

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 38, NR 3, 1992

<b>Kaldesmon .....</b>	<b>90</b>
<b>Cykl komórkowy, regulacja .....</b>	<b>98</b>
<b>Fosfatydyloinozytole roślin .....</b>	<b>107</b>
<b>Katalityczny RNA .....</b>	<b>112</b>
<b>Produkty degradacji substancji P ..</b>	<b>123</b>
<b>NAG — enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa .....</b>	<b>127</b>
<b>Analiza obrazów „MAGICAL” .....</b>	<b>132</b>

oferuje:

odczynniki diagnostyczne  
i biochemiczne

(ceny katalogowe)



Boehringer Mannheim GmbH

odczynniki chemiczne

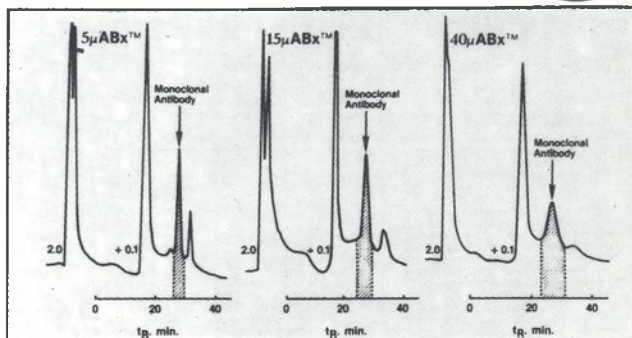
(ceny katalogowe)

**Riedel-de Haën**

Über 160 Jahre Erfahrung in der Chemie

Biuro Handlowe:  
PL-01-113 WARSZAWA  
ul. Ulrychowska 26  
Tel. Fax 37-42-35  
Tlx 6105756 MUL LU

**Jednakowa powierzchnia  
wszystkich ziaren  
BAKERBOND**

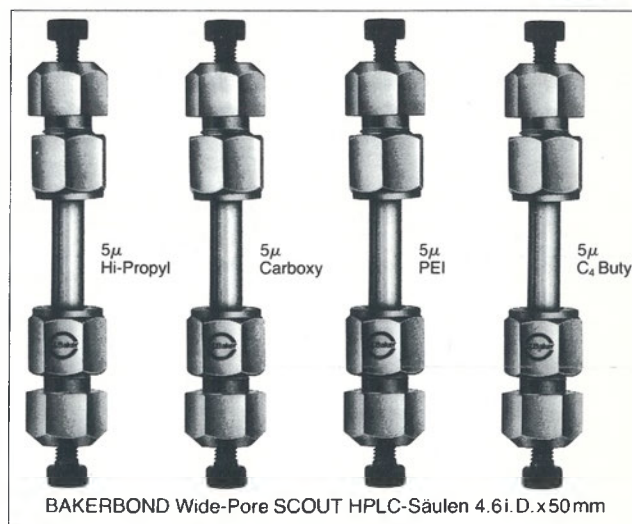


**Szeroka gama zastosowań faz BAKERBOND**

Chemicznie związane fazy do chromatografii ciecowej BAKERBOND niezależnie od granulacji krzemionki 5 µm, 15 µm, 40 µm, mają zawsze jednakowe chemiczne pokrycie powierzchni. Jednolitość pokrycia grupami funkcyjnymi jest gwarantowana dla wszystkich serii produkcyjnych. Umożliwia to uzyskiwanie stałych wyników oraz łatwość przejścia od procedury analitycznej, poprzez rozdział preparatywny do oczyszczania na skalę przemysłową. Informacje szczegółowe:

EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, skr. poczt. 46,  
90-980 Łódź-7, tel. 81 31 40, tix 88 53 67 zab,  
fax 81 52 83 (Sklad celny ul. Tylna 3)

**Szybki rozdział białek!  
Cztery kolumny HPLC  
BAKERBOND W-P SCOUT**



**Wybór metody + krótka analiza HPLC**

Za pomocą kolumn z wypełnieniem szerokoporowatym BAKERBOND W-P SCOUT (4,6 x 50 mm) można w krótkim czasie opracować metodę rozdziału oraz przeprowadzić analizę. Kolumna Hi-propylowa ma właściwości uniwersalne i nadaje się do rozdziału wszystkich białek. Przy pomocy kolumny karboksylowej (WCX) można rozdzielać białka o punkcie izoelektrycznym 6-12. Kolumna PEI (WAX) szczególnie dobrze rozdziela białka mające punkt izoelektryczny 7-3. Dla hormonów, stabilnych białek i niskocząsteczkowych peptydów o ilości reszt aminokwasowych < 100 poleca się kolumnę butylową C<sub>4</sub>. Każda kolumna ma pojemność 90 mg/g w jednym rozdziale chromatograficznym.

Broszurę na temat szerokoporowatych faz BAKERBOND W-P można otrzymać w:  
EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, skr. poczt. 46,  
90-980 Łódź-7, tel. 81 31 40, tix 88 53 67 zab,



## WYDAWCA

Editor  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
Polish Biochemical Society  
16 Freta Street  
00-227 Warszawa  
Poland

Drukarnia Naukowo-Techniczna  
Mińska 65  
03-828 Warszawa

## REDAKCJA

Editorial Board

## REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 31-24-03

## REDAKTORZY

Editors  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 49-04-15  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
tel. 20-03-81 w. 488  
JACEK KUŹNICKI  
tel. 659-85-71  
fax: (22) 22-53-42  
JOLANTA GRZYBOWSKA  
tel. 10-50-71 w 155

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
JERZY BUCHOWICZ  
(Warszawa)  
BARBARA GOŁOS  
(Warszawa)  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
(Warszawa)  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
(Warszawa)  
JOLANTA SKANGEL-  
KRAMSKA  
(Warszawa)  
GABRIELA SMOLEŃSKA  
(Warszawa)  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
(Warszawa)

## ADRES REDAKCJI

Address  
REDAKCJA  
„POSTĘPÓW BIOCHEMII”  
INSTYTUT BIOLOGII  
DOŚWIADCZALNEJ  
im. M. Nenckiego PAN  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa  
tel. (2) 659-85-71 w. 332  
fax: (22) 22-53-42  
telex: 81-48-92

## SPIS TREŚCI CONTENTS

**Kaldesmon — regulator skurczu mięśni gładkich i zjawisk ruchu w komórkach niemięśniowych**  
Caldesmon — a regulator of smooth muscle and nonmuscle motile systems  
ROBERT MAKUCH, RENATA DĄBROWSKA ..... 90

**Regulacja cyklu komórkowego — historii i komplikacji ciąg dalszy**  
Regulation of cell cycle — continuation of history and complications  
BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT ..... 98

**Metabolizm fosfatydyloinozytoli i ich rola w przekazywaniu informacji w komórkach roślinnych**  
Metabolism of phosphoinositides and their role in signal transduction in plant cells  
MAŁGORZATA CZARNY, HANNA PODDANA, JOLANTA BARAŃSKA ..... 107

**Rybonukleaza P — przykład katalitycznej aktywności RNA**  
Ribonuklease P — an example of catalytical RNA activity  
JOANNA SADOWSKA ..... 112

**Degradacja substancji P — biologiczna aktywność produktów**  
Degradation of substance P — biological activity of the products  
ZBIGNIEW HRABEC, ELŻBIETA HRABEC, JANUSZ GREGER, LILLA LACHOWICZ ..... 123

**N-Acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidaza — enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa**  
N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase — enzyme Tay-Sachss and Sandhoffs diseases  
KRZYSZTOF ZWIERZ, JAROSŁAW JUSZKIEWICZ, LESZEK ARCIUCH, ANDRZEJ GINDZIEŃSKI ..... 127

**Automatyczne metody analizy obrazów — zastosowanie w biologii komórkowej**  
Automatic image analysis — applied in cell biology  
KRYSZYNA FILIPIAK, JERZY B. WARCHOŁ ..... 132

Wskazówki dla autorów ..... okładka

# Kaldesmon — regulator skurczu mięśni gładkich i zjawisk ruchu w komórkach niemięśniowych

## Caldesmon — a regulator of smooth muscle and nonmuscle motile systems

ROBERT MAKUCH<sup>1</sup>  
RENATA DĄBROWSKA<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Odkrycie kaldesmonu
- III. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa
- IV. Formy polimorficzne
- V. Właściwości fizykochemiczne
- VI. Właściwości funkcjonalne
  - VI-1. Oddziaływanie z innymi białkami aparatu kurczliwego mięśni gładkich
  - VI-2. Wpływ na aktywność ATPazy aktomiozynowej i ruch filamentów aktynowych na immobilizowanej miozynie
  - VI-3. Domeny funkcjonalne
- VII. Organizacja strukturalna kaldesmonu w filamentach cienkich
- VIII. Molekularne podstawy zależnej od jonów  $Ca^{2+}$  regulacji skurczu mięśni gładkich przez kaldesmon
- IX. Udział kaldesmonu w zjawiskach ruchu w komórkach niemięśniowych

### Contents:

- I. Introduction
- II. Discovery of caldesmon
- III. Subcellular localization
- IV. Polymorphic forms
- V. Physicochemical properties
- VI. Functional properties
  - VI-1. Interactions with other proteins of smooth muscle contractile apparatus
  - VI-2. Effects on actomyosin ATPase activity and movement of actin filaments on immobilized myosin
  - VI-3. Functional domains
- VII. Structural organization of caldesmon in thin filaments
- VIII. Molecular basis of  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of smooth muscle contraction by caldesmon
- IX. Participation of caldesmon in nonmuscle motile phenomena

### I. Wstęp

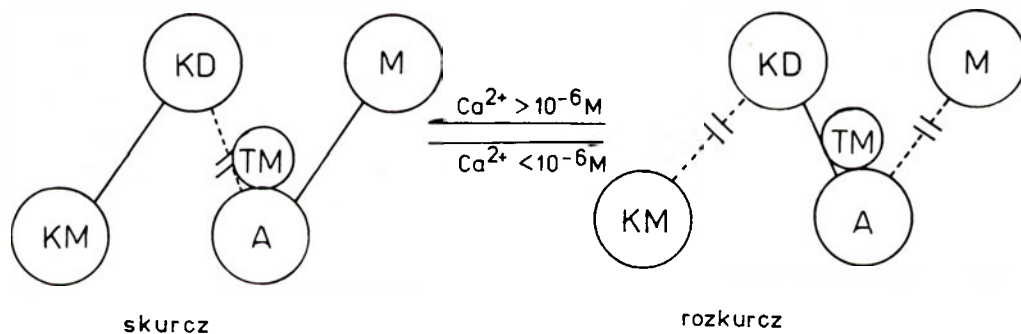
Tkanki mięśniowe, dzięki wysokiemu stopniowi wyspecjalizowania oraz dużej jednorodności, stanowią doskonały układ doświadczalny do biochemicznych badań procesów odbioru i przekazywania sygnałów zewnątrzkomórkowych, roli przekaźników 2-go rzędu (szczególnie jonów  $Ca^{2+}$ ), metabolizmu energetycznego, a zwłaszcza molekularnych podstaw skurczu. Stosunkowo łatwy jest także makroskopowy pomiar tak ważnych fizycznych parametrów skurczu, jak siła i czas jego trwania. Wyniki takich badań mają bardzo wiele odniesień do zjawisk ruchu w komórkach niemięśniowych.

Stosunkowo najlepiej poznano mechanizm działania i sposoby regulacji skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych: szkieletowych i sercowego (patrz artykuły przeglądowe [1-4]). Znacznie mniej wiemy o mięśniach gładkich i — pod pewnymi względami zbliżonymi do nich — układach kurczliwych występujących w zasadzie we wszystkich komórkach niemięśniowych kręgowców oraz mięśniach zwierząt niższych. Komórki mięśni gładkich cechuje podwójny układ regulacji skurczu, przy czym obie jego składowe wpływają na dwa rodzaje filamentów zaangażowanych w generacji siły [5]. Podstawowy mechanizm regulacji związany jest z modyfikacją filamentów miozynowych polegającą na fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny przez zależną od jonów  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny kinazę lekkich łańcuchów miozyny, co inicjuje skurcz. Druga składowa, znacznie mniej poznana, polega na regulacji, czy też modulacji, skurczu poprzez białka związane z filamentami aktynowymi. Takim białkiem jest kaldesmon, będący przedmiotem niniejszego opracowania.

<sup>1</sup> mgr, <sup>2</sup> prof. dr hab., Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

## II. Odkrycie kaldesmonu

Kalmodulin — nazwa pochodzi od kombinacji słów kalmodulina i *desmos* (gr. wiązanie) i oznacza „wiązący kalmodulinę” — po raz pierwszy opisali w 1981 r. Kakiuchi i współautorzy [6] jako główne białko wiążące aktynę i kalmodulinę w mięśniach gładkich. Te właściwości kaldesmonu pozwalały przypuszczać, że może on stanowić element układu regulującego skurcz mięśni gładkich działającego poprzez cienkie filamenty (filamenty aktynowe). Występowanie w mięśniach gładkich takiego układu sugerowano już od pewnego czasu [7-9]. Zespół Kakiuchiego [10, 11] przedstawił pierwszą hipotezę działania kaldesmonu, tzw. mechanizmu flip-flop (Ryc. 1). Według tej hipotezy wiązanie kaldesmonu z aktyną jest regulowane przez stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . W obecności mikromolowych stężeń jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , kalmodulina wiąże się z kaldesmonem, a kompleks taki nie wiąże się z aktyną. W nieobecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  kalmodulina nie wiąże się z kaldesmonem. Wiązanie kaldesmonu z aktyną wpływa na oddziaływanie aktyna-miozyna i towarzyszy mu hamowanie aktywności aktywowanej aktyną ATPazy miozynowej. Ta pierwsza hipoteza działania kaldesmonu została później znacznie zmodyfikowana i uzupełniona licznymi nowymi danymi.



## III. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa

Przeprowadzone przez Smalla i współpracowników [12, 13] immunofluorescencyjne badania komórkowej lokalizacji poszczególnych białek cytoszkieletu i aparatu kurczliwego mięśni gładkich wykazały, że występującym w nich filamentom aktynowym towarzyszą różne białka. W domenie cytoszkieletowej jest to filamina i białka filamentów pośrednich, a w domenie „kurczliwej” miozyna i kaldesmon. Kolokalizacja kaldesmonu i układu aktomiozynowego potwierdza prawdopodobieństwo udziału kaldesmonu w regulacji skurczu mięśni gładkich. Wyniki te zgodne są z wynikami zespołu Lehmana [14], który stosując przeciwciała skierowane przeciwko kaldesmonowi oraz filaminie rozdzielił metodą immunoprecypitacji filamenty aktynowe z mięśni gładkich bogate w te białka. Mechanizm segregacji filamentów aktynowych na dwie populacje jest nieznan i wydaje się nie być związany z różnicami występujących w nich izoform aktyny [15].

