymienionym pod tą liczbą w grupie EC 2.5.1 w zalecanym nazewnictwie enzymów [1] — np. enzym EC 2.5.1.11 katalizuje przekształcenie geranylo-POP w *trans,trans*-farnezylo-POP. Grupy wymienione w kolumnie po prawej stronie odpowiadają głównym grupom poliprenoli podanym w uwadze 3 do reguły Pr-6. Tam gdzie podaje się lokanty, przedrostki wymienione są w kolejności odpowiadającej lokantom (reguła Pr-8) a nie w kolejności „od lewej do prawej” (reguła Pr-6). W skrótowych zapisach budowy W oznacza resztę  $\omega$ , T — resztę *trans* a C — resztę *cis*.



### Pr-9. Difosforan izopentenyłu

Difosforan izopentenyłu (III), t.j. difosforan 3-metylobut-3-en-1-olu (alkoholu izopentenyłowego), jest ważnym izomerem difosforanu dimetyloallilu. Stanowi on uniwersalną jednostkę budulcową izoprenoidów; difosforan prenyłu reagując z difosforanem izopentenyłu traci resztę difosforanową i wydłuża się o jedną resztę izoprenową (patrz Ryc. 1 i 2). Nazwę difosforan izopentenyłu należało by więc zachować.



U w a g i:

1. Grupa CH= alkoholu izopentenyłowego zawiera C-4 (patrz zalecenie C-13.11(b) w [8]). Jest to wygodne ponieważ C-4 difosforanu izopentenyłu staje się C-4 wydłużającej się w procesie biosyntezy cząsteczki prenolu (Ryc. 1).

2. Nazwę izopentenył zaleca się stosować tylko w biochemii. Nazwa ta nie odpowiada zasadom słownictwa chemicznego (patrz [8]) i jest niejednoznaczna gdy używa się jej w kontekście nie związanym z biochemią lub z prenolami. Nazwa izopentenył jest zwyczajowym określeniem 3-metylobut-3-enyłu.

### Pr-10. Relacja pomiędzy poliprenolami i izoprenoidami

Nazwy pochodnych izoprenoidów podaje Tablica 3.

Tablica 3

Liczba reszt	Prekursor prenolowy (np. w postaci difosforanu)	Klasa terpenoidów
1	alkohol dimetyloallilowy	hemiterpenoid
2	geraniol lub nerol	monoterpenoid
3	farnezoł	seskwiterpenoid
4	geranylogeraniol	diterpenoid
5	geranylofarnezoł	sesterpenoid
6	farnezoł <sup>a</sup>	triterpenoid <sup>a</sup>
8	geranylogeraniol <sup>b</sup>	tetraterpenoid (lub karotenoid <sup>b</sup> )
liczne		kaučuk ( <i>all-cis</i> ) gutaperka ( <i>all-trans</i> )

<sup>a</sup> Triterpenoidy powstają ze skwalenu, który z kolei jest wytwarzany z dwóch cząsteczek difosforanu farnezyłu.

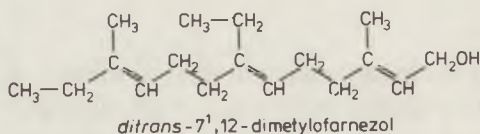
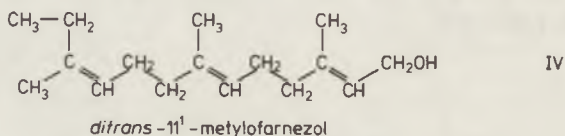
<sup>b</sup> Karotenoidy powstają z fitoenu, który z kolei jest wytwarzany z dwóch cząsteczek difosforanu geranylogeranyłu.

### Pr-11. Hormony juvenilne

Farnezoł jest prenolem, którego szkielet węglowy odpowiada szkieletowi najprostszego hormonu juvenilnego. Pozostałe związki z grupy hormonów

juwenilnych zawierają resztę etylową w miejsce grupy metylowej przy C-3 i (lub) przy C-7 i (lub) przy C-11. Można je więc uznać jako pochodne metylowe farnezolu, w których stereochemię reszty izoprenowej  $\omega$  podaje się (tam gdzie to konieczne) poprzez wskazanie podstawionej grupy metylowej.

Przykłady:



#### Pr-12. Dolichole

Dolichole są grupą pochodnych prenoli. Nazwę tą, aktualnie szeroko stosowaną (np. [2]), zaleca się dla związków o budowie określonej wzorem I, gdzie  $n$  jest większe niż 4 i gdzie reszta zawierająca grupę hydroksylową jest nasycona, t.j. dla 2,3-dihydropoliprenoli. Ponieważ dolichole są pochodnymi prenoli nie należy ich obejmować ogólną nazwą prenole o ile nie zostanie to wyraźnie zaznaczone.

*Opracowanie otrzymano 21 czerwca 1988 r.*

#### PIŚMIENNICTWO

1. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1984) *Enzyme nomenclature*, 1984, Academic Press, Orlando, Floryda.
2. Hemming, F. W., (1974) w *Biochemistry*, Series One, t. 4 (red. T.W. Goodwin) Butterworths, Londyn, str. 39—97.
3. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), *Nomenclature of quinones with isoprenoid side-chains. Recommendations*, 1973, *Eur. J. Biochem.*, **53**, 15—18 (1975), patrz także poz. [4], str. 154—157.  
Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa 1983, 231—237.
4. International Union of Biochemistry (1978) *Biochemical nomenclature and related documents*, The Biochemical Society, London.
5. Popják, G., Cornforth, J. W., (1960) *Adv. Enzymol.*, **22**, 281—335.
6. Holloway P. W., Popják, G., (1976) *Biochem. J.*, **104**, 57—68.
7. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Nomenclature of phosphorus-containing compounds of biochemical importance. Recommendations*, 1976, *Eur. J. Biochem.*, **79**, 1—9 (1977), patrz także poz. [4] str. 203—211.  
Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa 1983, 23—36.
8. International Union of Pure and Applied Chemistry (1979) *Nomenclature of organic chemistry*, Sections A-F and H (red. J. Rigaudy i S.P. Klesney) Pergamon Press, Oxford.

Nomenklatura Związków Organicznych, części A i B, PWN, Warszawa-Łódź 1987, części C i E, PWN, Warszawa-Łódź 1979, części D, PWN, Warszawa-Łódź 1981.

9. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of tetrapyrroles. Recommendations, 1978. *Eur. J. Biochem.*, **108**, 1—30 (1980).
10. Działy A-1 i A-2.5 w poz. [8] poszerzone przez IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNO). *Pure Appl. Chem.*, **58**, 1963-1969 (1986).
11. International Union of Pure and Applied Chemistry (1976). Stereochemistry, *Pure Appl. Chem.* **45**, 11—30 (1976), patrz także odn. [4], str. 1—5 oraz Dział E odn. [8].
12. Takahishi, I., Ogura, K., Seto, S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4539-4543.
13. Wellburn A.R., Hemming, F.W., (1966), *Nature Lond.*, **212**, 1364-1366.
14. Allen C.M., Keenan M.V., Sack, J., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 236-248.
15. Wellburn A.R., Stevenson J., Hemming F.W., Morton R.A., (1967), *Biochem. J.*, **102**, 313-324.
16. Bates R.B., Gale D.M., Gruner B.J., (1963), *J. Org. Chem.*, **28**, 1086-1089.



## II. Słownictwo retinoidów

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): "Nomenclature of Retinoids, Recommendations 1981" opublikowanego w Eur. J. Biochem., **129**, 1—5, (1982) i w innych czasopismach.

Opracował Zdzisław A. Wojciechowski

Komisja Słownictwa Biochemicznego uprzejmie dziękuje profesorowi dr Osmanowi Achmatowiczowi za konsultacje przy opracowaniu dokumentu

### Spis treści

#### Wstęp

#### Ret-1 Definicja klasy związków

##### 1.1 Witamina A

#### Ret-2 Związki o macierzystej stereochemii

##### 2.1 Retinol

##### 2.2 Retinal

##### 2.3 Kwas retinowy

#### Ret-3 Numerowanie atomów węgla

#### Ret-4 Modyfikacje związków o macierzystej stereochemii

##### 4.1 Węglowodór podstawowy

##### 4.2 Zamiana grupy funkcyjnej

##### 4.2.1 Pochodne węglowodoru podstawowego

##### 4.2.2 Pochodne retinalu

##### 4.2.3 Pochodne kwasu retinowego

##### 4.3 Zmiany stopnia uwodorowania

##### 4.4 Podstawione retinoidy

##### 4.5 *Seko* retinoidy

##### 4.6 *Nor* retinoidy

##### 4.7 *Retro* retinoidy

##### 4.8 Inne modyfikacje

#### Ret-5 Stereochemia

##### 5.1 Grupy chiralne

##### 5.2 Wiązania podwójne

Dodatek: Niektóre pokrewne terpenoidy zawierające mniej niż 20 atomów węgla  
Piśmiennictwo

### Wstęp

W 1912 r. Funk [1] zaproponował określenie terminem „witamina” niezbędnego dla życia czynnika wzrostowego występującego w pokarmie. Okazało się następnie, że takich czynników istnieje więcej i McCollum [2] podzielił je na dwie klasy: „rozpuszczalne w tłuszczach — A” i „rozpuszczalne w

wodzie—B”. Z kolei Drummond [3] określił wyróżnione przez McColluma klasy odpowiednio jako witaminę A i witaminę B oraz zaproponował, aby dalsze podobne czynniki nazywać witaminami C, D itd. W 1934 r. Wald [4] wyodrębnił ze zwierzęcej siatkówki związek, któremu nadał nazwę „retinen”. Morton [5] wysunął przypuszczenie, że związek ten jest aldehydem witaminy A i określił go jako retinaldehyd (lub retinal) [6]. Poprawną budowę chemiczną witaminy A wyjaśnił w 1931 r. Karrer [7] proponując nazwanie jej „akseroftolem” (niem. Axerophthol) [8] w oparciu o działanie zapobiegające chorobie oczu zwanej kseroftalemią. Drugą z witamin A, wyodrębnioną przez Mortona i współpracowników, nazwano witaminą A<sub>2</sub> [9].