Badania immunofluorescencyjne wykazały, że kaldesmon występuje nie tylko w mięśniach gładkich, lecz także w różnych komórkach i tkankach niemięśniowych. Białko to wykryto m.in. w erytrocytach [16], płytkach krwi [17, 18], limfocytach [19], fibroblastach [20], komórkach nabłonkowych jelita [21, 22] oraz w wielu liniach komórkowych w hodowlach [21, 23-25]. Wszędzie tam komórkowa lokalizacja kaldesmonu pokrywa się z lokalizacją filamentów aktynowych.

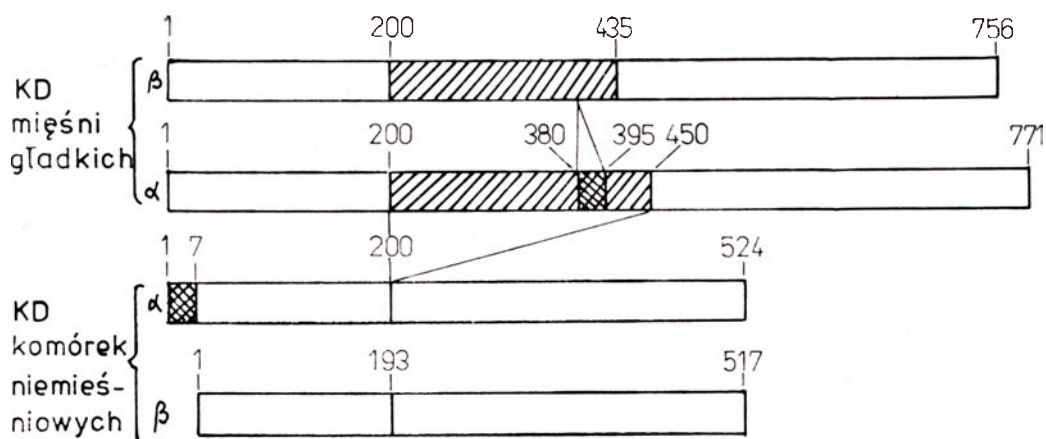
## IV. Formy polimorficzne

Kaldesmon występujący w mięśniach gładkich różni się od kaldesmonu występującego w komórkach niemięśniowych masą cząsteczkową. Masa cząsteczkowa kaldesmonu z mięśni gładkich, wyznaczona drogą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS wynosi około 120-140 kDa, a jego niemięśniowego odpowiednika około 70-83 kDa. Wartości te jednak, jak się okazało po zsekwencjonowaniu obu form polimorficznych, są zawyżone na skutek zaburzonej migracji kaldesmonu w żelach z SDS [26, 27]. Prawdziwa masa cząsteczki kaldesmonu z mięśni gładkich żółdków kurzych wynosi 87-89 kDa [28, 29], a masa cząsteczkowa kaldesmonu niemięśniowe-

Ryc. 1. Udział kaldesmonu i kalmoduliny w zależności od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  regulacji skurczu mięśni gładkich na zasadzie mechanizmu „flip-flop” [11].  
KD — kaldesmon,  
KM — kalmodulina,  
A — aktyna,  
M — miozyna,  
TM — tropomiozyna.

go waha się w granicach 58-65 kDa [30-32]. Ponadto, zarówno kaldesmon z mięśni gładkich, jak i komórek niemięśniowych, występuje w postaci dwóch izoform:  $\alpha$  i  $\beta$ , różniących się nieco sekwencją aminokwasów ( $\alpha$  posiada większą masę cząsteczkową niż  $\beta$ ) [33]. Porównanie sekwencji wszystkich czterech izoform kaldesmonu kury (Ryc. 2) wskazuje na to, że różnią się one jedynie obecnością lub brakiem pewnych fragmentów sekwencji aminokwasowych. Pozwala to przypuszczać, że wszystkie izoformy mogą pochodzić z jednego genu i powstawać na skutek alternatywnego usuwania intronów i składania sekwencji kodujących. Nie wykluczono dotąd jednak możliwości występowania w genomie jednego organizmu więcej niż jednego genu kodującego kaldesmon. Interesujące jest, że podczas różnicowania komórek mięśniowych zachodzi wymiana ulegającej ekspresji formy kaldesmonu z niemięśniowej na mięśniową. Odwrotne zjawisko obserwuje się badając ekspresję kaldesmonu w komórkach mięśni gładkich w hodowlach, gdzie często zachodzi ich modulacja fenotypowa [22].





Ryc. 2. Porównanie sekwencji aminokwasowych polimorficznych form kal-desmonu z mięśni gładkich i z komórek niemięśniowych kury (na podst. [28-31]).

▨ - delecje odróżniające izoformy  $\alpha$  i  $\beta$

▧ - delecje odróżniające kal-desmon mięśniowy i niemięśniowy

## V. Właściwości fizykochemiczne

Ważniejsze właściwości molekularne i fizykochemiczne różnych izoform kal-desmonu podsumowano w tabeli 1. Dane hydrodynamiczne wskazują na wysoce asymetryczny kształt cząsteczki kal-desmonu [34-36]. Mikroskopia elektronowa potwierdziła, że cząsteczka ta jest wydłużona i giętka (Ryc. 3a) [12, 37-39]. Długość cząsteczek kal-desmonu z mięśni gładkich wynosi około 75-80 nm, a średnica około 2 nm. Cząsteczki kal-desmonu z komórek niemięśniowych są krótsze. W roztworze kal-desmon może tworzyć multimeryczne agregaty na skutek utleniania grup tiolowych i powstawania międzycząsteczkowych mostków dwusiarczkowych [38].

moduliną tylko w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Kal-desmon wiąże się z aktyną ze stałą powinowactwa w zakresie  $10^7 \text{ M}^{-1}$  i stechiometrią 1 kal-desmon na 7-10 monomerów aktyny [41]. Tropomiozyna, która sama wiąże się z kal-desmonem ze stechiometrią 2:1 i stałą powinowactwa w zakresie  $10^6 \text{ M}^{-1}$  [42-45], zwiększa powinowactwo kal-desmonu do aktyny około 4-krotnie. Stała wiązania kalmoduliny z kal-desmonem w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wynosi około  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . W porównaniu z innymi białkami wiążącymi kalmodulinę w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , takimi jak kinaza lekkich łańcuchów miozyny (gdzie  $K_a = 10^9 \text{ M}^{-1}$ ), wiązanie kalmoduliny z kal-desmonem jest słabe. Stwierdzono jednakże, że niektóre białka homologiczne z kalmoduliną (np. białko S-100) mają większe powinowactwo do kal-des-

Tabela 1

Właściwości fizykochemiczne kal-desmonu

Właściwości	Izoforma kal-desmonu				Piśmiennictwo
	mięśniowa		niemięśniowa		
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	
Masa cząsteczkowa (Da)					
na podst. elektroforezy na żelu poliakryloamidowym z SDS	120000—140000		76000—80000		21,24
na podst. równowagi sedymentacyjnej	$90000 \pm 4000$		$66000 \pm 2000^1$		34,35
na podst. sekwencji aminokwasowej	88743	86954	60174	58844	28-31
Właściwości hydrodynamiczne					
promień Stokesa (nm)	8,7		6,7 <sup>1</sup>		34,35
współczynnik sedymentacji $S^0$ 20W (S)	$2,65 \pm 0,05$		$2,49 \pm 0,02^1$		34,35
wymiary cząsteczki (nm)	ok. $76 \times 2$		ok. $55 \times 2$		12,34,37,40

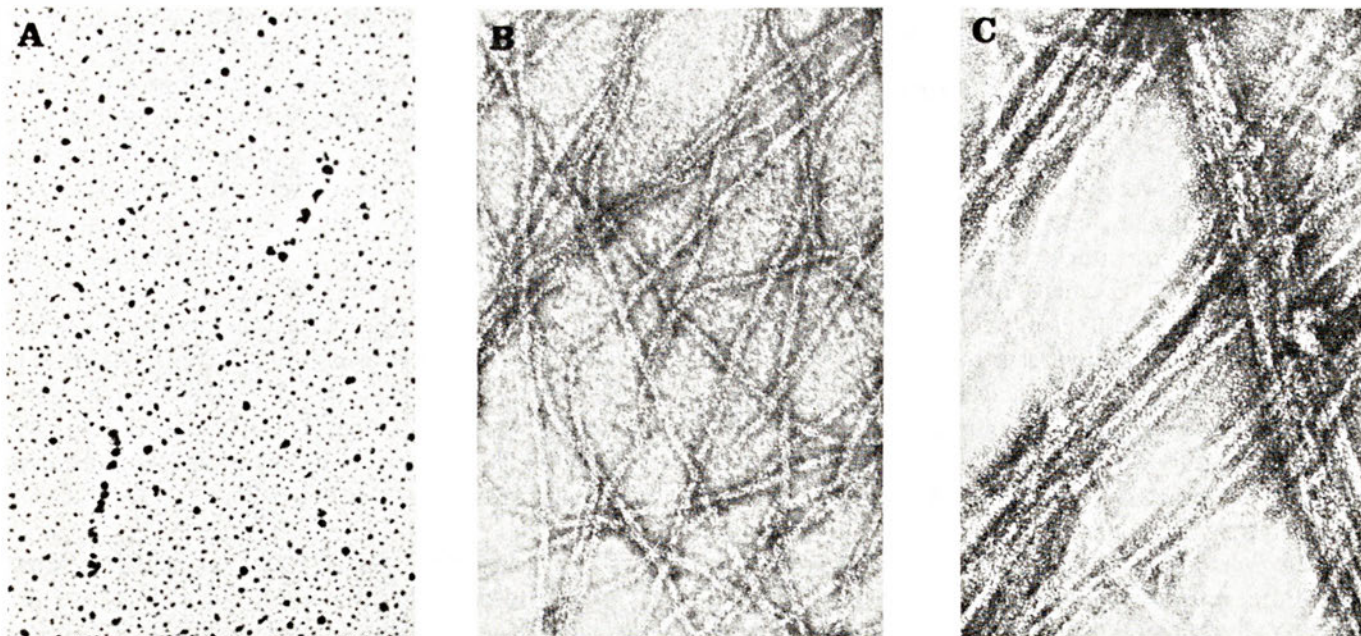
<sup>1</sup> Dane dotyczące kal-desmonu wątroby królika. Pozostałe dane dotyczą izoform kal-desmonu z mięśni gładkich i komórek niemięśniowych kury.

## VI. Właściwości funkcjonalne

### VI-1. Oddziaływanie kal-desmonu z innymi białkami aparatu kurczliwego mięśni gładkich

Jak uprzednio wspomniano, kal-desmon wiąże się z aktyną niezależnie od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , a z kal-

monu [46-48]. Kal-desmon wiąże się także z miozyną mięśni gładkich, zarówno ufosforylowaną, jak i nieufosforylowaną. W obecności ATP kal-desmon wiąże się z filamentami miozyny mięśni gładkich ze stechiometrią 1 cząsteczka kal-desmonu na 1 cząsteczkę miozyny i  $K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$ , w nieobecności ATP wiązanie jest słabsze [49-52].

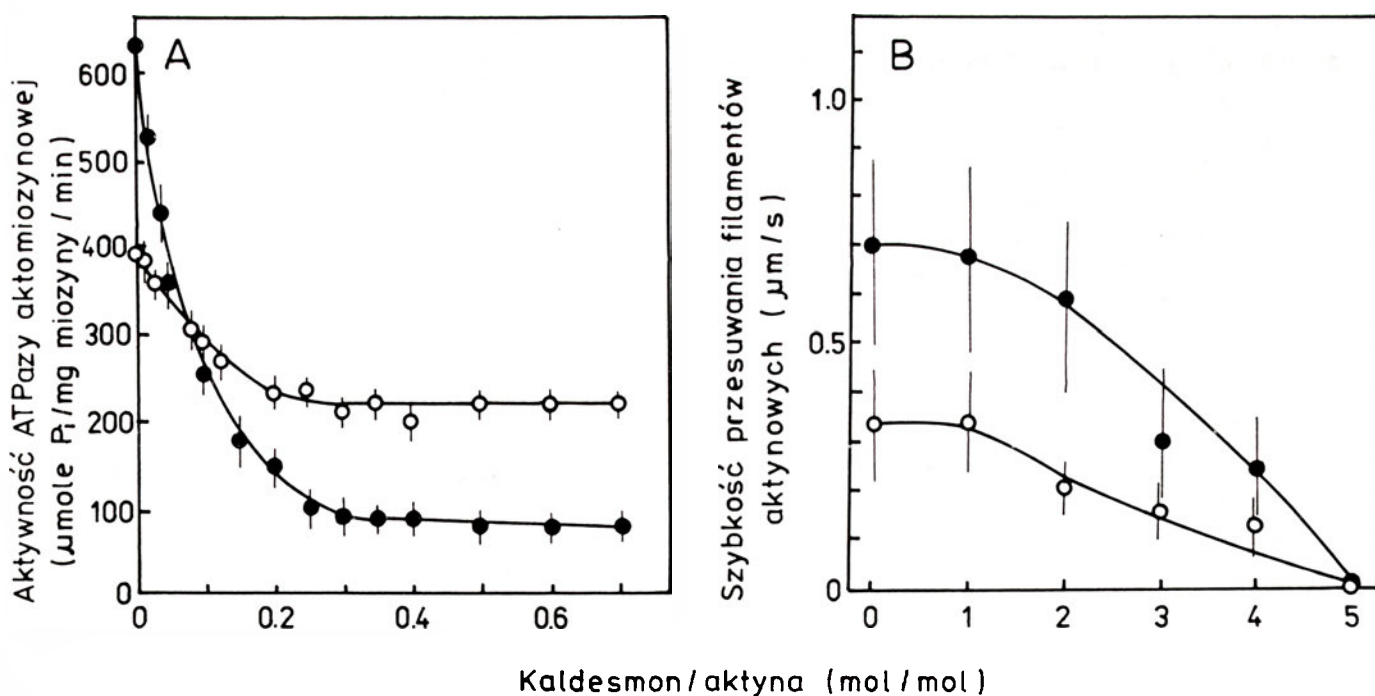


Ryc. 3. A. Obraz cząsteczek kaldesmonu otrzymany w mikroskopie elektronowym z zastosowaniem napyłania obrotowego preparatu [37]; B. Obraz filamentów aktynowych w nieobecności kaldesmonu uzyskany w mikroskopie elektronowym z zastosowaniem barwienia negatywnego; C. Wiązki filamentów aktynowych powstające w obecności kaldesmonu (obraz otrzymany analogicznie jak w B). Elektronogramy B i C wykonane przez B. Gałązki wicz.

## VI-2. Wpływ na aktywność ATPazy aktomiozynowej i ruchliwość filamentów aktynowych na immobilizowanej miozynie

Wiązaniu kaldesmonu z filamentami aktynowymi towarzyszy, wzmacniane przez tropomiozynę i znoszone w obecności  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmoduliny, hamowanie aktywności ATPazy aktomiozynowej [53-59] i superprecypitacji żelu aktomiozynowego [55, 60]. Hamowanie tych parametrów, będących *in vitro* wykładnią skurczu mięśnia, znoszone jest również pod wpływem

fosforylacji kaldesmonu przez zależną od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny kinazę białkową II [61, 62] i kinazę C [63]. Kaldesmon zdolny jest także do obniżania szybkości ruchu filamentów aktynowych na powierzchni szklanej opłaszczonej miozyna, ale przy znacznie wyższym stosunku tego białka do aktyny niż wymagany do hamowania ATPazy aktomiozynowej (Ryc. 4) [64, 65]. Różnica ta wynika prawdopodobnie ze słabszego wiązania obu białek przy stosowanych w mikroskopii stężeniach aktyny.



Ryc. 4. Hamowanie przez kaldesmon aktywności ATPazy aktomiozynowej (A) i przesuwania filamentów aktynowych wzdłuż immobilizowanych cząsteczek miozyny (B). Pomiary wykonano w nieobecności (puste symbole) i obecności (pełne symbole) tropomiozyny (wg [56, 65]).



### VI-3. Domeny funkcjonalne

W prowadzonych w naszej pracowni badaniach mających na celu lokalizację miejsc wiązania aktyny i kalmoduliny w cząsteczce kaldesmonu, zastosowaliśmy ograniczoną proteolizę tego białka  $\alpha$ -chymotrypsyną. Trawi ona cząsteczkę kaldesmonu na kilka fragmentów. Fragmentacja nie wpływa na zdolność kaldesmonu do hamowania ATPazy aktomiozynowej, ponieważ właściwość tę zachowuje fragment o masie cząsteczkowej 40 kDa (wg elektroforezy) lub 34 kDa (wg sekwencji) (Ryc. 5). Fragment ten zachowuje także zdolność wiązania aktyny i kalmoduliny. Może on ulec, bez utraty aktywności, dalszej degradacji do polipeptydu o masie cząsteczkowej 18 kDa. Oba wymienione fragmenty hamują aktywność ATPazy aktomiozynowej w stopniu podobnym do kaldesmonu [66]. Ponieważ strawienie kaldesmonu karboksypeptydazą Y do polipeptydu o masie cząsteczkowej około 115 kDa powoduje zniesienie jego wpływu na aktywność ATPazy aktomiozynowej, jak również zdolności wiązania z aktyną i kalmoduliną [67], domena funkcjonalna musi znajdować się w C-końcowym rejonie cząsteczki kaldesmonu. Wyniki te znalazły potwierdzenie w badaniach innych zespołów [68-70]. Ostatnio udało się dokładniej określić miejsce wiązania aktyny i kalmoduliny w C-końcowym 10 kDa fragmencie kaldesmonu [71].

Wymienione powyżej miejsce wiążące aktynę nie jest jedynym w cząsteczce kaldesmonu. Drugie takie miejsce, ale o znacznie niższym powinowactwie do aktyny, występuje w trombinowym fragmencie o masie 15 kDa stanowiącym N-końcowy odcinek C-końcowego 34 kDa fragmentu (Ryc. 5) [72-74].

Fragment o masie cząsteczkowej 34 kDa, oprócz dwóch miejsc wiązania aktyny i miejsca wiązania kalmoduliny, zawiera także sekwencję aminokwasową przypominającą sekwencję wiążącego tropomiozyny składnika troponiny, troponiny T [28]. Sekwencja ta jest potencjalnym miejscem wiążącym tropomiozyny.

Region wiążący miozyny znajduje się w N-końcowej części cząsteczki kaldesmonu [50, 52, 75]. W sąsiedztwie miejsca wiązania miozyny występuje, jak się wyda-

je, drugie (o niższym powinowactwie) miejsce wiązania kalmoduliny [37, 76].

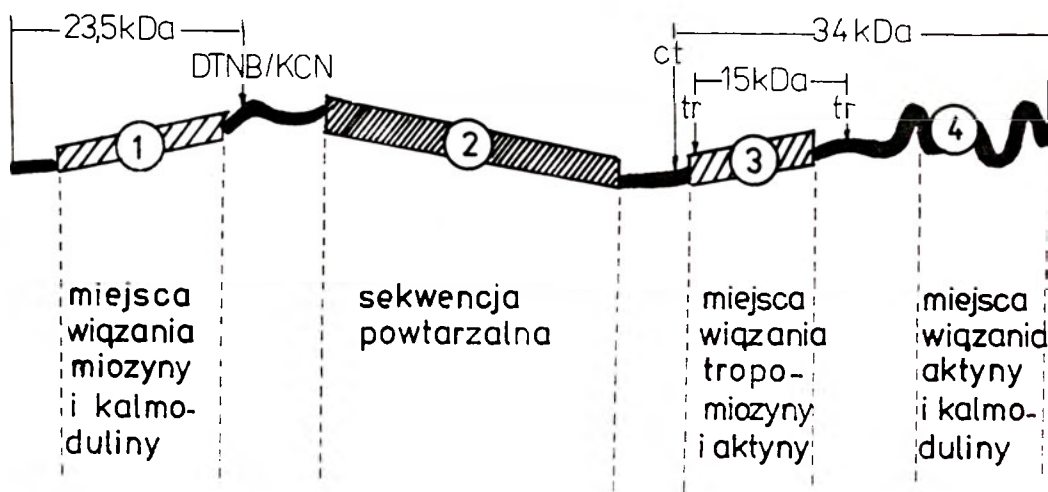
Centralny region cząsteczki kaldesmonu mięśniowego ma prawdopodobnie strukturę  $\alpha$ -helikalną, stabilizowaną licznymi mostkami solnymi [77] i zawiera kilkakrotnie powtórzoną sekwencję 15 aminokwasów [28, 29]. Funkcja tego regionu pozostaje na razie nieznaną; być może jest ona czysto strukturalna i polega na rozdzieleniu domen wiążących aktynę/tropomiozyny i miozyny. Region ten jest nieobecny w kaldesmonie z komórek niemięśniowych (Ryc. 2) [30, 31, 78].

Ostatnio Marston i Redwood [33], na podstawie danych pochodzących z wielu pracowni, zaproponowali wyróżnienie w cząsteczce kaldesmonu czterech domen (Ryc. 5).

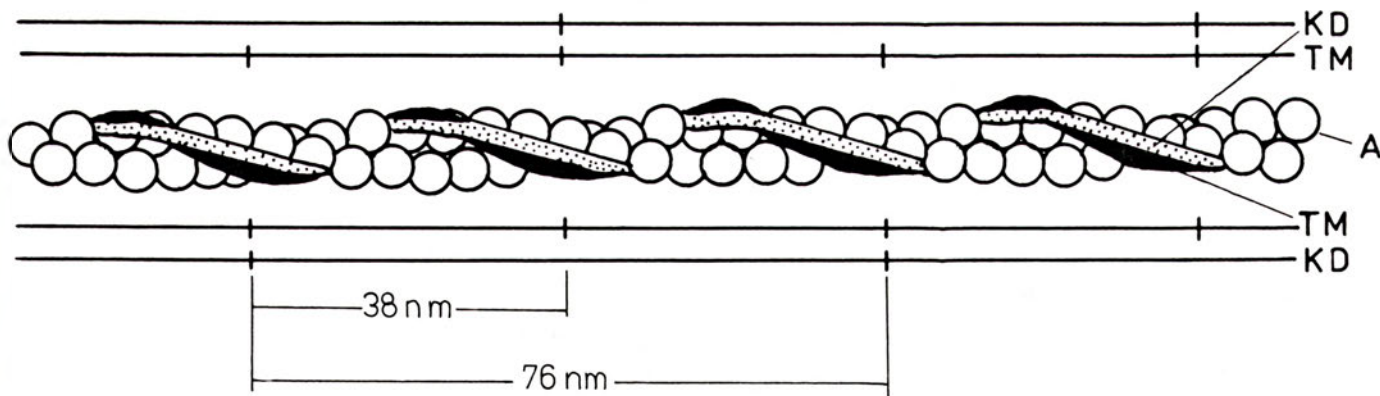
### VII. Organizacja strukturalna kaldesmonu w filamentach cienkich

Prawdopodobne rozmieszczenie cząsteczek kaldesmonu w cienkim filamencie mięśni gładkich przedstawiono na Ryc. 6. Schemat opracowano na podstawie wyników badań otrzymanych przy zastosowaniu przeciwciał skierowanych przeciwko fragmentom kaldesmonu: C-końcowemu o masie 34 kDa i N-końcowemu o masie 23,5 kDa. Oba przeciwciała powodowały boczną agregację cienkich filamentów z uwidocznieniem wzoru prążków o powtarzalności wynoszącej około 38 nm [39, 79]. Wyniki te sugerują, że, podobnie jak cząsteczki tropomiozyny, cząsteczki kaldesmonu rozmieszczone są w sposób ciągły wzdłuż całej długości polimeru aktynowego. Miejsca wiązania aktyny na kaldesmonie znajdują się tylko w C-końcowej części 76 nm cząsteczki, bardzo prawdopodobne jest zatem, że cząsteczki kaldesmonu zachodzą na siebie, a tropomiozyna bierze udział w określaniu pozycji kaldesmonu na filamencie aktynowym. Ponieważ wyznaczona stechiometria kaldesmonu i tropomiozyny wynosi 1 : 2, sugeruje się, że kaldesmon wiąże się z co drugą cząsteczką tropomiozyny wzdłuż każdej z dwu nici superhelisy aktynowej. Taka organizacja filamentu cienkiego tłumaczyłaby niemal identyczną periodyczność rozmieszczenia kaldesmonu i tropo-

Ryc. 5. Domenowa struktura kaldesmonu. Na rycinie zaznaczono położenie fragmentów kaldesmonu o masach cząsteczkowych 23,5 kDa, 34 kDa i 15 kDa otrzymanych w wyniku działania odpowiednio: DTNB/KCN, chymotrypsyny i trombiny. Numery oznaczają poszczególne domeny (modyfikacja schematu wg [33]).







Ryc. 6. Rozmieszczenie cząsteczek kaldesmonu na filamentach aktywnych mięśni gładkich. Cząsteczki kaldesmonu (KD) o długości 76 nm umieszczone są podobnie jak cząsteczki tropomiozyny (TM) o długości 38 nm w rowkach superhelisy filamentów aktywnych (A). Wg [39].

miozyny (38 nm) na cienkich filamentach, która wynikać może z równoległego ułożenia 76 nm cząsteczek przesuniętych względem siebie o 38 nm. Dane z badań dyfrakcji rentgenowskiej natywnych i rekonstruowanych cienkich filamentów mięśni gładkich ujawniły, że kaldesmon i tropomizyna występują w podobnym promieniu od środka filamentu, wynoszącym odpowiednio 4,0 i 3,5 nm (D. Popp i K.C. Holmes, c.f. [39]).

Badania cienkich filamentów z fibroblastów zarodków szczurów wykazały, że kaldesmon z komórek niemięśniowych także wiąże się wzdłuż filamentów aktywnych, podobnie jak tropomizyna, i wraz z nią stabilizuje strukturę filamentów i zapobiega ich fragmentacji przez żelzolinę [80, 81].

### VIII. Molekularne podstawy zależnej od jonów $\text{Ca}^{2+}$ regulacji skurczu mięśni gładkich przez kaldesmon

W celu poznania molekularnego mechanizmu hamowania ATPazy aktomiozynowej przez kaldesmon, badaliśmy metodą polaryzacji jego wpływ na strukturę i dynamikę cienkich filamentów w pojedynczych glicerynowanych włóknach mięśni szkieletowych oraz tzw. cieniach włókien (ang. *ghost fibers*), otrzymywane przez wyekstrahowanie miozyny i białek regulujących [82-85]. Wykorzystując znakowaną fluorescencyjnie aktywną, mogliśmy śledzić zmiany struktury i orientacji monomerów aktyny, a także giętkości filamentów aktywnych pod wpływem wiązania kaldesmonu w obecności i nieobecności główek miozyny. Okazało się, że kaldesmon znacznie zmniejsza zmiany zachodzące w strukturze filamentu aktywnego podczas transformacji włókien ze stanu rozkurczu do stanu *rigor* [82]. Równoległe doświadczenia polegające na inkorporacji kaldesmonu do cieni włókien pozwoliły wyjaśnić, że kaldesmon hamuje zmiany struktury aktyny indukowane przez wiązanie z nią główek miozyny. Wpływu kaldesmonu nie obserwowano w obecności kalmoduliny i jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Wywołane kaldesmonem hamowanie zmian struktury aktyny pod wpływem wiązania główek miozyny można wyjaśnić

osłabieniem przez kaldesmon wiązania pomiędzy aktyną i miozyną [84].

Badania wpływu kaldesmonu na sztywność pozbawionych sarkolemy włókien mięśni szkieletowych oraz pomiary dyfrakcji promieni rentgenowskich, doprowadziły do wniosku, że w obecności ATP kaldesmon powoduje dysocjację słabo związanych mostków między filamentami aktywnymi i główkami miozyny, których tworzenie poprzedza skurcz mięśni [86]. Ostatnie badania wpływu C-końcowego 34 kDa fragmentu kaldesmonu na kinetykę hydrolizy ATP przez aktomiozynę ujawniły jednak, że w obecności tropomiozyny kaldesmon może być również regulatorem szybkości hydrolizy ATP [87].

Rozważa się również udział kaldesmonu w utrzymaniu napięcia w mięśniach gładkich poprzez sieciowanie filamentów miozynowych i aktywnych w wyniku jednoczesnego wiązania C-końca kaldesmonu z aktyną i N-końca z miozyną [5, 52]. Proces sieciowania mogłoby być zależny od fosforylacji kaldesmonu w wyniku działania kinazy białkowej zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny [52].