W 1960 r. zostały ogłoszone przez IUPAC zalecenia słownictwa witamin [10]. W zaleceniach tych znalazły się nazwy trzech związków macierzystych, tj. retinolu, retinalu i kwasu retinowego a także ich 3-dehydro pochodnych. Poszerzona i poprawiona wersja tych zaleceń została ogłoszona przez Komisję IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (CBN) w 1965 r. [11]. W związku z opublikowaniem przez Komisję IUPAC Nomenklatury Chemii Ograniczonej (CNOG) i Komisję IUB Nomenklatury Biochemicznej (CBN) „Nazewnictwa Karotenoidów” [13] a także opublikowaniem przez CNOG Działu F (substancje naturalne i pokrewne związki) [14] „Nomenklatury Związków Organicznych” [15], Wspólna Komisja IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN) podjęła decyzję opracowania oddzielnego dokumentu poszerzającego rozdział M-1 w wymienionym wyżej opracowaniu z 1965 r. Poniższe zalecenia opracowano w oparciu o wstępny projekt przygotowany przez G.P. Mossa w porozumieniu z niektórymi badaczami aktywnie zajmującymi się retinoidami oraz w porozumieniu z CNOG.

## Zalecenia

### Ret-1. Definicja klasy związków

Retinoidy są klasą związków zawierających cztery jednostki izoprenoidowe połączone ze sobą w sposób „głowa-ogon”. Wszystkie retinoidy można formalnie wywieść od monocyklicznego związku macierzystego zawierającego pięć podwójnych wiązań węgiel-węgiel oraz grupę funkcyjną znajdującą się na końcu acyklicznego fragmentu cząsteczki. Dla uniknięcia sprzeczności z nazewnictwem stosowanym poprzednio nie określa się nazwą odpowiedniego węglowodoru macierzystego (patrz reguła Ret-4.1).

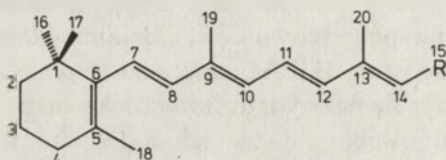
#### 1.1 Witamina A

Nazwa „witamina A” powinna być używana jako rodzajowe określenie tych retinoidów, które jakościowo wykazują aktywność biologiczną retinolu. Określenie to należy stosować w nazwach pochodnych takich jak: „aktywność witaminy A”, „niedobór witaminy A”, „antagonista witaminy A” [16].

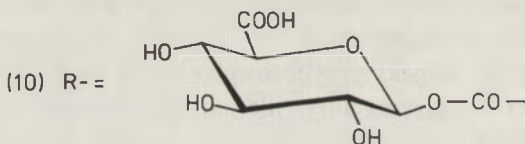
## Ret-2. Związki o macierzystej stereochemii

Przez macierzysty stereozwiązek rozumie się związek macierzysty, którego nazwa implikuje określoną stereochemię — w związku z czym nie ma potrzeby szczegółowo tej stereochemii określać.

We wzorach przedstawiających szkielety retinoidów wygodnie jest pomijać szczegółowe przedstawienie poszczególnych atomów C i H, tak jak podano poniżej:



- |  |   |
|--|---|
| (1) R = CH <sub>2</sub> OH                 | (6) R = CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>   |
| (2) R = CHO                                | (7) R = CH-NOH  |
| (3) R = CO <sub>2</sub> H                  | (8) R = CH-N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHNH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H |
| (4) R = CH <sub>3</sub>                    | (9) R = CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                           |
| (5) R = CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>3</sub> |   |



### 2.1. Retinol

Związek (1), tj. (2*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-3,7-dimetylo-9-(2,6,6-trimetylocykloheks-1-en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol<sup>1</sup>, znany także pod nazwami: witamina A, alkohol witaminy A, witamina A<sub>1</sub>, alkohol witaminy A<sub>1</sub>, akseroftol i akserol, należy określać jako retinol<sup>2</sup>.

### 2.2. Retinal

Związek (2), zwany również aldehydem witaminy A, aldehydem witaminy A<sub>1</sub>, retinenem lub retinenem<sub>1</sub>, należy określać jako retinal.

### 2.3. Kwas retinowy

Związek (3), znany również pod nazwami: tretinoina<sup>2</sup>, kwas witaminy A lub kwas witaminy A<sub>1</sub>, należy określać jako kwas retinowy.

<sup>1</sup> System numerowania atomów w przypadku podawania nazwy systematycznej jest odmienny od systemu opisanego wyżej (patrz reguła Ret-3).

<sup>2</sup> Nazwa zaakceptowana przez WHO



### Ret-3. Numerowanie atomów węgla

Podstawowy sposób numerowania atomów węgla pokazano na wzorach 1—9. Jest on zgodny z systemem przyjętym dla karotenoidów (patrz reguły Car-4 i Car-12.4 w [13]).

### Ret-4. Modyfikacje związków o macierzystej stereochemii

#### 4.1. Węglowodór podstawowy

Węglowodór (4), znany również jako akseroften, należy określać jako deoksyretinol<sup>3</sup>. Węglowodór ten nie powinien być traktowany jako macierzysty stereozwiązek dla rdzenia "retin-" ponieważ należałoby mu wtedy nadać nazwę "retinen" — co mogłoby prowadzić do nieporozumień gdyż nazwę tą stosowano poprzednio jako synonim nazwy "retinal" (patrz reguła Ret-2.2). Z kolei nazwa "retinan" nie byłaby właściwa ponieważ implikowałaby ona nasycony charakter tego węglowodoru (patrz reguła F-2.3 w [14]).

#### 4.2. Zmiana grupy funkcyjnej

**4.2.1.** Podstawienie węglowodoru podstawowego w pozycji 15 grupą funkcyjną zaznacza się stosując grupowe nazwy retinyl (R na wzorze oznacza CH<sub>2</sub>-) lub retinyliden (R oznacza CH=) przy czym zachowuje się numerację atomów węgla jak w węglowodorze podstawowym. Na przykład (5) przedstawia octan retinylu a (6) — retiniloaminę.

**4.2.2.** Pochodną retinalu można określać albo jako pochodną aldehydu (zgodnie z regułami C-842, C-922 lub C-982 [15]) albo jako związek podstawiony dwuwartościową grupą — retinylidenem (patrz reguła A-4.1 w [15]). Na przykład (7) przedstawia oksym retinalu a (8) — N<sup>6</sup>-retinylideno-L-lizynę.

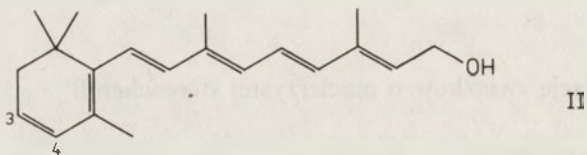
**4.2.3.** Pochodnym kwasu retinowego nadaje się nazwy tak jak pochodnym innych kwasów karboksylowych tj. zgodnie z regułami C-4.6 i C-403 [15]. Na przykład (9) przedstawia retinian etylu a (10) — kwas 1-O-retinoilo-β-D-glukopiranutronowy.