### IX. Udział kaldesmonu w zjawiskach ruchu w komórkach niemięśniowych

Obecność kaldesmonu w komórkach niemięśniowych sugeruje jego funkcję w regulacji procesów ruchliwości komórkowej. Kaldesmon oczyszczony z rdzenia nadnerczy, podobnie jak kaldesmon z mięśni gładkich, wiąże się z filamentami aktywnymi i hamuje superprecypitację i aktywność ATPazy aktomiozyny wyizolowanej z rdzenia nadnerczy. Hamowanie to jest odwracane przez kompleks  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina [88]. Podobne hamowanie ATPazy aktomiozynowej z płytek krwi indukuje kaldesmon płytkowy [89]. Układ aktomiozynowy regulowany przez kaldesmon wydaje się także być zaangażowany w regulacji rozmieszczenia i ruchliwości receptorów powierzchniowych limfocytów [19, 90].

Dane z laboratorium M a t s u m u r y wskazują, że podczas mitozy niemięśniowy kaldesmon, na skutek

fosforylacji przez kinazę cdc2, oddysocjowuje od filamentów aktynowych [20, 91], co sugeruje, że białko to może uczestniczyć w zmianach organizacji cytoszkieletu aktynowego. Oddysocjowanie kaldesmonu od F-aktyny może znosić hamowanie ATPazy i prowadzić do skurczu układu aktomiozynowego w komórce mitotycznej. Taki skurcz może powodować zaokrąglenie komórki (podczas wchodzenia w profazę). Oddysocjowanie kaldesmonu może być także czynnikiem modulującym późniejszą funkcjonalność pierścienia podziałowego podczas cytokinezy.

Przykłady te pokazują, że kaldesmon może brać udział w regulacji opartych na oddziaływaniu aktyny z miozyną procesów ruchu zachodzących w komórkach mięśniowych. Procesy te wydają się odgrywać ważną rolę w takich zjawiskach, jak ruch mikrokosmków, sekrecja i endocytoza, aktywacja płytek krwi, ruchliwość receptorów powierzchniowych, cytokineza i w wytwarzaniu napięcia przez włókna naprężeniowe. Kolokalizacja w tych układach kaldesmonu oraz białek aparatu kurczliwego: aktyny, miozyny i tropomiozyny, a także kalmoduliny, wskazuje, że może on pełnić tę funkcję.

Jednakże, nie jest to jedyna funkcja kaldesmonu, jako że jest on składnikiem krawędzi wiodącej (ang. *leading edge*) hodowanych komórek, regionu w którym miozyna nie została wykryta. Nasze badania wykazały, że kaldesmon wpływa na przechodzenie monomerycznej aktyny w polimer. Jak obserwowano z zastosowaniem znakowanej fluorescencyjnie aktyny, kaldesmon przyspiesza etap nukleacji aktyny w środowisku o niskim stężeniu soli, a także polimeryzuje aktynę w nieobecności soli [92, 93]. Polimeryzacja nie zachodzi w obecności jonów  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny. Co więcej, wykazaliśmy ostatnio, że kaldesmon jest zdolny do destabilizacji kompleksu G-aktyna-profilina i polimeryzacji aktyny uwolnionej z profilaktyny [94]. Proces ten może odgrywać ważną rolę podczas lokomocji komórek. Kaldesmon zdolny jest także do indukowania oddziaływań międzyfilamentowych, czemu towarzyszy tworzenie sieci lub wiązek filamentów, w zależności od proporcji kaldesmonu do aktyny [56, 95] (Ryc. 3b, c). A zatem, inna przypuszczalna rola kaldesmonu polega na regulacji organizacji filamentów aktynowych w komórkach mięśniowych i w ten sposób kontrolowanie architektury cytoszkieletu. Na przykład, oddysocjowanie kaldesmonu od filamentów aktynowych (pod wpływem kalmoduliny lub fosforylacji zależnej od kalmoduliny) może znosić hamowanie aktywności żelzolino, czego skutkiem może być fragmentacja filamentów. To z kolei może prowadzić do rozpadu włókien naprężeniowych i towarzyszącemu zmian kształtu komórek. Przypuszcza się także, że na skutek obniżonego poziomu kaldesmonu i podwyższonego stężenia jonów wapnia i kalmoduliny w komórkach stransformowanych, następuje destabilizacja filamentów aktynowych, która może być odpowiedzialna

za zmiany morfologiczne obserwowane w wielu takich komórkach [24].

Artykuł otrzymano 13 lutego 1992 r.  
Zaakceptowano do druku 17 lutego 1992 r.

## Piśmiennictwo

1. Dąbrowska R (1989) W: Kuźnicki L (red) Komórka, jej budowa i ruch, Ossolineum Wrocław str 93-132
2. Dąbrowska R, W: Kawiak J, Mirecka J, Olszewska M, Warchol J (red) Podstawy Cytofizjologii str 299-325 (w druku)
3. Strzelecka-Golaszewska H, Piwowar U (1980) *Post Biochem* **26**: 517-558
4. Stępkowski D, Szczesna D (1989) *Post Biochem* **35**: 585-589
5. Dąbrowska R (1992) *Post Biochem* **38**: 2-5
6. Sobue K, Muramoto Y, Fujita M, Kakiuchi S (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 5652-5655
7. Driska SP, Hartshorne DJ (1975) *Arch Biochem Biophys* **167**: 203-212
8. Ebashi S, Mikawa T, Hirata M, Toyono-Oka T, Nonomura Y (1977) W: Casteels R, Godfraind T, Ruegg JC (red) Excitation-contraction Coupling in Smooth Muscles, Elsevier Amsterdam str 325-334
9. Marston SB, Trevett RM, Walters M (1980) *Biochem J* **185**: 355-365
10. Kakiuchi S, Sobue K (1983) *Trends Biochem Sci* **8**: 59-62
11. Sobue K, Kanda K, Tanaka T, Ueki N (1988) *J Cell Biochem* **37**: 317-325
12. Fürst DO, Cross RA, DeMey J, Small JV (1986) *EMBO J* **5**: 251-257
13. Small JV, Fürst DO, DeMey J (1986) *J Cell Biol* **102**: 210-220
14. Lehman W, Sheldon A, Madonia W (1987) *Biochim Biophys Acta* **914**: 35-39
15. Drew JS, Moos C, Murphy RA (1991) *Am J Physiol* **260**: C1332-C1340
16. der Terrosian E, Deprette C, Cassoly R (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 395-401
17. Kakiuchi R, Inui M, Morimoto K, Kanda K, Sobue K, Kakiuchi S (1983) *FEBS Lett* **154**: 351-356
18. Dingus J, Hwo S, Bryan J (1986) *J Cell Biol* **102**: 1748-1757
19. Mizushima Y, Kanda K, Hamaoka T, Fujiwara H, Sobue K (1987) *Biomed Res* **8**: 73-78
20. Yamashiro S, Yamalita Y, Hosoya H, Matsumura F (1991) *Nature (London)* **349**: 169-172
21. Bretscher A, Lynch W (1985) *J Cell Biol* **100**: 1656-1663
22. Ueki N, Sobue K, Kanda K, Hada T, Higashino K (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 9049-9053
23. Yamashiro-Matsumura S, Ishikawa R, Matsumura F (1988) *Protoplasma* **2** (Suppl) 9-21
24. Owada MK, Hakura A, Iido K, Yagara I, Sobue K (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3133-3137
25. Lin J J-C, Lin J L-C, Davis-Nanthakumar EJ, Lourim D (1988) *Hybridoma* **7**: 273-287
26. Bryan J (1989) *J Muscle Res Cell Motil* **10**: 95-96
27. Graceffa P, Jancso A (1990) *J Muscle Res Cell Motil* **11**: 440
28. Bryan J, Imai M, Lee R, Moore P, Cook RG, Lin W (1989) *J Biol Chem* **264**: 13873-13879
29. Hayashi K, Kanda K, Kimizuka F, Kato I, Sobue K (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **164**: 503-511
30. Bryan J, Lee R (1991) *J Muscle Res Cell Motil* **12**: 372-375
31. Hayashi K, Fujio Y, Kato I, Sobue K (1991) *J Biol Chem* **266**: 355-361
32. Novy RM, Lin J L-C, Lin J J-C (1991) *J Biol Chem* **266**: 16917-16924
33. Marston SB, Redwood CS (1991) *Biochem J* **279**: 1-16
34. Graceffa P, Wang C-L, Stafford WF (1988) *J Biol Chem* **263**: 14196-14202
35. Stafford WF, Jancso A, Graceffa P (1990) *Arch Biochem Biophys* **281**: 66-69



36. Malencik DA, Ausio J, Byles CE, Modrell B, Anderson SA (1989) *Biochemistry* **28**: 8227-8233
37. Mabuchi K, Wang C-L (1991) *J Muscle Res Cell Motil* **13**: 145-151
38. Lynch WP, Riseman VM, Bretscher A (1987) *J Biol Chem* **262**: 7429-7437
39. Moody C, Lehman W, Craig R (1990) *J Muscle Res Cell Motil* **11**: 176-185
40. Levine BA, Moir AJG, Audemard E, Mornet D, Patchel VB, Perry SV (1990) *Eur J Biochem* **193**: 687-696
41. Velaz L, Hemric ME, Benson CE, Chalovich JM (1989) *J Biol Chem* **264**: 9602-9610
42. Horiuchi KY, Chacko S (1988) *Biochemistry* **27**: 8388-8393
43. Fujii T, Ozawa J, Ogoma Y, Kondo Y (1988) *J Biochem (Tokyo)* **104**: 734-737
44. Redwood CS, Marston SB, Bryan J, Cross RA, Kendrick-Jones J (1990) *FEBS Lett* **270**: 53-56
45. Watson MH, Kuhn AE, Novy RE, Lin J J-C, Mak AS (1990) *J Biol Chem* **265**: 18860-18866
46. Skripnikova EV, Gusev NB (1989) *FEBS Lett* **257**: 380-382
47. Fujii T, Machino K, Andoh H, Satoh T, Kondo Y (1990) *J Biochem (Tokyo)* **107**: 133-137
48. Pritchard K, Marston SB (1991) W: Maréchal G, Carraro U (red) *Muscle and Motility*, t. 2: Proceedings of XIXth European Conference in Brussels Intercept Ltd Andover str 343-349
49. Hemric ME, Chalovich JM (1988) *J Biol Chem* **263**: 1878-1885
50. Hemric ME, Chalovich JM (1990) *J Biol Chem* **265**: 19672-19678
51. Ikebe M, Readron S (1988) *J Biol Chem* **263**: 3055-3058
52. Sutherland C, Walsh MP (1989) *J Biol Chem* **264**: 578-583
53. Lash JA, Sellers JR, Hathaway DR (1986) *J Biol Chem* **261**: 16155-16160
54. Sobue K, Takahashi K, Wakabayashi I (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **132**: 645-651
55. Ngai PK, Walsh MP (1984) *J Biol Chem* **259**: 13656-13659
56. Dąbrowska R, Goch A, Gałązkiewicz B, Osinska H (1985) *Biochim Biophys Acta* **842**: 70-75
57. Smith CWJ, Marston SB (1985) *FEBS Lett* **184**: 115-119
58. Lim M, Walsh MP (1986) *Biochem J* **238**: 523-530
59. Chalovich J, Cornelius P, Benson C (1978) *J Biol Chem* **262**: 5711-5716
60. Sobue K, Morimoto K, Inui M, Kanda K, Kakiuchi S (1982) *Biomed Res* **3**: 188-196
61. Abougou J-C, Hagiwara M, Hachiya T, Terasawa M, Hidaka H, Hartshorne, DJ (1989) *FEBS Lett* **257**: 408-410
62. Scott-Woo GC, Sutherland C, Walsh MP (1990) *Biochem J* **268**: 367-370
63. Tanaka T, Ohta H, Kanda K, Tanaka T, Hidaka H, Sobue K (1990) *Eur J Biochem* **188**: 495-500
64. Okagaki T, Higashi-Fijume S, Ishikawa R, Takano-Ohmuro H, Kohama K (1991) *J Biochem* **109**: 858-866
65. Ishikawa R, Okagaki T, Higashi-Fujime S, Kohama K (1991) *J Biol Chem* **266**: 21784-21790
66. Szpacenko A, Dąbrowska R (1986) *FEBS Lett* **202**: 182-186
67. Makuch R, Walsh MP, Dąbrowska R (1989) *FEBS Lett* **247**: 411-414
68. Fujii T, Imai M, Rosenfeld GC, Bryan J (1987) *J Biol Chem* **262**: 2757-2763
69. Yazawa M, Yagi K, Sobue K (1987) *J Biochem* **102**: 1065-1073
70. Riseman VM, Lynch WP, Nefsky B, Bretscher A (1989) *J Biol Chem* **264**: 2869-2875
71. Bartegi A, Fattoum A, Derancourt J, Kassab R (1990) *J Biol Chem* **265**: 15231-15238
72. Mornet D, Audemard E, Derancourt J (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **154**: 564-571
73. Leszyk J, Mornet D, Audemard E, Collins JH (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **160**: 1371-1378
74. Harricane M-C, Cavadore C, Audemard E, Mornet D (1990) *FEBS Lett* **269**: 185-188
75. Velaz L, Ingraham RH, Chalovich JM (1990) *J Biol Chem* **265**: 2929-2934
76. Wang C-L (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **156**: 1033-1038
77. Wang C-L, Chalovich JM, Greceffa P, Lu R, Mabuchi K, Stafford WF (1991) *J Biol Chem* **266**: 13958-13963
78. Ball EH, Kovala T (1988) *Biochemistry* **27**: 6093-6098
79. Lehman W, Craig R, Lui J, Moody C (1989) *J Muscle Res Cell Motil* **10**: 101-112
80. Yamashiro-Matsumura S, Matsumura F (1988) *J Cell Biol* **106**: 1973-1983
81. Ishikawa R, Yamashiro S, Matsumura F (1989) *J Biol Chem* **264**: 7490-7497
82. Gałązkiewicz B, Borovikov YS, Dąbrowska R (1987) *Biochim Biophys Acta* **916**: 368-375
83. Dobrowolski Z, Borovikov YS, Nowak E, Gałązkiewicz B, Dąbrowska R (1988) *Biochim Biophys Acta* **996**: 140-150
84. Nowak E, Borovikov YS, Dąbrowska R (1989) *Biochim Biophys Acta* **999**: 289-292
85. Nowak E, Borovikov YS, Khoroshev MI, Dąbrowska R (1991) *FEBS Lett* **281**: 51-54
86. Brenner B, Yu LP, Chalovich JM (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5739-5743
87. Horiuchi KY, Samuel M, Chacko S (1991) *Biochemistry* **30**: 712-717
88. Sobue K, Tanaka T, Kanda K, Ashino N, Kakiuchi K (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5025-5029
89. Onji T, Takagi M, Uodome N, Shibata N, Aoki K (1989) *Biochem Biophys Acta* **993**: 248-253
90. Walker G, Kerrick WGL, Bourguignon LYW (1989) *J Biol Chem* **264**: 496-500
91. Yamashiro S, Yamakita Y, Ishikawa R, Matsumura F (1990) *Nature (London)* **344**: 675-678
92. Gałązkiewicz B, Mossakowska M, Osinska H, Dąbrowska R (1985) *FEBS Lett* **184**: 144-149
93. Gałązkiewicz B, Belagyi J, Dąbrowska R (1989) *Eur J Biochem* **181**: 607-614
94. Gałązkiewicz B, Buss F, Jockusch BM, Dąbrowska R (1991) *Eur J Biochem* **195**: 543-547
95. Bretscher A (1984) *J Biol Chem* **259**: 12873-12880



## Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

# Regulacja cyklu komórkowego — historii i komplikacji ciąg dalszy

## Regulation of cell cycle — continuation of history and complications

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT<sup>1</sup>

### Spis treści:

- I. Fosforylacja kinazy p34cdc2 i cykliny B oraz jej funkcjonalne znaczenie
- II. Kinazy i fosfatazy uczestniczące w modyfikacji kinazy p34cdc2
- III. Udział kinazy p34cdc2 i/lub jej homologów w sprzężeniu fazy S z inicjacją mitozy
- IV. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Phosphorylation of kinase p34cdc2 and cyclin B as well as its functional significance
- II. Kinases and phosphatases participating in modifications of kinase p34cdc2
- III. Participation of kinase p34cdc2 and/or its homologs in coupling of phase S and initiation of mitosis
- IV. Concluding remarks

### Wykaz stosowanych skrótów:

Y — tyrozyna; T — treonina; S — seryna; G — Glicyna; X — aminokwas niezidentyfikowany lub „inny”.

W kontroli cyklu komórkowego zarówno niższych jak i wyższych organizmów eukariotycznych szczególną rolę odgrywa fosfokinaza serynowo-treoninowa, nazywana dalej kinazą p34cdc2. Pierwotnie zidentyfikowano ją jako produkt genu *cdc2* u *Schizosaccharomyces pombe* i genu *CDC28* u *Saccharomyces cerevisiae*. Homologi p34cdc2 znaleziono we wszystkich badanych dotąd komórkach eukariotycznych. Funkcjonują one jako składnik heterodimerskiego kompleksu białkowego z cyklina B koniecznego do rozpoczęcia mitozy i zwanego: czynnikiem MPF (*maturation-promoting factor*), „kinazą fazy M” lub też specyficzną dla fazy M kinazą histonu H1 [1-4]. Kompleks ten fosforyluje różnorodne białka, które bezpośrednio lub pośrednio zapoczątkowują kluczowe wydarzenia cyklu komórkowego takie, między innymi, jak aktywacja kompleksu zaangażowanego w replikację DNA, rozpad otoczki jądrowej, utworzenie wrzeciona mitotycznego i kondensacja chromosomów.

Powszechnie uznany jest udział kinazy p34cdc2 w przejściu komórek z fazy G2 w mitozę. Ostatnio pojawiają się także dane wyraźnie świadczące o jej udziale, (lub też jej homologów) również we wcześniejszych fazach cyklu komórkowego. Aktywność kinazy p34cdc2 zmienia się bowiem w drastyczny sposób w czasie cyklu komórkowego. Regulacja tej aktywności jest bardzo złożona i obejmuje między innymi przejściowe tworzenie wysokocząsteczkowych kompleksów z innymi białkami, jak np. z cyklinami i białkowym produktem genu *suc1*, oraz zmianę stopnia ufosforylowania składników kompleksu. Podstawowe zagadnienia dotyczące tego problemu były już w ubiegłych latach omawiane w polskim piśmiennictwie naukowym [5-7]. Niniejsze opracowanie jest rozszerzeniem i uaktualnieniem poprzednich prac wobec lawinowo wręcz pojawiających się w ostatnich dwóch latach danych o fosforylacji i defosforylacji kinazy p34cdc2, procesów cyklicznie zachodzących w cyklu komórkowym, fosforylacji cyklina oraz o roli kinazy p34cdc2 i/lub jej homologów w procesach inicjujących mitozę po ukończeniu fazy S i replikacji chromosomów.

### I. Fosforylacja kinazy p34cdc2 i cykliny B oraz jej funkcjonalne znaczenie

W cząsteczce kinazy p34cdc2 fosforylacji ulegać mogą reszty tyrozyny, treoniny i seryny. Kinaza ta z komórek drożdży *S. pombe* jest ufosforylowana przede wszystkim w reszcie tyrozynowej w pozycji 15 [8], znajdującej się w sekwencji GXGXXG, która uczestniczy w wiązaniu ATP przez kinazy białkowe [9]; dodatkowym miejscem fosforylacji jest treonina w pozycji 167 [8, 10]. Natomiast białko p34cdc2 z komórek wyższych kręgowców fosforylowane jest aż w 4 resztach aminokwasowych: tyrozynie znajdującej się w pozycji 15, treoninie w pozycji 14, serynie w pozycji 277 i prawdopodobnie treoninie w pozycji 161 [11-13], przy czym intensywność fosforylacji poszczególnych aminokwasów jest różna w określonych fazach cyklu komórkowego (Tabela 1). Wydaje się to świadczyć o znaczeniu regulacyjnym fosforylacji róż-

<sup>1</sup> prof. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, 02-093 Warszawa. Pasteura 3.



**Tabela 1**

Intensywność ufosforylowania aminokwasów w cząsteczce kinazy p34cdc2 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (na podstawie danych [11])

Fazy cyklu komórkowego	Aminokwasy ulegające fosforylacji			
	S-277	T14	Y15	T161
G1	++++	+	-	-
S	++	+++	+++	++
G2	-	++++	++++	ślady
M	ślady	-	-	++

Obecność śladowych ilości T161 w fazie G2 i S-277 w fazie M wynika, zdaniem autorów, prawdopodobnie z kontaminacji próbek komórkami z poprzedzających faz cyklu.

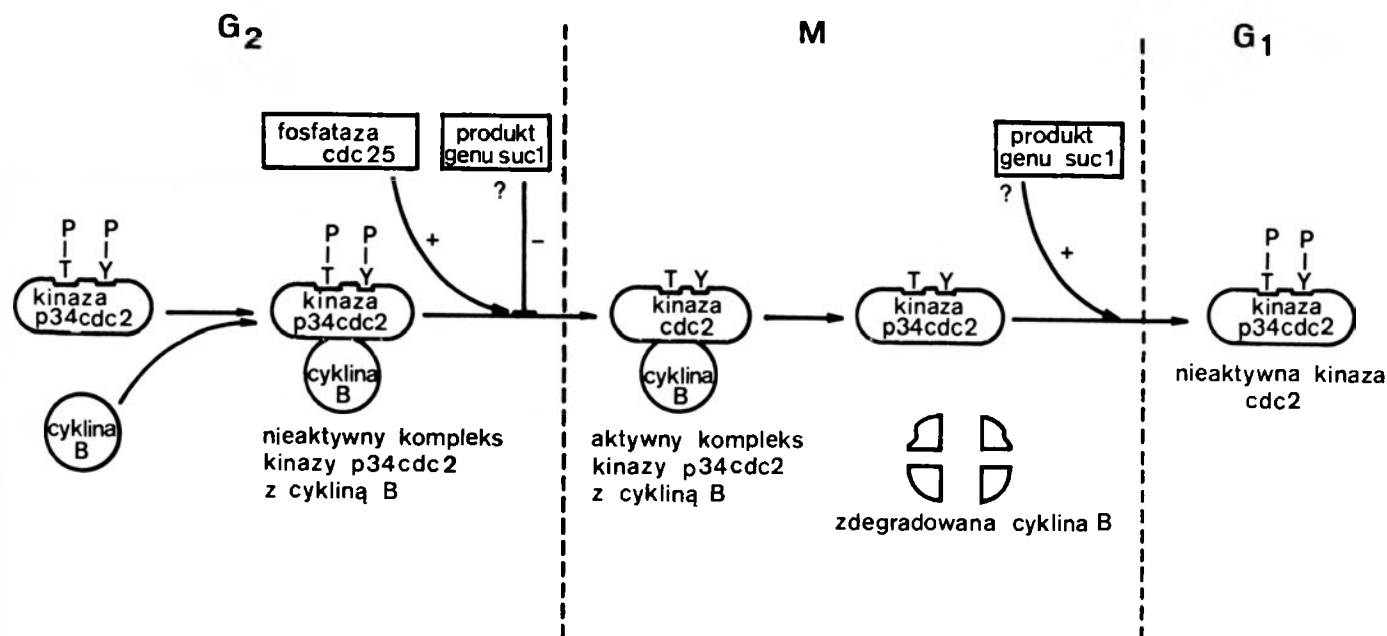
nych aminokwasów. I tak maksimum fosforylacji tyrozyny w pozycji 15 i treoniny w pozycji 14 przypada na fazę G2, seryny 277 na fazę G1, natomiast ufosforylowaną treoninę w pozycji 161 kinazy wykrywa się zarówno w fazie S jak i podczas mitozy [11].

Badania mutantów zawierających kinazę p34cdc2, w której tyrozyna 15 i/lub treonina 14 zostały zastąpione przez aminokwasy nie ulegające fosforylacji, pozwoliły na stwierdzenie, że do aktywacji kinazy p34cdc2 u drożdży wystarczy zdefosforylowanie fosfotyrozyny w pozycji 15 [14-16]. W komórkach zaś wyższych Eukaryota do aktywacji enzymu wymagana jest ponadto defosforylacja fosfotreoniny w pozycji 14 [12]. Stanowi to, jak się wydaje, podwójne zabezpieczenie kinazy p34cdc2 przed niepożądaną aktywacją [17]. Regulacyjne znaczenie ufosforylowania dwóch aminokwasów w cząsteczce enzymu wykryto także badając kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny, między innymi serynowo-treoninowe kinazy — p44<sup>mapk</sup> i p42<sup>mapk</sup> fosforylujące egzogenne substraty takie jak białko MAP-2 (*microtubule-associated protein 2*) i MBP (*myelin-basic protein*) [18-24]. Jednakże w odróżnieniu od kinazy p34cdc2, ufosforylowa-

nie tyrozyny i treoniny w cząsteczkach tych kinaz jest niezbędne do utrzymania aktywności enzymatycznej. Jak dotąd, nie opisano kinaz i fosfataz zdolnych do przeprowadzenia *in vivo* fosforylacji i defosforylacji tych enzymów.

Mechanizm aktywacji kinazy p34cdc2 przez defosforylację fosfotyrozyny w pozycji 15 (i ewentualnie fosfotreoniny w pozycji 14 u ssaków) wydawał się przez dłuższy czas uniwersalny [25] (Ryc. 1). Ostatnio jednak ukazała się praca wykazująca brak defosforylacji fosfotyrozyny w kinazie p34cdc2 skompleksowanej z cykliną B, podczas aktywacji enzymu *in vivo* w oocytach jeżowca z IV stadium rozwoju [26]. Również w 1992 roku wykazano, że u *S. cerevisiae* defosforylacja fosfotyrozyny w pozycji 19 w produkcie genu *CDC28* (homologu genu *cdc2* u *S. pombe*) nie aktywuje kinazy [27] i nie uniemożliwia zachodzenia mitozy w obecności uszkodzonego DNA lub DNA o nieprawidłowej strukturze [28]. Wyniki te sugerują, że w tych organizmach musi występować inny, nie polegający na defosforylacji fosfotyrozyny, niewyjaśniony jeszcze dotąd mechanizm regulujący wejście komórek w mitozę.

Znaczenie ufosforylowania poszczególnych reszt aminokwasowych w cząsteczce kinazy p34cdc2 dla jej aktywności nie jest dotąd jasne. Niewątpliwie ufosforylowanie tyrozyny w pozycji 15 i treoniny w pozycji 14 znajdujących się w domenie wiążącej ATP może wpływać na poziom aktywności enzymatycznej kinazy. Natomiast ufosforylowanie treoniny w pozycji 161 kinazy kręgowców [13, 29] i w pozycji 167 kinazy *S. pombe* [10] wydaje się być niezbędne do wiązania przez nią cyklin A i B i tworzenia stabilnych kompleksów (zwłaszcza z cykliną B). Za interakcję kinazy p34cdc2 z cyklinami są najprawdopodobniej odpowiedzialne zarówno aminokwasy występujące w N-końcowym fragmencie jej cząsteczki, jak i aminokwasy znajdujące się na powierzchni cząsteczki w sekwencji PSTAIR



Ryc. 1. Uniwersalny mechanizm kontrolujący przejście faz G2-M-G1 (wg 25, uproszczony). Na schemacie zaznaczono tylko aminokwasy znajdujące się w centrum aktywnym enzymu.

[30]. Mutacje w tych właśnie fragmentach cząsteczki kinazy p34cdc2 upośledzają w znacznym stopniu wiązanie przez nią cyklin. Co więcej, w mutantach *S. pombe* z kinazą p34cdc2, posiadającą zamiast treoniny w pozycji 167 aminokwas nie ulegający fosforylacji, znajdowano słabsze piętno z  $^{32}\text{P}$  w tyrozynie w pozycji 15 [10]. Kinaza p34cdc2 z mysich fibroblastów, zawierająca w pozycji 161 zamiast treoniny kwas asparaginowy, charakteryzowała się też mniejszą zdolnością wiązania cykliny B niż kinaza niezmutowana, a powstały heterodimer nie wykazywał aktywności enzymatycznej [13]. Wyniki powyższych badań, jak również badań heterodimeru kinaza p34cdc2-cyklina B z jaj *Xenopus*, wydają się przemawiać za tym, że utworzenie kompleksu poprzez dołączenie cykliny B jest niezbędne, ażeby mogła nastąpić fosforylacja tyrozyny w pozycji 15 i treoniny w pozycji 14, co w konsekwencji sprawia, że kompleks ten pozostaje nieaktywny enzymatycznie niemalże do końca fazy G2 [31-33]. Wysuwano też sugestię, że fosforylacja tyrozyny w kinazie p34cdc2 może także wpływać na jej wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie [34]. Szereg danych wskazuje także na udział treoniny 161 w kinazie p34cdc2 z komórek ludzkich w wiązaniu cykliny A podczas faz G1 i S [29]. Przypuszcza się, że fosforylacja treoniny 161 jest modyfikacją posttranslacyjną kinazy p34cdc2 niezbędną do ograniczenia replikacji DNA tylko dla jednego razu w cyklu komórkowym [35]. Mniej jest wiadomo o znaczeniu ufosforylowania seryny w pozycji 277 dla aktywności kinazy. Przypuszcza się, że może ono mieć związek z przechodzeniem komórek z fazy G1 w fazę S [11, 36]. Nie można też wykluczyć udziału ufosforylowanej seryny 277 w interakcji kinazy p34cdc2 z innymi białkami niż cykliny [17].