#### 4.3. Zmiany stopnia uwodorowania

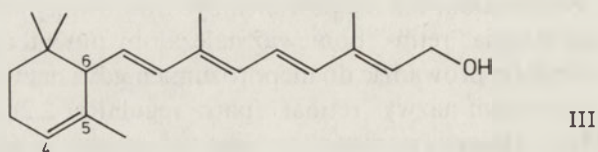
Retinoidom, które różnią się od odpowiednich, określonych regułą Ret-2 związków o macierzystej stereochemii stopniem uwodorowania, nadaje się nazwy stosując przedrostki „hydro” lub „dehydro” z równoczesnym podaniem lokantów wskazujących atomy węgla, przy których nastąpiło przyłączenie lub

<sup>3</sup> Przedrostek „deoksy” może być pisany łącznie lub oddzielany łącznikiem (patrz reguła C-16.11 [15]). W niniejszym opracowaniu jest on pisany łącznie i, ponieważ nie ma potrzeby podawania lokanta 15, przedrostek ten związany jest bezpośrednio z rdzeniem nazwy.

odłączenie atomów wodoru. Przedrostki te pisze się łącznie i, jeśli oba występują w tej samej nazwie, przedrostek „dehydro” podaje się przed przedrostkiem „hydro” (przedrostki określające krotność nie wpływają na podaną kolejność) — patrz reguła Car-6 [13]. Przykłady:



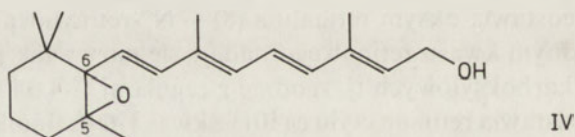
3,4-Didehydroretinol (znany również jako dehydroretinol<sup>4</sup> lub witamina A<sub>2</sub>)



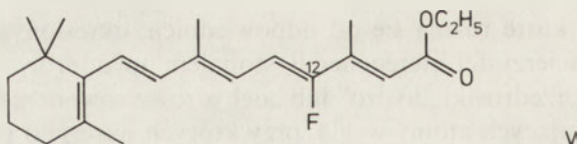
4,5-Didehydro-5,6-dihydroretinol (znany również jako  $\alpha$ -witamina A)

#### 4.4. Podstawione retinoidy

Podstawionym pochodnym retinoidów nadaje się nazwy stosując odpowiednie przedrostki zgodnie z zasadami ogólnymi słownictwa związków organicznych (patrz reguła C-0.1 w [15]). Użycie przyrostków nie jest możliwe ponieważ nazwy związków o macierzystej stereochemii zdefiniowane regułą Ret-2 zawierają już przyrostek związany z obecnością grupy funkcyjnej przy C-15. Przykłady:



5,6-Epoksy-5,6-dihydroretinol (znany także jako hepaksantyna)

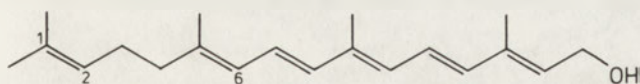


12-Fluororetinian etylu

<sup>4</sup> Nazwa zalecana w pracach z zakresu żywienia [16].

#### 4.5. *Seko retinoidy*

Rozszczepienie pierścienia z przyłączeniem jednego lub więcej atomów wodoru do każdej z powstałych grup krańcowych zaznacza się przedrostkiem „seko” przy czym zachowuje się numerację atomów węgla jak w wyjściowym retinoidzie (patrz reguła F-4.7 w [14]).

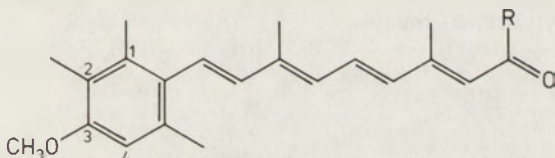


VI

1,6 - Seko-1,2 - didehydroretinol (znany także jako  $\gamma$ -witamina A)

#### 4.6. *Nor retinoidy*

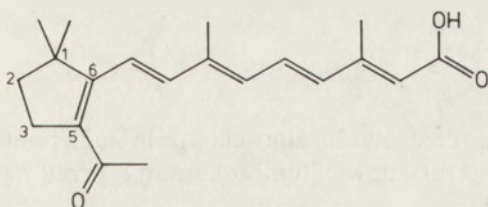
Eliminację z cząsteczki retinoidu grupy  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  lub  $\text{C}$  zaznacza się za pomocą przedrostka „nor” poprzedzonego lokantem usuniętego atomu węgla. Wtedy gdy istnieje kilka możliwości wybiera się lokant najwyższy z możliwych przy czym zachowuje się sposób numerowania atomów węgla w retinoidzie. Przedrostek „nor” jest nierozłączny (patrz reguły F-4.2 i F-4.4 w [14]). Należy tu zwrócić uwagę, że powyższe zalecenie odpowiada raczej regułom F-4.2 i F-4.4 niż zaleceniom słownictwa karotenoidów (reguła Car-5.1 w [13]), które to zalecenia nakazują wybór lokanta najniższego z możliwych. Należałoby więc, przy okazji kolejnej rewizji zasad słownictwa karotenoidów, zmodyfikować regułę Car-5.1, tak aby odpowiadała ona ogólniejszej praktyce.



VII

R =  $\text{NHC}_2\text{H}_5$  N - Etylo - 3 - metoksy - 2 - metylo - 17 - nor - 1,2,3,4 - tetra - dehydroretinamid (znany także jako motretinid<sup>2</sup>)

R =  $\text{OC}_2\text{H}_5$  3 - Metoksy - 2 - metylo - 17 - nor - 1,2,3,4 - tetra - dehydrore - tinian etylu (znany także jako etretinian<sup>2</sup>)



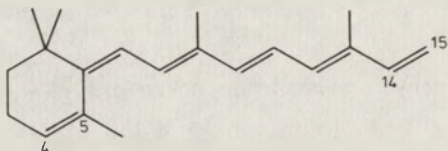
VIII

Kwas 5 - acetylo - 4,18 - dinor - retinowy



#### 4.7. *Retro* retinoidy

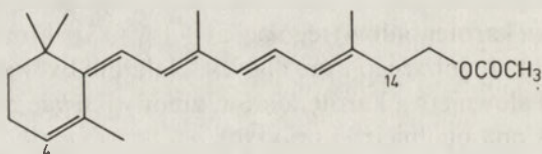
Przedrostek „*retro*” (pisany kursywą), wraz z parą lokantów, wskazuje na przesunięcie sprzężonego układu polienowego o jedną pozycję pomiędzy pozycjami określonymi przez te lokanty. Pierwszy lokant wskazuje atom węgla, który utracił proton a drugi — atom węgla, który zyskał proton. Przedrostek „*retro*” jest nierozłączny (patrz reguła Car-9 w [13]). Przykłady:



IX

4,5-Didehydro-15,5-*retro*-deoksytretinol  
(zwany także anhydrowitaminą A)

U w a g a: Podana wyżej nazwa semisystematyczna jest bardziej właściwa niż „14,15-didehydro-4,14-*retro*-deoksytretinol” gdyż występuje w niej zestaw niższych lokantów (patrz reguły A-2.2 i C-13.11 w [15]).



X

Octan 4,14-*retro*-retinyłu

#### 4.8. Inne modyfikacje

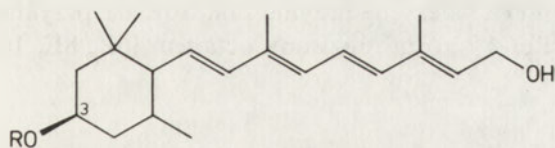
Inne modyfikacje można zaznaczać w nazwie za pomocą odpowiednich przedrostków. Na przykład: „cyklo” — patrz reguła F-4.1 w [14]; „homo” — patrz reguła F-4.5 w [14]; heteroatomy — patrz reguła F-4.11 w [12]; dodatkowe pierścienie — patrz reguła 2S w „Dodatku”, w [17].

### Ret-5. Stereochemia

#### 5.1. Grupy chiralne

Konfigurację absolutną centrów chiralności określa się za pomocą konwencji *RS*, podając symbole, wraz z odpowiednimi lokantami, przed nazwą retinoidu (patrz reguła E-4.9 w [18]).

## Przykłady:



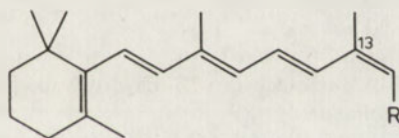
XI

R = H (3*R*)-3-HydroksyretinolR = COCH<sub>3</sub> (3*R*)-3-Acetoksyretinol

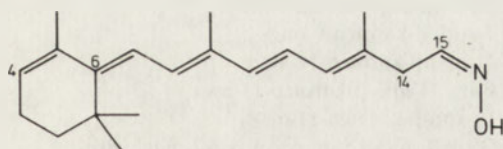
## 5.2. Wiązania podwójne

Nazwa związku o macierzystej stereochemii określonego regułą Ret-2 oznacza konfigurację *trans* wokół wszystkich wiązań podwójnych łańcucha polienowego (o ile nie podano, że jest inaczej). Obecność podwójnych wiązań *cis* wskazuje się po określeniu konfiguracji absolutnej (jeśli to niezbędne). Można w tym celu stosować stereochemiczne symbole *E* i *Z* (patrz reguła E-2 w [18]). Symbole te należy stosować zawsze wtedy, gdy oznaczenia *cis* lub *trans* mogły by powodować niejednoznaczność. Trzeba jednak zwrócić uwagę na to, że podstawienie cząsteczki retinoidu może prowadzić do zmiany konfiguracji *E* i *Z* lub odwrotnie — nawet wtedy, gdy nie następuje zmiana konfiguracji łańcucha polienowego w odniesieniu do związku o macierzystej stereochemii. Z tego powodu, w przypadku stosowania symboli *E* lub *Z*, zaleca się podawanie stereochemii wszystkich wiązań podwójnych. Na przykład związek (9) jest (*all-E*)-retinianem etylu. Zastąpienie wodoru przy C-12 fluorem daje związek podany jako przykład ilustrujący regułę Ret-4.4, który można określić jako (7*E*, 9*E*, 11*Z*, 13*E*)-12-fluororetinian etylu.