Podobnie jak kinaza p34cdc2, również cyklina B, jest fosfobiałkiem, którego obecność wykazano w jajach jeżowca *Sphaerochinus granularis* [37], jajach i oocytach *Xenopus* [38, 39], a także ludzkich komórkach *HeLa* [40]. Występujące w *Xenopus* dwie homologiczne formy cykliny B, a mianowicie cyklina B1 i B2 [41], są fosforylowane przede wszystkim w resztach serynowych w pozycjach 94 i 96 cykliny B1 i pozycji 90 w cyklinie B2 [39]. Cykliny typu B są substratami *in vitro* kinazy MAP [39] i kinazy p34cdc2 [14, 42], są także fosforylowane przez produkt onkogenu *c-mos* [43]. W fosforylowanych *in vitro* cyklinach również reszty treoninowe podlegają fosforylacji, jednakże nie wykryto fosfotreoniny w cyklinach znakowanych radioaktywnym fosforem *in vivo*. Czy właśnie kinaza MAP i kinaza p34cdc2 są odpowiedzialne za fosforylację cyklin *in vivo* pozostaje na razie w sferze przypuszczeń. Wykazanie jednakże, że maksimum fosforylacji cyklin, (oceniane intensywnością piętnowania polipeptydu  $^{32}\text{P}$ ) jest zbieżne czasowo z pojawieniem się aktywności kinazowej kompleksu p34cdc2-cyklina B, przemawiać może za możliwością fosforylacji cykliny B *in vivo* przez kinazę p34cdc2 [14].

Znaczenie ufosforylowania cykliny B w przebiegu cyklu komórkowego jest nadal niejasne. Przypuszczenia o znaczeniu poziomu ufosforylowania cykliny B dla jej podatności na proteolizę [44, 45], a tym samym udziału w zakończeniu mitozy nie zostały jednak potwierdzone. Zastąpienie bowiem (na drodze mutagenyzy) w cząsteczce cyklin B z *Xenopus* aminokwasów ulegających fosforylacji przez aminokwasy niefosforylowane nie miało wpływu ani na efektywność degradacji cyklin pod koniec mitozy, ani też na indukcję nowych podziałów mitotycznych i dojrzewanie oocytów [39].

## II. Kinazy i fosfatazy uczestniczące w modyfikacji kinazy p34cdc2

Chociaż zostały już określone podstawowe miejsca ufosforylowania kinazy p34cdc2 w komórkach ssaków (Tabela 1), to jednakże kinazy odpowiedzialne za przeprowadzenie tego procesu zostały na razie tylko wstępnie scharakteryzowane. Dotychczas opisywane kinazy białkowe wykazywały specyficzność bądź to w stosunku do seryny i treoniny, bądź też tylko wobec tyrozyny [9]. Dopiero w ostatnich latach opisano kinazy, które fosforylują zarówno serynę i treoninę, jak również tyrozinę, pomimo tego, że budowa ich jest charakterystyczna dla kinaz serynowo-treoninowych [46-48].

Okazało się, że jedną z takich kinaz u *S. pombe* jest białkowy produkt genu *wee1*, p107 [49], którego funkcją jest opóźnienie podziału komórki, aż do momentu w którym osiągnie ona odpowiednią wielkość (Tabela 2). Kinaza ta ulega autofosforylacji w resztach seryny i treoniny, ale jest również zdolna do fosforylowania egzogennych substratów (np. angiotensyny II) w reszcie tyrozynowej [50]. Jak dotąd nie wykazano jednak czy kinaza p107, bezpośrednio fosforyluje kinazę p34cdc2. Gen homologiczny wobec genu *wee1* drożdży zidentyfikowano także w ludzkich fibroblastach [51]. Jednakże kinaza p34cdc2 wyizolowana z mutantów niezawierających produktu genu *wee1* była ufosforylowana, co sugeruje brak bezpośredniego udziału kinazy p107 w fosforylacji kinazy p34cdc2. Niemniej jednak szereg innych danych przemawia za tym, że fosforylacja tyrozyny w kinazie p34cdc2, stymulowana dzięki dołączeniu cykliny B, w bardzo znacznym stopniu zależy od obecności w komórce kinazy p107 [33]. Sugeruje się, że kompleks kinazy p34cdc2-cyklina B stanowi lepszy substrat kinazy p107 niż sama kinaza p34cdc2. Być może jednak także inne jeszcze czynniki uczestniczą w negatywnej regulacji t.j. hamowaniu aktywności kinazy p34cdc2 przez kinazę p107. Czynnikiem takim mogłaby być kinaza białkowa p66 kodowana przez gen *mik1* u drożdży *S. pombe* [52], u których jak się wydaje, produkty tych dwóch genów działają na kinazę p34cdc2 w sposób kooperatywny. Wysunięto ostatnio także przypuszczenie, że efekt kinaz kodowanych przez



**Tabela 2**

Geny i białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego

Gen	Białko	Funkcja
<i>cdc2</i>	p34	kinaza uczestnicząca w inicjacji mitozy i przejściu z fazy G1 w S
<i>cdc13</i>	p60	cyklina B, uczestnicząca w kompleksie z kinazą p34cdc2, w inicjacji mitozy
<i>cdc25</i>	p80	fosfataza defosforylująca kinazę p34cdc2 będącą w kompleksie z cykliną B i białkiem p13
<i>suc1</i>	p13	białko niezbędne dla pełnej aktywności enzymatycznej kompleksu kinazy p34cdc2 i cykliny B; prawdopodobny regulator fosfatazy <i>cdc25</i> ; być może niezbędny czynnik do inaktywacji kinazy p34cdc2 pod koniec mitozy
<i>cdk2</i>	p32/p33	kinaza (γ) homologicznie do kodowanej przez gen <i>cdc2</i> uczestnicząca w przejściu z fazy G1-S
<i>CLN2</i>	p62	cyklina charakterystyczna dla fazy G1
<i>wee1</i>	p107	kinaza „opóźniająca” mitozę, prawdopodobnie na skutek bezpośredniego lub pośredniego działania na kinazę p34cdc2; przypuszczalny udział w fosforylacji fosfatazy <i>cdc25</i>
<i>mik1</i>	p66	kinaza uczestnicząca pośrednio lub bezpośrednio w fosforylacji kinazy p34cdc2; przypuszczalny udział w fosforylacji fosfatazy <i>cdc25</i>
<i>nim1</i>		kinaza hamująca działanie kinazy <i>wee1</i>
<i>dis2</i>		prawdopodobnie fosfatazy fosfobiałkowe typu I uczestniczące w regulacji aktywności kinazy tyrozynowej fosforylującej kinazę p34cdc2
<i>sds21</i>		

geny *wee1* i *mik1* na poziom ufosforylowania kinazy p34cdc2 może być efektem pośrednim, poprzez wpływ tych enzymów na regulację aktywności specyficznej fosfatazy *cdc25* defosforylującej fosfotyrozynę kinazy p34cdc2 [53].

Jakkolwiek dotąd nie określono, która ze znanych kinaz tyrozynowych jest odpowiedzialna ze fosforylacją tyrozyny 15 w kinazie p34cdc2, to jednak wykazano jednocześnie, że jej aktywność, mierzona stopniem ufosforylowania kinazy p34cdc2 oscyluje w cyklu komórkowym. Najwyższa jest w fazie S, gdy DNA w komórkach nie jest jeszcze całkowicie zreplikowany. Aktywność kinazy tej wydaje się podlegać bardzo precyzyjnej regulacji, w której bierze udział system kinaz serynowo-treoninowych oraz fosfataz typu I kodowanych odpowiednio przez geny *nim1* oraz *dis2* i *sds21* [53]. O specyficznej kinazie tyrozynowej „fizycznie związanej” z kinazą p34cdc2 i fosforylującą ją *in vitro* w tyrozynie, znajdującej się w pozycji 15, doniesiono w przypadku komórek *HeLa* [54]. Kinaza ta jest białkiem o m.c. 67 kDa i różni się od kinaz kodowanych przez geny *src*, *abl*, *fms* oraz innych opisywanych dotychczas kinaz tyrozynowych. Nie wiadomo nic, jak dotąd, o kinazach fosforylujących w kinazie p34cdc2 inne niż tyrozyna aminokwasy. Jedynie u *Xenopus* wykryto ostatnio aktywność kinazową zaangażowaną w fosforylację treoniny 161 [55].

Więcej danych niż o kinazach fosforylujących p34cdc2 nagromadziło się w ostatnich dwóch latach na temat mechanizmu odpowiedzialnego za aktywację kompleksu kinaz p34cdc2-cyklina B i udziału w nim produktów genów *cdc25* i *suc1* (Tabela 2). Już od roku

1986 wiadomo było, że produkt genu *cdc25* odpowiedzialny jest za wejście komórek drożdży w mitozę oraz za koordynację wielkości komórek i momentu rozpoczęcia mitozy. Przemawiały za tym następujące obserwacje: rozpoczęcie mitozy przez komórki znacznie mniejsze niż normalne w mutantach drożdżowych charakteryzujących się nadekspresją genu *cdc25* [56]; zatrzymanie komórek w fazie G2 w mutantach drożdżowych z upośledzoną ekspresją genu *cdc25* i wykazanie, że zawierają one ufosforylowaną kinazę p34cdc2 o bardzo niskiej aktywności enzymatycznej [8, 56, 57]; wykazanie, że mutanty drożdżowe zawierające nieufosforylowaną kinazę p34cdc2 nie wymagały do rozpoczęcia podziałów produktu genu *cdc25* [8].

Periodyczne nagromadzenie się w komórkach *S. pombe* fosfobiałkowego produktu genu *cdc25* i odpowiedniego mRNA właśnie w końcu fazy G2 i bezpośrednio przed rozpoczęciem mitozy wskazywało wyraźnie na regulacyjną rolę genu *cdc25* w rozpoczęciu mitozy [58, 59]. Powiązanie działania produktu genu *cdc25* z poziomem ufosforylowania tyrozyny w kinazie p34cdc2 badano początkowo pośrednio, stosując egzogenną ludzką fosfatazę tyrozynową, zdolną do defosforylowania *in vitro* kompleksu kinaza p34cdc2-cyklina B [16]. Wykazano, że wprowadzenie cDNA kodującego fosfatazę tyrozynową do komórek mutantu *S. pombe* z upośledzoną ekspresją genu *cdc25* zastępowało całkowicie działanie produktu genu *cdc25* i komórki rozpoczynały mitozę. Wysuwano wówczas przypuszczenie, że u drożdży produkt genu *cdc25* jest regulatorem „pozytywnym” (t.j. aktywatorem) komórkowych fosfataz defosforylujących kinazę p34cdc2 [16], nie zaś aktywną fosfatazą, gdyż sekwencja aminokwasowa produktu genu *cdc25* różniła się znacznie od sekwencji znanych wówczas fosfataz [25].

Jednakże badania z zastosowaniem homologów drożdżowego genu *cdc25* wyizolowanych z komórek *Drosophila* [60, 61] czy też z ludzkich komórek *HeLa* (62), wyraźnie wskazywały na bezpośredni udział białkowych produktów tych genów w defosforylacji i aktywacji kinazy p34cdc2 w ekstraktach z jaj *Xenopus* [63]. Co więcej, oczyszczony białkowy produkt ludzkiego genu *cdc25* *in vitro* defosforylował i aktywował nieaktywny kompleks kinaza p34cdc2-cyklina B wyizolowany z jaj jeżowca [64].

W 1991 po raz pierwszy pokazano, że białkowy produkt genu *cdc25* z *S. pombe* może być fosfatazą tyrozynową [65]. Był on bowiem strukturalnie podobny do wirusowej tyrozynowo-serynowej fosfatazy VHI, opisaney i zsekwencjonowanej także w 1991 roku [66]. W obu tych fosfatazach występowała sekwencja zawierająca reszty histydyny, cysteiny i argininy, charakterystyczna dla fosfataz tyrozynowych [67]. Wyniki badań opublikowanych w końcu roku 1991 jednoznacznie wskazują, że produkt genu *cdc25* jest specyficzną fosfatazą tyrozynową, bezpośrednio uczestniczącą w aktywacji kinazy p34cdc2 i inicjacji mitozy zarówno w komórkach pro- jak i eukariotycznych

[68-70]. W komórkach ludzkich enzym ten kodowany jest przez co najmniej dwa odrębne geny *cdc25A* i *cdc25B* [71], a jego obecność wykrywa się przede wszystkim w jądrze komórkowym [72]. Może to sugerować, że aktywacja przez fosfatazę *cdc25* kompleksu kinaza p34cdc2-cykлина B zachodzi na terenie jądra komórkowego. Fosfataza *cdc25* oprócz defosforylacji kinazy p34cdc2 katalizuje również defosforylację szeregu modelowych substratów, takich jak fosforan p-nitrofenylu i ufosforylowane w tyrozynie peptydy, zawsze jednak w obecności czynników redukujących. Reakcja ta jest hamowana przez jony wanadu, a fosfataza *cdc25* inaktywowana przez NEM [68]. Centrum aktywne fosfatazy *cdc25* znajduje się w C-końcu cząsteczki [70, 72], a zastąpienie innym aminokwasem Cys480 w centrum aktywnym inaktywuje enzym [70].

Dokładna analiza C-końcowego fragmentu cząsteczki fosfatazy *cdc25* wykazała, że nie ma w nim pewnych sekwencji aminokwasowych bezpośrednio przylegających do centrum aktywnego innych fosfataz. Co więcej, sekwencje te zbliżone są do takiego samego układu znajdującego w cyklinach, zwłaszcza w cyklinie B [71]. Wykazanie, że stechiometryczne ilości cykliny B dodane do preparatu fosfatazy *cdc25* wywołują wzrost jej aktywności, i to w nieobecności kinazy p34cdc2, pozwoliło na wysunięcie interesującej hipotezy o mechanizmie tej aktywacji. Postuluje się w niej, że na skutek dołączenia cykliny B do fosfatazy *cdc25* i odpowiednich przekształceń w obrębie tego heterodimeru zostaje, jak gdyby, uzupełniony brak powyżej wymienionej sekwencji (być może aktywującej), a fosfataza *cdc25* uzyskuje pełną aktywność, porównywalną z aktywnością innych fosfataz [71, 74]. Chociaż aktywujący wpływ cykliny B na fosfatazę *cdc25* obserwowano w nieobecności kinazy p34cdc2, to należy jednak sądzić, że *in vivo* cyklina B dołącza się raczej do fosfatazy *cdc25* związanej już z kompleksem kinazy p34cdc2 [75]. Okresowe wiązanie się fosfatazy *cdc25* z kompleksem kinazy p34cdc2 zostało bowiem stwierdzone podczas cyklu podziałowego zarodków *Xenopus* [75] i wydaje się ono być związane z powtarzającym się nagromadzeniem i rozpadem cyklina B w cyklu komórkowym. Udział cykliny B w aktywacji fosfatazy *cdc25*, oprócz opisywanego wcześniej wpływu na kinazę p34cdc2 i jej aktywność, wyraźnie uzmysławia wielofunkcyjną rolę tego białka.

W regulacji fosfatazy tyrozynowej *cdc25* wydaje się też brać udział białkowy produkt genu *suc1*, będący oprócz cykliny B, drugą podjednostką ściśle związaną z kinazą p34cdc2 (Tabela 2). Obecnie wiadomo, że produkt genu *suc1* bierze udział w inaktywowaniu kinazy p34cdc2, co konieczne jest do zakończenia mitozy [57]. Produkt genu *suc1* hamuje wówczas (co wykazano w jajach *Xenopus*) defosforylację fosfotyrozyny w kinazie p34cdc2 i powoduje spadek aktywności kinazowej kompleksu [76, 77]. Białko kodowane przez gen *suc1* wiąże się ściśle z cząsteczką kinazy w dwóch

[78, 79] lub więcej miejscach [80]. Wydaje się, że również i na fosfatazie tyrozynowej *cdc25* znajduje się miejsce zdolne do wiązania białkowego produktu genu *suc1*. Wykazano bowiem, że produkt genu *suc1* hamuje aktywność jednej z form fosfatazy tyrozynowej *cdc25* (formy kodowanej przez gen *cdc2A*) [71]. W odróżnieniu od interakcji z kinazą p34cdc2, interakcja produktu genu *suc1* z fosfatazą tyrozynową jest interakcją niestabilną.

Nie wyjaśniono jak dotąd, czy fosfataza kodowana przez gen *cdc25* (lub jego homologi) jest jedyną fosfatazą zdolną do aktywacji kompleksu kinaza p34cdc2-cykлина B *in vivo*. Szereg wyników sugeruje bowiem, że białkowa fosfataza typu 2A mogłaby uczestniczyć w tym procesie [17, 81, 82], bądź bezpośrednio defosforylując p34cdc2, (co wykazano *in vitro*) [10, 83], bądź też pośrednio, wpływając na poziom ufosforylowania kinaz tyrozynowych kodowanych u drożdży przez geny *wee1* i *nim1*. Aktywność tych kinaz z kolei decyduje o stopniu ufosforylowania fosfatazy *cdc25*. Na podstawie obecnych danych bardziej prawdopodobny wydaje się pośredni udział fosfatazy 2A w regulacji aktywności kompleksu kinaza p34cdc2-cykлина B [83]. Można bowiem spekulować, że gdyby fosfataza 2A defosforylowała kinazę p34cdc2 *in vivo*, odszczepiając resztę fosforanową od fosfotreoniny w pozycji 161/167, lub ewentualnie od cykliny B — to mogłoby to zaburzyć trwałość kompleksu, spowodować oddysocjowanie cykliny B [17, 83] i inaktywować enzym. Ostatnio stwierdzono także, że zahamowanie aktywności fosfatazy 2A, poprzez działanie kwasu okaidowego, stymuluje defosforylację fosfotyrozyny w kinazie p34cdc2 i wywołuje jej przedwczesną aktywację w ekstraktach jaj *Xenopus* [81]. Można zatem sądzić, że fosfataza 2A może działać na fosfatazę *cdc25* i powodując jej defosforylację wywoływać tym samym spadek jej aktywności enzymatycznej [17]. To przypuszczenie o regulacji fosfatazy *cdc25* przez fosforylację przy udziale kinaz kodowanych przez geny *mik1* i *wee1* [53] nie jest pozbawione podstaw, gdyż wiadomo, że fosfataza ta jest fosfobiałkiem, w której ufosforylowana jest przede wszystkim seryna, w mniejszym zaś stopniu treonina [57].

Jak dotąd zidentyfikowano tylko nieliczne komórkowe substraty, na które działa fosfataza 2A [84, 85]. Jednym z nich jest histon H1, którego fosforylację przeprowadza kinaza p34cdc2 [84]. Tak więc wydaje się, że fosfataza typu 2A oprócz udziału w supresji aktywacji kinazy p34cdc2 *in vivo* (poprzez wpływ na fosfatazę *cdc25*) może także „odwracać” jedno z działań kinazy jakim jest fosforylacja histonu H1.

### III. Udział kinazy p34cdc2 i/lub jej homologów w sprzężeniu fazy S z rozpoczęciem mitozy

Replikacja DNA i redystrybucja powstałych elementów pomiędzy potomne komórki somatyczne są



kolejno zachodzącymi procesami utrwalonymi w czasie ewolucji. Sugeruje to działanie precyzyjnych mechanizmów kontrolujących, z którymi mogą interferować różnorodne czynniki zewnętrzne, w tym liczne związki chemiczne. Zdarza się również, jak ma to np. miejsce we wczesnych stadiach embriogenezy, że do podziału komórek może nawet nie dochodzić [86, 87].

W komórkach ssaków i grzybów zidentyfikowano szereg genów kontrolujących rozpoczęcie mitozy we właściwym momencie cyklu komórkowego. Są to na przykład: gen *rcc1* z nerkowych komórek chomika [88, 89]; geny *nimA* i *bimE* z *Aspergillus nidulans* [90, 91]; gen *rad9* z *S. cerevisiae* [92] oraz omawiany już gen *cdc2*, lub jego homologi znajdujące we wszystkich badanych komórkach [35, 93, 94]. Do niedawna sądzono, że geny te są elementami odrębnych systemów wiążących replikację DNA i/lub reperację DNA z inicjacją mitozy. Obecnie jednak zaczyna się krystalizować i utrwalać pogląd, że działania białkowych produktów tych genów są w pewnym stopniu powiązane.

Szczególną uwagę poświęć produktowi genu *cdc2*, kinazie p34cdc2, której rola (lub jej homologów) w cyklu komórkowym, i to nie tylko w inicjacji mitozy, wydaje się być niepodważalna [2]. Szereg obserwacji przemawia za jej udziałem w syntezie DNA i pojawiającej się następnie mitozie. I tak wykazywano wzrost ekspresji genu *cdc2*, przejawiający się wzrostem poziomu właściwego mRNA i białka p34cdc2 w stymulowanych mitogenem ludzkich limfocytach T będących w fazie G1-S [95]. Wprowadzenie do nich mRNA *cdc2* o „antysensownym” układzie nukleotydów zmniejszało ekspresję genu *cdc2*, hamowało też syntezę DNA. Do indukcji ekspresji genu *cdc2* niezbędna była także uprzednia indukcja protoonkogenów *c-myc* i *c-myb*. Wzrost poziomu mRNA *cdc2* wykazano także w mysich komórkach 3T3 i komórkach p6 po działaniu czynników wzrostowych, IGF i PDGF [96]. W regulacji poziomu mRNA *cdc2* szczególną rolę okazała się odgrywać interakcja IGF-1 (*insulin-like growth factor*) z jego komórkowym receptorem. Wprowadzenie bowiem do komórek „antysensownej” sekwencji nukleotydowej w stosunku do mRNA kodującego pojawienie się receptora IGF-1 znosiło powodowany przez IGF wzrost poziomu mRNA *cdc2*. Podobny efekt co IGF-1 wywierała również surowica dodana do spoczynkowych hodowli młodych fibroblastów ludzkich [97, 98] czy chemicznych [97]. Tego stymulującego efektu surowicy nie obserwowano natomiast w komórkach starych (także znajdujących się w fazie G1), lecz nie odpowiadających wznowieniem syntez DNA pod wpływem mitogenów czy czynników wzrostowych. Co więcej, w takich starych komórkach praktycznie nie wykrywano obecności mRNA odpowiedzialnych za syntezę cyklin A i B [98].

Na bezpośredni związek kinazy p34cdc2 z syntezą DNA (i mitozą) wskazują też między innymi: obecność aktywnego enzymatycznie (kinazowo) heterokomple-

ksu kinazy p34cdc2 z cykliną w komórkach będących w fazie S [99] oraz zatrzymanie w fazie G2 komórek zawierających zmutowaną w C-końcu kinazę p34cdc2 [100] i komórek traktowanych przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiej kinazie p34cdc2 [77]. Co więcej, w komórkach ssaków zatrzymanych w mitozie działaniem czynników uszkadzających wrzecziono mitotyczne stwierdzono podwyższony poziom aktywności kinazy p34cdc2 [101], w komórkach zaś zatrzymanych w fazie G2 (np. działaniem przeciwnowotworowego leku — etopozydu) znaleziono obniżony poziom aktywności tej kinazy [102, 103].

Niski poziom aktywności kinazy p34cdc2 i brak inicjacji mitozy może być wywołany także przez niezreplikowany DNA [104], być może, poprzez wpływ na poziom ufosforylowania p34cdc2. Wydaje się, że może to być zarówno aktywacja kinazy tyrozynowej odpowiedzialnej za fosforylację kinazy p34cdc2 [53] jak i hamowanie fosfatazy *cdc25* [93], nie zaś hamujący wpływ na syntezę cyklin i ewentualne zaburzenia ich wiązania z kinazą p34cdc2. Na udział produktu genu *cdc25* w powiązaniach replikacji DNA i mitozy wskazują też wyniki badań tych procesów w mutantach *S. pombe* charakteryzujących się bądź to nadekspresją genu *cdc25* bądź też obecnością zmienionej kinazy p34cdc2, nie wymagającej do aktywacji usunięcia fosforanu z fosfotyrozyny [105]. W podwójnych mutantach drożdży *S. pombe* nie wykazujących aktywności kinaz kodowanych przez geny *wee1* i *mik1* kinaza p34cdc2 nie jest ufosforylowana lub ufosforylowana jedynie w bardzo słabym stopniu. Jest więc stale aktywna co „zezwała” na rozpoczęcie mitozy komórkom znajdującym się w każdym momencie cyklu komórkowego, niezależnie od tego czy została już, czy też nie, zakończona replikacja DNA [52].

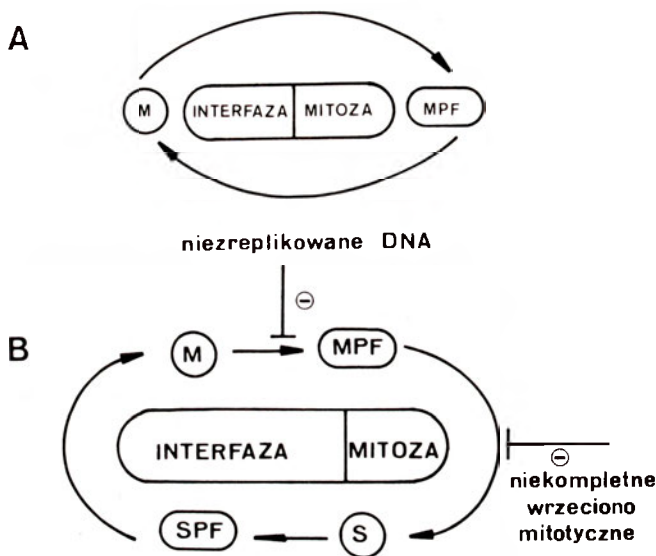
Dalszych bezpośrednich dowodów na udział kinazy p34cdc2 w replikacji DNA dostarczyły wyniki badań, w których bądź to ekstrakty jaj *Xenopus* [106] bądź też mutanty *S. pombe* [35] w różny sposób pozbawiono kinazy p34cdc2. I tak w ekstraktach z jaj *Xenopus*, obserwowano zahamowanie rozpoczęcia replikacji DNA, (przy braku wpływu na powielanie DNA na już uprzednio utworzonych widełkach replikacyjnych), co wydaje się sugerować, że działanie kinazy p34cdc2 wymagane jest na etapie poprzedzającym rozpoczęcie replikacji. Z kolei w mutantach *S. pombe* zawierających zmienione, na skutek mutacji w genie *cdc2*, białko p34 o podwyższonej podatności na proteolizę, obserwowano wystąpienie diploidyzacji DNA skorelowanej z wyraźnie obniżonym komórkowym poziomem kinazy p34cdc2. Sugerowano zatem, że w sytuacji „niedoboru” kinazy p34cdc2 komórka jak gdyby „zapomina” o tym, że znajduje się w fazie G2 i podejmuje syntezę DNA zamiast rozpocząć mitozę.

Tak więc niezbędność obecności aktywnej kinazy p34cdc2 dwukrotnie w czasie cyklu komórkowego wydaje się udowodniona. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że poziom aktywności enzymatycznej, ufos-



forylowania czy też asocjacja z innymi białkami mogą być w każdym z tych etapów różne.

W 1991 r. wysunięto przypuszczenie, że kinaza p34cdc2 może występować w komórkach w co najmniej dwóch ulegających interkonwersji formach, tj. w formie S właściwej dla rozpoczęcia fazy S i w formie M niezbędnej dla wejścia komórek w mitozę [35] (Ryc. 2). Uwzględniając tę możliwość, jak również założenie,



Ryc. 2. Schematy embrjonalnego (A) i postembrjonalnego (B) cyklu komórkowego (wg 107, zmodyfikowany)  
M i S formy kinazy p34cdc2  
MPF — kompleks kinazy p34cdc2 w formie M z cykliną B i produktem genu *sucl*  
SPF — kompleks kinazy p34cdc2 w formie S z cyklinami fazy G1

że komórka może znajdować się tylko w jednym z dwóch stabilnych stanów cyklu komórkowego, mitozie i interfazie, zdeterminowanych aktywnością kinazy p34cdc2 [86] Murray ostatnio zaproponował następującą hipotezę przebiegu cyklu komórkowego komórek embrjonalnych i somatycznych [102]. Według tej hipotezy w cyklu komórek embrjonalnych występujące naprzemiennie mitozą i interfazą kontrolowane są jedynie przez zmiany aktywności kinazowego kompleksu p34cdc2 z cykliną B (MPF). W cyklu komórek somatycznych jak się zakłada, działa też drugi dodatkowy kompleks będący heterodimerem złożonym z kinazy p34cdc2 z cyklinami charakterystycznymi dla fazy G1 (SPF). Heterodimer ten miałby stanowić czynnik umożliwiający komórkom przejście punktu restrykcyjnego START [108] — „wydarzenia”, po którym komórki ukierunkowane są na syntezę DNA. Kinaza aktywna w fazie M stymulować musiałaby powstanie formy S i czynnika SPF, z kolei zaś SPF powstawanie formy M i kompleksu MPF aktywnego w mitozie.