## Przykłady:



XII

R = CH<sub>2</sub>OH 13-*cis*-Retinol lub (7*E*, 9*E*, 11*E*, 13*Z*)-  
-retinol (znany także jako neowitamina A)R = CO<sub>2</sub>H Kwas 13-*cis*-retinowy lub kwas (7*E*, 9*E*, 11*E*,  
13*Z*)-retinowy (znany także jako izotretinoina<sup>2</sup>)

XIII

Oksym (6*E*, 8*E*, 10*E*, 12*E*, 15*Z*)-4,14-*retro*-retinalu

U w a g a: Jeśli zachodzi konieczność określenia w *retro*-retinoidzie stereochemii wiązania podwójnego 6 (7), należy to uczynić tak, aby, na przykład, związek wymieniony w regule Ret-4.7 został nazwany octanem (6*Z*, 8*E*, 10*E*, 12*E*)-4, 14-*retro*-retinyłu.

## Dodatek

### Niektóre pokrewne terpenoidy zawierające mniej niż 20 atomów węgla

Termin „karotenoid” ogranicza się zazwyczaj do terpenoidów, które zachowały dwie centralnie położone grupy metylowe macierzystego związku  $C_{40}$ . Tym niemniej reguły Car-1 i Car-10 [13] zezwalają na rozszerzenie tego terminu, poprzez zastosowanie przedrostka „apo”, również na retinoidy (na przykład retinal można by określić jako 15-apo- $\beta$ -karoten-15-al) oraz wiele innych terpenoidów o niedużych cząsteczkach. Wiele tych terpenoidów wykazuje aktywność hormonów roślinnych lub stanowi ważne składniki olejków eterycznych. Poniższą listę nazw zwyczajowych niektórych związków z tej grupy podano dla wygody — nie oznacza to jednak oficjalnego uznania tych nazw.

Nazwa zwyczajowa	Nazwa semisystematyczna
(+)-Abscysowy kwas	kwas (7 <i>E</i> , 9 <i>Z</i> )-(6 <i>S</i> )-6-hydroksy-3-okso-11-apo- $\epsilon$ -karoten-11-owy
(-)-Aktynidiolid	(5 <i>R</i> )-3,4-didehydro-5,8-dihydro-8-apo- $\beta$ -karoten-8,5-olid
Aktynidol	5,8-epoksy-3,4-didehydro-5,8-dihydro-9-apo- $\beta$ -karoten-9-ol
Blumenol A	(6 <i>S</i> , 9 <i>R</i> )-6,9-dihydroksy-9-apo- $\epsilon$ -karoten-3-on
Blumenol B	(6 <i>S</i> , 9 <i>R</i> )-6,9-dihydroksy-7,8-dihydro-9-apo- $\epsilon$ -karoten-3-on
Blumenol C	9-hydroksy-7,8-dihydro-9-apo- $\epsilon$ -karoten-3-on
$\beta$ -Cyklocytral	7-apo- $\beta$ -karoten-7-al
$\beta$ -Cyklogeraniol	7-apo- $\beta$ -karoten-7-ol
$\beta$ -Cyklogeranowy kwas	kwas 7-apo- $\beta$ -karoten-7-owy
Damascenon	(8 <i>E</i> )-3,4,8,9,-tetrahydro-7,8-dihydro-9-apo- $\beta$ -karoten-7-on
Digiprolakton	patrz Loliolid
Fazcowy kwas	kwas (7 <i>E</i> , 9 <i>Z</i> )-(1 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )-5,16-epoksy-6-hydroksy-3-okso-5,6-dihydro-11-apo- $\beta$ -karoten-11-owy
(+)- <i>cis</i> - $\alpha$ -Iron	(2 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )-2-metylo-9-apo- $\epsilon$ -karoten-9-on
(-)- <i>trans</i> - $\alpha$ -Iron	(2 <i>R</i> , 6 <i>R</i> )-2-metylo-9-apo- $\epsilon$ -karoten-9-on
(+)- $\beta$ -Iron	(2 <i>R</i> )-2-metylo-9-apo- $\beta$ -karoten-9-on
(+)- $\alpha$ -Jonon	(6 <i>R</i> )-9-apo- $\epsilon$ -karoten-9-on
$\beta$ -Jonon	9-apo- $\beta$ -karoten-9-on
(-)- $\gamma$ -Jonon	(6 <i>S</i> )-9-apo- $\gamma$ -karoten-9-on
$\Psi$ -Jonon	9-apo- $\Psi$ -karoten-9-on
$\beta$ -Jonylidenoacetaldehyd	11-apo- $\beta$ -karoten-11-al
$\beta$ -Jonylidenoctowy kwas	kwas 11-apo- $\beta$ -karoten-11-owy
$\beta$ -Jonylidenoetanol	11-apo- $\beta$ -karoten-11-ol
Keton konika polnego	(3 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i> )-3,5-dihydroksy-6,7-didehydro-
<i>Romalea microptera</i>	-5,6-dihydro-9-apo- $\beta$ -karoten-9-on
(-)-Ksantoksyna	(7 <i>E</i> , 9 <i>Z</i> )-(3 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )-5,6-epoksy-3-hydroksy-5,6-dihydro-11-apo- $\beta$ -karoten-11-al



(-)-Loliolid	(3S, 5R)-3-hydroksy-5,8-dihydro-8-apo-β-karoten-8,5-olid
Lucyferyna z <i>Latia</i>	<i>mrówczan</i> (9E)-7,8-dihydro-10-apo-β-karoten-10-ylu
Pseudojonon	patrz Ψ-Jonon
Safranal	3,4-didehydro-7-apo-β-karoten-7-al
(-)-Teaspiro	(6S, 9S)-6,9-epoksy-7,8-dihydro-9-apo-ε-karoten-3-on
Trisporol B	(1S)-16-hydroksy-11,12-dihydro-13-apo-β-karoten-4,13-dion
Trisporol C	(1S, 13R)-13,16-dihydroksy-11,12-dihydro-13-apo-β-karoten-4-on
Trisporon	(1S)-11,16-dihydroksy-11-apo-β-karoten-4-on
Trisporowy B kwas	kwas (1S)-4,13-dioksy-11,12-dihydro-13-apo-β-karoten-16-owy
Trisporowy C kwas	kwas (1S, 13R)-13-hydroksy-4-okso-11,12-dihydro-13-apo-β-karoten-16-owy
Womifoliol	patrz Blumenol A

Opracowanie otrzymano 21 czerwca 1988 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Funk, K., (1912), *J. State Med.*, **20**, 341—368.
2. McCollum E. V., Kennedy C., (1916), *J. Biol. Chem.*, **24**, 491—502.
3. Drummond J. C., (1920), *Bioch. J.*, **14**, 660.
4. Wald G., (1934), *Nature* (Lond.), **134**, 65.
5. Morton R. A., (1944), *Nature* (Lond.), **153**, 69—71.
6. Morton R. A., Goodwin T. W., (1944), *Nature* (Lond.), **153**, 405—406.
7. Karrer P., Morf R., Schoepp K., (1931), *Helv. Chim. Acta*, **14**, 1431—1436.
8. v. Euler H., Karrer P., Solmssen U., (1938), *Helv. Chim. Acta*, **21**, 211—222.
9. Edisbury J. R., Morton R. A., Simkins G. W., (1937), *Nature* (Lond.), **140**, 234.
10. IUPAC Commission on the Nomenclature of Biological Chemistry (1960) Definitive rules for the nomenclature of vitamins, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 5581—5583.
11. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), Tentative rules, section on Trivial names of miscellaneous compounds of importance in biochemistry (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 1—2. Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa 1983, str. 265—267.
12. International Union of Biochemistry (1978) Biochemical Nomenclature and Related Documents, The Biochemical Society, London.
13. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC). Tentative rules for the nomenclature of carotenoids (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 397—407. Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa 1983, str. 205—230.
14. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC), Nomenclature of Organic Chemistry, Section F: Natural products and related compounds, Recommendations 1976 (1978) *Eur. J. Biochem.*, **86**, 1—8. Patrz także str. 19—26 w [12] i str. 491—511 w [15].
15. International Union of Pure and Applied Chemistry (1979) Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F and H. Pergamon Press, Oxford. Polskie Towarzystwo Chemiczne. Nomenklatura Związków Organicznych. Części A i B, PWN, Warszawa-Łódź 1978, Część C i E, PWN, Warszawa-Łódź 1979, Część D, PWN, Warszawa-Łódź 1981.
16. International Union of Nutritional Sciences, Committee 1/1, Nomenclature (1978) *Nutr. Abstr. Rev.*, **48A**, 831—835.
17. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), The nomenclature of steroids, Revised tentative rules—1967 (1969) *Eur. J. Biochem.*, **10**, 1—19. Patrz także str. 133—153 w [12].

Polskie Towarzystwo Chemiczne. Nomenklatura Związków Organicznych. Steroidy i cykliczne (zalecenia), PWN, Warszawa-Łódź 1979.

18. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNO), Rules for the nomenclature of organic chemistry, Section E: Stereochemistry, Recommendations — 1974 (1976) *Pure Appl. Chem.*, **45**, 11—30. Patrz także str. 1—18 w [12] i str. 473—490 w [15].  
Polskie Towarzystwo Chemiczne. Nomenklatura Związków Organicznych. Część E, PWN, Warszawa-Łódź 1979.

### III. Słownictwo i symbole kwasu foliowego i związków pokrewnych

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji Nomenklatury Biochemicznej (JCNB) IUPAC-IUB: "Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. Recommendations 1986", opublikowano w *Eur. J. Biochem.*, (1987), **168**, 251—253.

opracowała Barbara Rzeszotarska

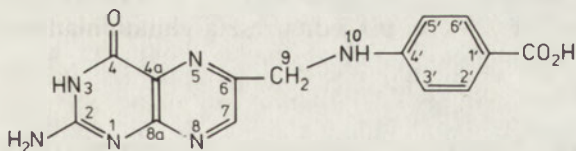
Komisja Słownictwa Biochemicznego uprzejmie dziękuje profesorowi Osmanowi Achmatowiczowi za konsultacje przy opracowaniu dokumentu.

#### Spis treści

1. Wstęp
2. Skorygowane zalecenia
  - 2.1. Związek macierzysty
  - 2.2. Numerowanie
  - 2.3. Glutaminowe pochodne kwasu foliowego
  - 2.4. Folian i kwas foliowy
  - 2.5. Rodzajowe użycie terminu foliany
  - 2.6. Związki uwodorowane
  - 2.7. Podstawniki
  - 2.8. Symbole i skróty
3. Piśmiennictwo

#### 1. Wstęp

Foliany stanowią grupę związków heterocyklicznych zawierających szkielet kwasu 4-[(pterydyn-6-ylometylo) amino] benzoowego (Ryc. 1.) związany z resztą lub resztami glutaminianowymi. Przedstawiony dokument jest skorygowaną wersją zaleceń Komisji Nomenklatury Biochemicznej IUPAC-IUB, sporządzonych w 1964 r. [1]. Główne zmiany są konsekwencją wzrostu wiedzy o stereochemii folianów. Dokument zawiera także zalecane słownictwo związków uwodorowanych i podstawników, jak również symbole i skróty.



Ryc. 1. Kwas pteroinowy



## 2. Skorygowane zalecenia

### 2.1. Związek macierzysty

Podstawę grupy związków, o których mowa stanowi kwas pteroinowy (Ryc. 1.). Sole tego kwasu nazywa się pteroinianami, a grupę acylową — pterolem. Uwaga i:

1) Struktura pokazana na rycinie 1 ma nazwę systematyczną: Kwas 4-{[(2-amino-3,4-dihydro-4-oksopterydyn-6-ylo) metylo] amino} benzoesowy. Morfem “dihydro” w tej systematycznej nazwie macierzystego, nieuwodorowanego związku powinien być starannie odróżniany od morfemu “dihydro” w nazwach pochodnych uwodorowanych (paragraf 2.6).

2) W biologicznie ważnych pochodnych występuje również 2-aminopterydyn-4(3*H*)-on, który można nazwać pteryną.

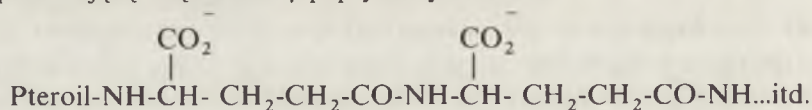
### 2.2. Numerowanie

Numerowanie atomów pokazuje Ryc. 1.

Uwaga: Numery 5,8, i 10 jednoznacznie określają pozycje atomów azotu w cząsteczce. Nie należy zatem wprowadzać symbolu *N* do nazwy przy wskazywaniu podstawników przy tych atomach. Atomy węgla wspólne dla dwóch pierścieni numeruje się 4a i 8a, co umożliwi opisanie związków uwodorowanych w tych pozycjach.

### 2.3. Glutaminianowe pochodne kwasu foliowego

Związki, w których kwas pteroinowy związany jest z resztą lub resztami L-glutaminianowymi nazywa się pteroiloglutaminianem, pteroilodiglutaminianem itd (nie używa się nazwy pteroilomonoglutaminian; patrz również paragraf 2.4.). Przyjmuje się, że druga i każda następna reszta glutaminianowa łączy się z poprzedzającą wiązaniem  $\gamma$ -peptydowym, zatem:



Powyższe nazwy można również stosować w sensie rodzajowym. Tak więc “pteroiloheksaglutaminian” może być użyty do oznaczenia jakiegokolwiek związku o tej podstawowej strukturze lub ich mieszaniny bez względu na star uwodorowania pierścienia pterydynowego lub jego jednowęglowe podstawniki. Termin “pteroilopoliglutaminiany” ma jeszcze szerszą konotację i stosuje się do wszystkich związków z więcej niż jedną resztą glutaminianową.

### 2.4. Folian i kwas foliowy

Nazwy: folian i kwas foliowy są uprzywilejowanymi synonimami pteroiloglutaminianu i kwasu pteroiloglutaminowego.

## 2.5. Rodzajowe użycie terminu foliany

Termin foliany można stosować w sensie rodzajowym do nazwania jakiegokolwiek związku z grupy pteroiolglutaminianów lub ich mieszaniny niezależnie od stopnia uwodorowania pierścienia pterydynowego, jednowęglowych podstawników i liczby reszt glutaminianowych.

## 2.6. Związki uwodorowane

Związki uwodorowane oznacza się przedrostkami "dihydro-", "tetrahydro-" itd., z cyframi wskazującymi pozycje dodatkowych atomów wodoru, o ile pozycje te są znane. Przyjmuje się, że pochodna tetrahydro- jest uwodorowana w pozycjach 5, 6, 7, i 8, a dihydro- w pozycjach 7 i 8, o ile nie zaznaczono inaczej.

Skoro absolutna konfiguracja atomu C-6 naturalnych stereoizomerów tetrahydropteroilglutaminianów jest znana, zawsze kiedy możliwe należy używać symboli *R*, *S* lub *ambo-*. (Przedrostek *ambo-* oznacza mieszaninę cząsteczek, z których jedne mają konfigurację *R* a drugie *S* na atomie, do którego symbol ten się odnosi; jest on szczególnie użyteczny przy nierównym udziale składników, wynikającym z obecności w cząsteczce innych centrów chiralnych, jak centra reszt glutaminianowych. Dokładniejsze wyjaśnienia znajdują się w rozdziałach 3AA-13.2 i 3AA-19.2 dokumentu cytowanego w punkcie 2 spisu piśmiennictwa). Wszystkie znane naturalne stereoizomery mają tę samą konfigurację jak (6*S*)-tetrahydrofolian, a w ich wzorach przedstawionych tak jak na rycinie 1 atom wodoru przy C-6 umieszczony jest poniżej płaszczyzny papieru. Są one jednak oznaczane raz jako *R*, a raz jako *S* w zależności od reguł pierwszeństwa (uzupełnienie 2 w dokumencie cytowanym w punkcie 3 spisu piśmiennictwa). Przykłady podano poniżej w paragrafie 2.8.(f). Jeśli konfiguracja przy C-6 związku mającego wodór przy tym atomie jest nieznaną, można użyć symboli (+), (-), lub ( $\pm$ ), aby wskazać aktywność optyczną.

## 2.7. Podstawniki

Pospolite podstawniki określa się przedrostkami, pochodzącymi z ogólnych reguł słownictwa związków organicznych (3-6), wraz z numerami wskazującymi podstawione pozycje. Przedrostek oznacza, że podstawnik zastępuje jeden atom wodoru w macierzystej strukturze w przypadku formuły, metylu lub grupy formiminowej, lub dwa takie atomy w przypadku metenyłu. Powyższe trzeba mieć na uwadze w bilansowaniu równań zawierających tetrahydrofoliany. Metylen ( $\text{CH}_2$ ) i metenyl ( $\text{CH}$ ) (patrz Tabela) tworzą mostek między atomem azotu 5 a 10 folianów uwodorowanych. W przypadku metenyłu ładunek dodatni umieszcza się w obrębie struktury  $\text{N} \text{-----} \text{CH} \text{-----} \text{N}$ .

Dla wygody, przedrostek określający uwodorowanie (dihydro- lub tetrahydro-) traktuje się jako nierozłączny (odnośnik (5), reguła C-16.1) i jako taki umieszcza bezpośrednio przed rdzeniem nazwy (folian, pteroiolglutaminian). Przedrostki określające inne podstawniki umieszcza się przed dihydro- lub tetrahydro-.

Tabela 1

Podstawnik	Symbol	Wzór strukturalny
Formimino*)	NHCH—	HN=CH—
Formyl	HCO—	O=CH—
Metyl	CH <sub>3</sub> —	CH <sub>3</sub> —
Metylen	—CH <sub>2</sub> —	—CH <sub>2</sub> —
Metenyl*)	—CH <sup>+</sup> —	—CH= w formach mezomerycznych [>N—CH=N <sup>+</sup> ↔ >N <sup>+</sup> =CH—N<]

\*) Systematycznymi nazwami HN=CH— i —CH=są iminometyl (lub formimidoil) i metylen. Podano jednak nazwy powszechnie używane w praktyce biochemicznej. Formimino nie należy mylić z formyloimino (HC(O)N-).

## 2.8. Symbole i skróty

Często dla wygody, przede wszystkim, aby skrócić długie nazwy w równaniach, tabelach i na rycinach, omawiane tu związki oznaczają się symbolami. We wszystkich przypadkach, w których mogą powstać wątpliwości, symbole należy zdefiniować lub nazwy związków podać w pełnym brzmieniu. Zaleca się stosowanie następujących zasad:

a) Przedkłada się nazwę folian nad nazwę kwas foliowy. Ponieważ termin folian jest krótki, nie należy go skracać.

b) Pteroinian (lub pteroil lub kwas pteroinowy) określa się trójliterowym symbolem Pte.

c) Kwasy pteroiloglutaminowe lub ich sole oznacza się symbolami PteGlu, PteGlu<sub>2</sub>, PteGlu<sub>3</sub> itd. Liczby wskazują liczbę reszt glutaminianowych. (Symbol Glu pochodzi ze standardowych symboli aminokwasów [2]). W serii folianów Glu oznacza kwas glutaminowy dołączony w sposób omówiony w paragrafie 2.3, o ile nie podano inaczej).

d) Uwodorowanie pochodnych określają przedrostki H<sub>2</sub> i H<sub>4</sub> umieszczone przed głównym symbolem ze wskazaniem pozycji, o ile to potrzebne, np. H<sub>2</sub>folian, H<sub>4</sub>PteGlu<sub>3</sub>. Nie powinno się używać symboli DH i TH.

e) Podstawniki oznacza się symbolami pochodzącymi od ich wzorów strukturalnych, jak pokazano w tabeli 1. Pozycję podstawnika podaje się przed symbolem jego nazwy.

f) Przedrostki H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub> i inne można używać z terminem "foliany" lub "pteroiloglutaminiany" mając na myśli związki uwodorowane i/lub zmodyfikowane (bez określenia liczby reszt kwasu glutaminowego w cząsteczce).

Poniżej podano przykłady naturalnych stereoizomerów:

(6S)-H<sub>4</sub>folian                      (6S)-5,6,7,8-tetrahydrofolian  
 (6S)-5,6,7,8-tetrahydropteroiloglutaminian  
 (6R)-5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folian        (6R)-5,10-metylenotetrahydrofolian



(6S)-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> PteGlu <sub>3</sub>	(6S)-5-metylotetrahydropterolotriglutaminian
(6R)-10-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>n</sub>	(6R)-10-formyloctetrahydrofolian, (lub (6R)-10-formyloctetrahydropterolopoliglutaminian, jeżeli wyklucza się n = 1)
(6R)-5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folian	(6R)-5,10-metenyloctetrahydrofolian
(6S)-5-CHO-H <sub>4</sub> folian	(6S)-5-formyloctetrahydrofolian

Poniżej podano przykład mieszaniny stereoizomerów:

(6-ambo)-5-CHO-H<sub>4</sub>folian (6-ambo)-5-formyloctetrahydrofolian

*Opracowanie otrzymano 8 lipca 1988 r.*

## PIŚMIENICTWO

1. Grzelakowska-Sztabert B. w: Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne, (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa 1983, s. 245—247.
2. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (ICBN): Nomenclature and symbolism for amino acid and peptides. Recommendations 1983. *Biochem J.* (1984), **219**, 345—373; *Eur. J. Biochem.* (1984), **138**, 9—37; *Int. J. Pept. Protein Res.* (1984), **24**, po s. 84; *J. Biol. Chem.*, (1985), **260**, 14.42; *Pure Appl. Chem.* (1984), **56**, 596—624; *Spec. Per. Rep. Amino Acids Pept.*, (1985), **16**, 387—410.
3. Nomenklatura związków organicznych. Część E. Stereochemia. PWN, Warszawa, Łódź 1979.
4. Nomenklatura związków organicznych. Część A i B. PWN, Warszawa, Łódź 1978.
5. Nomenklatura związków organicznych. Część C. PWN, Warszawa, Łódź 1979.
6. Nomenklatura związków organicznych. Część D. PWN, Warszawa, Łódź 1981.

1. The first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

2. The second part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

MEMBERS OF THE COMMITTEE

- 1. Mr. J. H. ...
- 2. Mr. J. H. ...
- 3. Mr. J. H. ...
- 4. Mr. J. H. ...
- 5. Mr. J. H. ...
- 6. Mr. J. H. ...
- 7. Mr. J. H. ...
- 8. Mr. J. H. ...
- 9. Mr. J. H. ...
- 10. Mr. J. H. ...

## KOMUNIKAT

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

1. „Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne” (red. A. Morawiecki), PWN, Warszawa 1983\*.
2. Wybrane symbole i wielkości jednostek. Wykaz skrótów. *Post. Biochem.*, 1983, **29**, 412—413.
3. Jednostki aktywności enzymatycznej. *Post. Biochem.*, 1983, **29**, 409—411.
4. Słownik nazw enzymów. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 95—205.
5. Zmiany w słownictwie enzymów. *Post. Biochem.*, 1986, **32**, 375.
6. Zalecenia dotyczące pomiarów i przedstawiania dawnych równowag biochemicznych. *Post. Biochem.*, 1984, **30**, 487—499.
7. Przedstawienie danych termodynamicznych i pokrewnych w biologii. *Post. Biochem.*, 1987, **33**, 357.
8. Słownictwo monosacharydów rozgałęzionych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 649—656.
9. Słownictwo monosacharydów nienasyconych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 656—661.
10. Słownictwo określające konformację pięcio- i sześcioczłonowych form pierścieniowych monosacharydów i ich pochodnych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 684—690.
11. Skrócone nazwy łańcuchów oligosacharydowych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 662—672.
12. Słownictwo polisacharydów. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 672—677.
13. Symbole określające konformację łańcuchów polisacharydowych. *Post. Biochem.*, 1985, **31**, 677—684.
14. Słownictwo witamin D. *Post. Biochem.*, 1983, **29**, 397—408.

---

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





## SPRAWOZDANIA

### Międzynarodowa Letnia Szkoła na temat „Nowe Techniki i Kierunki Badań w Pracach nad Fotosyntezą” — NATO/FEBS Summer School

“Techniques and New Developments in Photosynthesis” (Spetsai, Grecja 31 lipca — 13 sierpnia 1988)

Tegoroczna Letnia Szkoła Biochemiczna poświęcona fotosyntezie była kolejnym tego typu spotkaniem. Pierwsze z nich odbyło się w tym samym miejscu 10 lat temu. Jednym z głównych organizatorów kursu był wówczas George Akoyunoglou (Grecja). W bieżącym roku zjazd dedykowano jego pamięci. W komitecie organizacyjnym Szkoły znaleźli się: Jim Barber (Anglia), Richard Malkin (USA) i Roland Douce (Francja). W spotkaniu wzięło udział ponad 120 osób z 21 krajów świata. Najliczniej reprezentowane były: Anglia, Stany Zjednoczone, RFN i Grecja.

Szkołę otworzył wykładem inauguracyjnym pt. „Energia słoneczna, jej wychwytywanie i wykorzystanie” profesor Sir George Porter (Anglia), laureat nagrody Nobla. W czasie kursu 20 innych wykładawców z czołowych ośrodków biochemicznych świata wygłosiło 46 godzinnych wykładów poświęconych fotosyntezie. Byli to: B. Andersson (Szwecja), J. Barber (Anglia), J. Joyard (Francja), T. A. Dyer (Anglia), K. Gounaris (Anglia), J. C. Gray (Anglia), M. C. Guerrero (Hiszpania), U. Heber (RFN), R. Malkin (USA), B. A. Melandri (Włochy), H. Michel (RFN), E. Nabderyk (Francja), I. Ohad (Izrael), L. Packer (USA), G. C. Papageorgiu (Grecja), B. Ramage (USA), M. Stitt (RFN), W. Vermaas (USA), D. A. Walker (Anglia), C. A. Wright (USA).

Poza tym odbywało się 7 tzw. „dyskusji okrągłego stołu” oraz prezentacja wyników w czasie sesji plakatowych. Problematyka zajęć obejmowała kilka grup tematycznych:

- 1) Absorpcja światła, struktura kompleksów chlorofilowo-białkowych i przekazywanie energii.
- 2) Struktura błon fotosyntetycznych i zmiany w nich zachodzące pod wpływem czynników stresowych.
- 3) Struktura i funkcja fotosyntetycznego centrum reakcji.
- 4) Wydzielanie tlenu, funkcje chinonów, kompleks cytochrom  $b_6/f$ .
- 5) Fosforylacja i mechanizm sprzężenia energetycznego.
- 6) Metabolizm dwutlenku węgla i jego regulacja.
- 7) Biologia molekularna aparatu fotosyntetycznego.

Wielką zasługą organizatorów było wydanie materiałów zjazdowych i to nie tylko streszczeń plakatów, ale i wykładów. Ponadto komunikaty mają ukazać się w formie rozszerzonych, kilkustronicowych prac, których maszynopisy uczestnicy Szkoły przekazali organizatorom w czasie jej trwania. Miłym urozmaiceniem kursu było kilka wycieczek do innej części wyspy oraz na pobliskie Peloponez.

Letnia Szkoła na temat Fotosyntezy na pewno pozostanie na długo w pamięci jej uczestników dzięki zdobytej tu wiedzy oraz nawiązaniu nowych kontaktów naukowych.

*Joanna Gemel*

## IV Sympozjum Fluorowe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie

IV Sympozjum Fluorowe zorganizowane przez Oddział Szczeciński Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbyło się w dniach 1—2 września 1988 roku na terenie Pomorskiej Akademii Medycznej, w ramach obchodów 40-lecia istnienia Uczelni. W obradach brało udział około 80 osób, chociaż nie wszyscy współautorzy prac, zwłaszcza zamiejscowi, mogli przybyć na obrady. Na program Sympozjum złożyło się 10 referatów i 30 plakatów. Pierwszego dnia w sesji przedpołudniowej przedstawiono 6 referatów, a w godzinach popołudniowych miała miejsce prezentacja plakatów. W drugim dniu wygłoszono 4 referaty. Kolejność referatów była następująca:

1. Czy istnieje głód fluorowy u ludzi (Z. Machoy, Szczecin);
2. Najnowsze kierunki w chemii i technologii fluoru (U. Głabisz, Szczecin);
3. Rola biologiczna fluorowanych nukleozydów i nukleotydów (K. Jacyszyn, Wrocław);
4. Przypadki ostrych śmiertelnych zatruc związkami fluoru w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych (J. Markiewicz, J. Sadlik, Kraków);
5. Przewlekłe narażenie człowieka na związki fluoru na terenach uprzemysłowionych i niektóre związane z tym zmiany enzymatyczne oraz konsekwencje zdrowotne (M. Gumińska, Kraków);
6. Fluoride accumulation in antarctic Krill and consequences to its natural predators (D. Adelung, Kiel, RFN);
7. Different sensitivities to fluoride in humans and animals. An overview (H. Runge, J. Franke, Halle — Erfurt, NRD);
8. Diagnostyka kliniczna fluorozy przemysłowej (E. Czerwiński, Kraków);
9. Experimental fluorosis in rat: sodium fluoride induced changes of bone and cartilage (M. Bely, T. Pinter, A. Apathy, Budapest, Węgry);
10. Effects of fluoride emissions in the vicinity of industry (Ch. Schmit, NRD);

Dyskusje odbywały się po każdym z referatów. Na zakończenie obrad zorganizowane zostało, pod kierownictwem prof. Gumińskiej, spotkanie autorów plakatów. Miało ono na celu przedyskutowanie przedstawionych plakatów, wysłuchanie uwag, komentarzy, wyjaśnień i zarzutów merytorycznych. Stanowiło więc ważną część tego interdyscyplinarnego sympozjum. A oto kilka z wybranych stwierdzeń. Fluor, który był jednym z pierwszych znanych inhibitorów wielu reakcji enzymatycznych, oddziałuje według różnorodnych mechanizmów. Najogólniej mówiąc, doprowadza on do wyeliminowania z organizmów wpływów wielu podstawowych kationów. Jego penetracja, nie tylko do tkanek twardych, ale także do tkanek miękkich jest zastanawiająca i błyskawiczna. Dramaturgia kilku ostrych zatruc była przedstawiona w referacie prof. Markiewicza. Do poznanych już wcześniej negatywnych wpływów fluoru na szlaki metaboliczne cukrów, białek, lipidów i wytwarzania energii dochodzą oddziaływania immunologiczne, o których dotychczas mało było wiadomo. Na uwagę zasługuje doniesienie A. Wędzisz i współt., że przy podawaniu małych dawek fluorków ich kumulacja w kościach i zębach jest w przybliżeniu jednakowa, ale przy zwiększonych dawkach fluorków więcej ich gromadzi się w kościach niż w zębach. Może to mieć praktyczne znaczenie dla stomatologów w ich programach profilaktycznych zwalczania próchnicy zębów poprzez fluorkowanie wody pitnej. Jeszcze ciekawiej wygląda przemieszczanie się fluoru u antarktycznego kryla. Po jego odłowieniu, w temperaturze poniżej 0°C, ma miejsce szybka proteoliza i przemieszczanie się fluoru z pancerza do tkanek miękkich, co bardzo obniża wartość użytkową jego białka. Tym i innym wypowiedziom zostanie poświęcone osobne opracowanie w wydawnictwie specjalistycznym.

W czasie ogólnej dyskusji sprecyzowano pewne postulaty dotyczące opracowania ponownej weryfikacji metod analitycznych w zakresie diagnostyki badań pracowników zatrudnionych w zakładach przemysłowych, przerabiających materiały zawierające związki fluoru. Organizatorem sympozjum sugerowano zorientowanie się w możliwościach utworzenia w Polsce filii Międzynarodowego Towarzystwa Badania Fluorków (ISFR).

10-letni okres czasu, w którym odbyły się w Szczecinie cztery sympozja fluorowe skłania do oceny ich znaczenia naukowego. Organizatorzy I Sympozjum w 1979 roku nie przypuszczali, że przekształcą się one w regularne spotkania naukowe. Wydawało się, że fluor jako pierwiastek nie stanowi dostatecznie dużego obszaru dla działalności naukowej. Obecnie jednak przemianami fluoru



zajmują się specjaliści wielu gałęzi nauki. Jest to wynikiem szczególnych właściwości fluoru, który odgrywa znaczną rolę nie tylko w chemii, głównie w różnych procesach syntezy i technologii chemicznej, lecz również w stomatologii, medycynie, weterynarii, toksykologii, biochemii, rolnictwie i wielu innych dziedzinach. Największe zainteresowanie fluorem wykazują toksykolodzy, którzy w zatruciach przewlekłych, być może bardziej niż w zatruciach ostrych, widzą narastające niebezpieczeństwo ekologiczne. Polska ma szczególne powody ku temu, by bacznie obserwować skutki wywołane rozprzestrzenianiem się związków fluoru w atmosferze, a poprzez nią oddziaływanie na wodę, glebę, rośliny, zwierzęta i ludzi. Ujemne skutki obserwuje się już nie tylko wokół dużych zakładów przemysłowych, ale na ogromnych obszarach nieuprzemysłowionych z powodu spalania ogromnych ilości węgla niskogatunkowego, zawierającego związki fluoru. Węgiel zapewne jeszcze długo będzie w Polsce głównym źródłem energii, co nie napawa ekologów optymizmem. Znaczne ilości fluoru są wprowadzane do gleby także z nawozami sztucznymi.

Zainteresowanie dotychczasowymi sympozjami fluorowymi obrazuje załączona tabela, która informuje o ilości prac pochodzących z różnych ośrodków.

Obszerniejsze i dokładniejsze sprawozdania z sympozjów były publikowane w czasopiśmie krajowych (Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, Czasopismo Stomatologiczne) i zagranicznych (Fluoride). Dzięki wydaniu książkowych materiałów zjazdowych z I, III i IV Sympozjum i skróconego opracowania z II Sympozjum, opublikowanego w Czasopiśmie Stomatologicznym, każdy zainteresowany problematyką fluorową znajdzie w nich sporo informacji. Wydawnictwa te zostały zamówione przez liczne biblioteki krajowe i informacyjne centra zagraniczne (zawierają tytuły i streszczenia w języku angielskim). Coraz częściej odzywają się głosy, aby szczebińskim sympozjom fluorowym nadać rangę spotkań międzynarodowych.

*Zygmunt Machoy*

**Tabela 1**

Sympozja fluorowe w Szczecinie i ilość zgłoszonych prac w poszczególnych latach

Lp.	Ośrodek	1979	1983	1986	1988
1.	Białystok	1	5	—	—
2.	Jabłonna	—	1	—	—
3.	Jelenia Góra	1	1	1	1
4.	Kraków	5	8	6	5
5.	Kielce	—	—	1	—
6.	Kórnik	1	1	1	1
7.	Lublin	4	2	1	1
8.	Łódź	2	3	3	5
9.	Olsztyn-Kortowo	—	—	—	2
10.	Poznań	5	3	5	—
11.	Puławy	—	—	2	2
12.	Śląsk-Sosnowiec	7	—	1	3
13.	Szczecin	26	18	18	17
14.	Warszawa	1	—	—	—
15.	Wrocław	4	2	1	1
16.	USA (San Francisco, Warren)	1	1	—	—
17.	NRD (Erfurt, Cottbus, Heidenau, Halle)	—	1	2	3
18.	RFN (Wuřzburg, Kiel)	—	1	1	1
19.	Czechosłowacja (Ceske Budejowice)	—	—	1	—
20.	Dania (Odense)	—	—	1	—
21.	Węgry (Budapest)	—	—	—	1
22.	Turcja (Ankara)	—	—	—	1

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work of the Commission. It then goes on to discuss the various aspects of the work of the Commission, including the work of the various committees and the work of the Commission as a whole. The report also discusses the work of the Commission in the field of human rights and the work of the Commission in the field of the environment.

No.	Name
1	[Redacted]
2	[Redacted]
3	[Redacted]
4	[Redacted]
5	[Redacted]
6	[Redacted]
7	[Redacted]
8	[Redacted]
9	[Redacted]
10	[Redacted]
11	[Redacted]
12	[Redacted]
13	[Redacted]
14	[Redacted]
15	[Redacted]

## Z DZIAŁALNOŚCI POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

### Nagrody

#### NAGRODA im. prof. JAKUBA KAROLA PARNASA

“Comparison of galactolipase activity free fatty acid levels in chloroplast of chill-sensitive and chill-resistant plants” *Eur. J. Biochem.*, **166**, 229—233, 1987  
oraz

“Fatty-acid-induced release of manganese from chloroplasts” *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 473—482, 1986

Zbigniew Kaniuga, Joanna Gemel, Barbara Zabłocka —  
Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

#### NAGRODA im. prof. BOLESŁAWA SKARŻYŃSKIEGO

“Neuroreceptory” *Post. Biochem.*, **33**, 45—63, 1987

Jolanta Skangiel-Kramska — Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

#### NAGRODA im. prof. WŁODZIMIERZA MOZOŁOWSKIEGO

“Kinetyka ekspresji genów w stymulowanych Con. A. mysich spleonocytach T”  
Bożena Kamińska — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego  
PAN, Warszawa

„Klonowanie genu metylazy Fok T”

Tadeusz Kaczorowski — Z-d Mikrobiologii, Uniw. Gdański, Gdańsk

“Zmiany aktywności proteolitycznej krwinki czerwonej podczas starzenia się”  
oraz “Aktywność proteolityczna silnie związana z BPA”

Maria Gaczyńska — Katedra Biofizyki, Uniwersytet Łódzki Łódź

„Czy tolerancja na glin u pszenicy zależy od kalmoduliny”

Jan Ślaski — Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Z-d  
Biochemii i Fizjologii Roślin, Radzików

„Właściwości kompleksów transkrypcyjnych RNA polimerazy III z genu 5S  
rRNA i S rRNA”

Paweł Glańc — Instytut Biochemii, Ak. Rolnicza, Poznań



EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF ...

Abstract

The purpose of this study is to investigate the effect of ...

The results of the experiment show that ...

It is concluded that ...

The authors would like to thank ...

References

1. ...

2. ...

3. ...

4. ...

5. ...

6. ...

7. ...

8. ...

9. ...

10. ...

11. ...

12. ...

13. ...

14. ...

15. ...

SPIS TREŚCI

Z HISTORII BIOCHEMII:

- S. Niemierko — Z historii siedemdziesięcioletniej działalności Instytutu Biologii Doświadczalnej imienia Marcelego Nenckiego . . . . . 3

ARTYKUŁY:

- J. Barańska, J. Zborowski — Biosynteza i transport kwasu fosfatydowego w komórkach zwierzęcych . . . . . 15
- R. Jasińska, J. Zborowski — Biosynteza i transport fosfolipidów w komórkach drożdży . . . . . 29
- A. Godzik, G. Boguta, T. Wesołowski — Bazy danych w biochemii — zastosowanie do analizy oraz przewidywania cech i funkcji białek . . . . . 45
- W. Leśniak — Interakcja kalmoduliny z jej białkami docelowymi . . . . . 63
- V. Sączyńska — Kalmodulina i jej rola w regulacji metabolizmu komórki roślinnej . . . . . 89
- A. Konieczny — Leghemoglobiny i geny leghemoglobinowe . . . . . 109
- T. Szumiło — Struktura i biosynteza glikoprotein roślinnych połączonych N-glikozydowo . . . . . 125
- A. Tukendorf — Białka i peptydy wiążące metale ciężkie . . . . . 141
- K. M. Janas — Regulacja aktywności amoniakolizazy L-fenylalaniny i poziomu czerwonych pigmentów w roślinach przez kwas L-amino-2-fenylotylofosfoniowy . . . . . 155

SŁOWNICTWO:

- Słownictwo prenoli (Z. A. Wojciechowski) . . . . . 163
- Słownictwo retinoidów (Z. A. Wojciechowski) . . . . . 172
- Słownictwo i synteza kwasu foliowego i związków pokrewnych (B. Rzeszotarska) . . . . . 183
- Zalecenia Komisji Słownictwa Biochemicznego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . . 189

SPRAWOZDANIA ZE ZJAZDÓW I KONFERENCJI NAUKOWYCH

- Międzynarodowa Letnia Szkoła na temat „Nowe Techniki i Kierunki Badań w pracach nad fotosyntezą, Spetsai, 1988 (J. Gemel) . . . . . 191
- IV Sympozjum Fluorowe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie (Z. Machoy) . . . . . 192

Z DZIAŁALNOŚCI POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO:

- Nagrody . . . . . 195

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997

1997



CONTENTS

A. HISTORY OF BIOCHEMISTRY:

- S. Niemierko—The Nencki Institute of Experimental Biology: seventy years of activity 3

ARTICLES:

- J. Barańska, J. Zborowski—Biosynthesis and transport of phosphatidic acid in animal cells (Dept. of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa) . . . . . 15
- R. Jasińska, J. Zborowski—Biosynthesis and transport of phospholipids in yeast cells (Dept. of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa) . . . . . 29
- A. Godzik, G. Boguta, T. Wesolowski—Data bases in biochemistry—its applications to analysis and prediction of protein properties and functions (Dept. of Biophysics, Institute of Experimental Physics, University of Warsaw, Warszawa) . . . . . 45
- W. Leśniak—Interaction of calmodulin with its target proteins (Dept. of Muscle Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa) . . . . . 63
- V. Sączyńska—Calmodulin and its role in regulation of plant cell metabolism (Dept. of Enzymology, Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa) . . . . . 89
- A. Konieczny—Leghemoglobins and leghemoglobin genes (Institute of Biochemistry, University of Agriculture, Poznań) . . . . . 109
- T. Szumiło—Structure and biosynthesis of plant N-linked glycoproteins (Dept. of Biochemistry and Drug Metabolism, Medical School, Lublin) . . . . . 125
- A. Tukendorf—Proteins and peptides binding heavy metals (Dept. of Plant Physiology, Institute of Biology, M. Curie-Skłodowska University, Lublin) . . . . . 141
- K. M. Janas—Control of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and red pigments level in plants by 1-amino-2-phenylethylphosphonic acid (Lab. of Plant Growth Regulation Institute of Physiology and Cytology, University of Łódź, Łódź) . . . . . 155

NOMENCLATURE

- Prenol nomenclature (Z. A. Wojciechowski) . . . . . 163
- Nomenclature of retinoids (Z. A. Wojciechowski) . . . . . 172
- Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds (B. Rzeszotarska) . . . . . 183
- Polish Biochemical Nomenclature—short reports . . . . . 189

SCIENTIFIC MEETING AND CONFERENCES:

- NATO/FEBS Summer School—“Techniques and New Developments in Photosynthesis”, Spetsai, 1988 (J. Gemel) . . . . . 191
- Report of a local Meeting . . . . . 192

ACTIVITY OF POLISH BIOCHEMICAL SOCIETY

- Prizes . . . . . 195



Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuły tabel i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść zaznaczając z jakich(jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzorów cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10 × 15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie 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.

**Piśmiennictwo:** w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiając przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa obejmuje zatem prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB). Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednatomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanej przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) — podane na następujących przykładach:

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

**Załączniki:** każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów, aby zabezpieczyć maszynopis i ilustracje przed pocięciem.



## WARUNKI PRENUMERATY

Prenumeratory indywidualni, instytucje i zakłady pracy zamawiają prenumeratę w Oddziałach RSW „Prasa — Książka — Ruch” właściwych dla miejsca zamieszkania dla siedziby prenumeratora.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XIII Oddział Warszawa 370044-1195-139-11.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy. Na życzenie prenumeratora dostawa może odbywać się drogą lotniczą; koszty dostawy lotniczej w pełni pokrywa prenumerator.

### Terminy przyjmowania prenumeraty:

- I półr. i na cały rok następny — na kraj do 10 XI.
  - na zagranicę do 31 X.
- na pozostałe okresy prenumeraty: do 1-go dnia każdego m-ca poprzedzającego okres prenumeraty roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the  
Foreign Trade Enterprise

**ARS POLONA**

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7. Poland

Our bankers:

**BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.**

Post. Biochem., 35 z. 1-2, s. 1-200  
Indeks 36969