Cyklinami charakterystycznymi dla fazy G1 są u drożdży białka kodowane przez geny *CLN* [108-110], w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych rolę tę wydają się pełnić cykliny z grupy A [41, 111, 112]. Stale wzrastająca liczba wykrywanych cyk-

lin komórkowych [113-118] sugeruje ponadto, że funkcję cyklin fazy G1 mogłyby pełnić także jeszcze białka inne niż cyklina A. Schemat przedstawiony na rycinie 2 nasuwa też pytanie jak niektóre komórki, np. poliploidalne, omijają to regularne w czasie następowania faz. Pozostaje ciągle do wyjaśnienia czy następuje w nich degradacja kinazy p34cdc2, jak po ukończeniu każdej rundy syntezy DNA w omawianych już mutantach drożdży, czy też komórki takie posiadają inne jakieś mechanizmy omijające blok syntezy DNA bez zakończenia mitozy.

Czy kinazy p34cdc2 uczestniczące w przejściu G1-S i G2-M są tymi samymi białkami, czy też białkami homologicznymi? Wydaje się, że przynajmniej w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych są to odrębne białka [31, 100, 119-126]. Przejawiają one aktywność kinazową i są określane jako kinazy cdk tj. kinazy czynne w procesie podziału komórek (*cdk*, *cell division kinase*) lub też kinazy zależne od obecności cyklin (*cyclin dependent kinase*). Transkrypt genu kodującego kinazę cdk2 z komórek ludzkich składa się z 2,1 kilobaz i koduje polipeptyd złożony z 298 aminokwasów, wykazujący znaczne podobieństwo strukturalne do kinaz cdk2 z innych komórek jak również do kinazy p34cdc2 [123]. Kinazy cdk2 z jaj *Xenopus* [121] i komórek ludzkich [125, 126] w odróżnieniu od kinazy p34cdc2, tworzą kompleksy z cykliną A, a nie tworzą go z cykliną B. Aktywność kinaz cdk2 nie spada także w końcowych etapach mitozy. Co więcej, pozbawienie ekstraktu z jaj *Xenopus* kinazy cdk2 blokuje w nich rozpoczęcie syntezy DNA będąc bez wpływu na rozpoczęcie mitozy [121]. Ostatnio wykazano, że cyklina A tworzy kompleksy zarówno z kinazą cdk2 jak i p34cdc2, powodując pojawianie się aktywności kinaz zarówno w fazie S, jak i pod koniec fazy G2 [126]. Pojawienie się aktywności kompleksu kinazy cdk2 z cykliną A w fazie S cyklu pozwala przypuszczać, że uczestniczy ona, lub też kontroluje wydarzenia przebiegające równoległe do syntezy DNA.

#### IV. Uwagi końcowe

Omawiane dotychczas dane dokumentowały uniwersalność mechanizmów kontrolujących cykl komórkowy i podkreślały szczególną rolę kinazy p34cdc2 oraz białek homologicznych przynajmniej w dwóch etapach cyklu. Wspomniano również o ważnych dla prawidłowego przebiegu cyklu genach *nimA*, *rad9* i *rec1* uczestniczących, jak się do niedawna wydawało, w niepowiązanych z kinazą p34cdc2 mechanizmach kontrolnych. Ostatnio publikowane prace wskazują jednakże na pewne powiązania działania produktów tych genów z działaniem kinazy p34cdc2. I tak w *Aspergillus nidulans* do rozpoczęcia mitozy wydaje się być niezbędna zarówno aktywność kinazy p34cdc2, jak i kinazy kodowanej przez gen *nimA* [127]. Mutanty *Aspergillus* pozbawione aktywności kinazy kodowanej

przez gen *nimA* nie podejmowały bowiem podziałów. Inhibitorem efektów wywoływanych przez gen *nimA* jest produkt genu *bimE* [128]. Tak więc prawidłowa interakcja działania produktów aż trzech genów — *cdc2*, *nimA* i *bimE* umożliwia rozpoczęcie mitozy w *Aspergillus nidulans* [129].

Z kolei działanie genu *rad9*, odpowiedzialnego u *S. pombe* za zatrzymanie podziału komórki następujące w wyniku uszkodzenia DNA pod wpływem radiacji, wydaje się mieć związek z inaktywacją kinazy p34cdc2. Przypuszczalny mechanizm, w którym uczestniczy gen *rad9* i jego homologi, zakłada, że geny *rad* mogą indukować wydarzenia prowadzące do uczynienia genu *wee1*, negatywnego regulatora kinazy p34cdc2 [130-132]. Mniej prawdopodobny wydaje się hamujący wpływ produktów genów *rad* na ekspresję genu *cdc25* [132]. Wydaje się, że ten ostatni mechanizm działa tylko wówczas, gdy synteza DNA zahamowana jest przez specyficzne inhibitory [105].

Regulatorem aktywności kinazy p34cdc2 jest także jądrowe białko wiążące DNA, kodowane przez gen *rcc1* w komórkach kręgowców i owadów [133] i homologiczny do nich gen *pim1* u *S. pombe* [134]. Eksperymentalnie spowodowany brak białka RCC1 kodowanego przez te geny wywołuje w komórkach znajdujących się tylko w fazie syntezy DNA rozprężenie cyklu i przedwczesne zapoczątkowanie mitozy, równoczesne ze wzrostem aktywności kinazy p34cdc2 [135]. Do aktywacji kinazy p34cdc2 w tym układzie konieczna jest także, oprócz obecności cykliny B, obecność jednego lub kilku białek dotychczas bliżej nie opisanych [135].

Z przedstawionego przeglądu wynika, że nasza wiedza o mechanizmach regulujących przebieg cyklu mitotycznego komórek prawidłowych pogłębia się coraz bardziej. Przyczyni się to z pewnością także do poznania podłoża zaburzeń regulacji cyklu w komórkach nowotworowych. Wydaje się bowiem, że mechanizmy leżące u podstaw często spotykanej w komórkach nowotworowych aneuploidyzacji, czy też zatrzymania ich w fazie G2 cyklu, mogą być podobne do mechanizmów spotykanych w omawianych powyżej komórkach drożdży [136]. Ponadto odkrycie, że wśród licznych substratów, na które działają w komórce kinaza p34cdc2 lub jej homologi są też białka kodowane przez geny *Rb* i *p53* będące supresorami nowotworów, stwarza dalsze możliwości badania mechanizmów funkcjonowania tych endogennych inhibitorów podziałów komórkowych [137-139]. I ostatnia rzecz będąca jak gdyby praktycznym zastosowaniem informacji, że kinaza p34cdc2 jest kluczowym enzymem dla przebiegu mitozy. Opracowano mianowicie pomysłowy test, z zastosowaniem immobilizowanej na płytkach aktywnej kinazy p34cdc2 [137], do badania *in vitro* związków o działaniu antymitotycznym, potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

Artykuł otrzymano 5 maja 1992 r.  
Zaakceptowano do druku 28 maja 1992 r.

## Piśmiennictwo

- Lohka M (1989) *J Cell Sci* **92**: 131-135
- Lewin B (1990) *Cell* **61**: 743-752
- Draetta G (1990) *Trend Biochem Sci* **15**: 378-383
- Tyson JJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7328-7332
- Kawiak J (1990) *Post Biol Kom* **17**: 325-333
- Jakubowicz T (1991) *Post Biochem* **37**: 9-18
- Wójcik C (1991) *Post Biol Kom* **18**: 153-167
- Gould K L, Nurse P (1989) *Nature* **342**: 39-45
- Hanks S H, Quinn A M, Hunter T (1988) *Science* **241**: 42-52
- Gould K L, Moreno S, Owen D J, Sazer S, Nurse P (1991) *EMBO J* **10**: 3297-3309
- Krek W, Nigg E A (1991) *EMBO J* **10**: 305-316
- Krek W, Nigg E A (1991) *EMBO J* **10**: 3331-3341
- Norbury C, Blow J, Nurse P (1991) *EMBO J* **10**: 3321-3329
- Gautier J, Matsukawa T, Nurse P, Maller J (1989) *Nature* **339**: 626-629
- Morla A O, Draetta G, Beach D, Wang J G J (1989) *Cell* **58**: 193-203
- Gould K L, Moreno S, Tonks N K, Nurse P (1990) *Science* **250**: 1573-1576
- Clarke P R, Karsenti E (1991) *J Cell Sci* **100**: 409-414
- Rossomando A J, Sanghera J S, Marsden L A, Weber U J, Pelech S L, Sturgill T W (1991) *J Biol Chem* **266**: 20270-20275
- Gotoh Y, Nishida E, Matsuda S, Shiina N, Kosako H, Shiokawa K, Akiyama T, Ohta K, Sakai H (1991) *Nature* **349**: 251-254
- Payne D M, Rossomando A J, Martino P, Erickson A K, Her J H, Shakanowitz J, Hunt D F, Weber M J, Sturgill T W (1991) *EMBO J* **10**: 885-892
- Sturgill T W, Wu J (1991) *Biochim Biophys Acta* **1092**: 350-357
- Glenney J R, jr (1992) *Biochim Biophys Acta* **1134**: 113-127
- Peter M, Sanghera J S, Pelech S L, Nigg E A (1992) *Eur J Biochem* **205**: 287-294
- Anderson N G, Maller J L, Tonks N K, Sturgill T W (1990) *Nature* **343**: 651-653
- Nurse P (1990) *Nature* **344**: 503-508
- Rime H, Yang J, Jessup C, Ozon R (1991) *Exp Cell Res* **196**: 241-245
- Amon A, Surana U, Muroff I, Nasmyth K (1992) *Nature* **355**: 368-371
- Sorger P K, Murray A W (1992) *Nature* **355**: 365-368
- Ducommun B, Brambilla P, Felix M A, Fianza B R, jr, Karsenti E, Draetta G (1991) *EMBO J* **10**: 3311-3319
- Carr A M, MacNeil S, Hayles J, Nurse P (1989) *Mol Gen Genet* **218**: 41-49
- Solomon M J, Glotzer M, Lee T H, Philippe M, Kirschner M W (1990) *Cell* **63**: 1013-1024
- Meijer L, Azzi L, Wang J Y J (1991) *EMBO J* **10**: 1545-1554
- Parker L L, Atherton-Fessler S, Lee M S, Ogg S, Falk J L, Swenson K J, Piwnicka-Worms H (1991) *EMBO J* **10**: 1255-1263
- Booher R N, Alfa C E, Hyams J S, Beach D H (1989) *Cell* **58**: 485-497
- Broek D, Bartlett R, Crawford K, Nurse P (1981) *Nature* **349**: 388-393
- Lee M G, Norbury C J, Spurr N K, Nurse P (1989) *Nature* **333**: 676-679
- Meijer L, Arion D, Golsteyn R, Pines J, Brizuela L, Hunt T, Beach D (1989) *EMBO J* **8**: 2275-2282
- Gautier J, Maller J L (1991) *EMBO J* **10**: 177-182
- Izumi T, Maller J L (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 3860-3867
- Pines J, Hunter T (1989) *Cell* **58**: 833-846
- Minshull J, Blow J J, Hunt T (1989) *Cell* **56**: 947-956
- Lohka M J, Hayes M K, Maller J L (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3009-3013
- Roy L M, Singh B, Gautier J, Arlinghaus R B, Nordeen S K, Maller J L (1990) *Cell* **61**: 825-831
- Felix M A, Labbe J C, Doree M, Hunt T, Karsenti E (1990) *Nature* **346**: 379-382



45. Luca FC, Ruderman JV (1989) *J Cell Biol* **109**: 1895-1909
46. Ben David Y, Letwin K, Tannock L, Bernstein A, Panson T (1991) *EMBO J* **10**: 317-325
47. Howell BW, Afar DEH, Lew J, Douville EMJ, Icely PLE, Gray DA, Bell JC (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 568-572
48. Stern DF, Zheng P, Beidler DR, Zerillo C (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 987-1001
49. Russel P, Nurse P (1987) *Cell* **49**: 559-567
50. Featherstone C, Russel P (1991) *Nature* **349**: 808-811
51. Igarashi M, Nagata A, Jinno S, Suto K, Okayama H (1991) *Nature* **353**: 80-83
52. Lundgren K, Walworth V, Booher R, Dembski M, Kirschner MW, Beach D (1991) *Cell* **64**: 1111-1122
53. Smythe C, Newport JW (1992) *Cell* **68**: 787-797
54. Ferris DK, White GA, Kelwin DJ, Copeland TD, Li CCH, Longo DL (1991) *Cell Growth & Different* **2**: 343-349
55. Solomon MJ, Lee T, Kirschner MW (1992) *Mol Biol Cell* **3**: 13-27
56. Russel P, Nurse P (1986) *Cell* **45**: 145-153
57. Moreno S, Hayles J, Nurse P (1989) *Cell* **58**: 361-372
58. Moreno S, Nurse P, Russel P (1990) *Nature* **344**: 549-552
59. Ducommun B, Draetta G, Young P, Beach D (1990) *Biochim Biophys Res Commun* **167**: 301-309
60. Edgar BA, O'Farrell PH (1989) *Cell* **57**: 177-187
61. Jimenez J, Alphey L, Nurse P, Glover DM (1990) *EMBO J* **9**: 3565-3571
62. Sadhu K, Reed SI, Richardson H, Russel P (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5139-5143
63. Kumagai A, Dunphy WG (1991) *Cell* **64**: 903-914
64. Strausfeld U, Labbe JC, Fenguet D, Cavadore JC, Picard A, Sadhu K, Russel P, Doree M (1991) *Nature* **351**: 242-245
65. Moreno S, Nurse P (1991) *Nature* **351**: 194
66. Guan K, Broyles SS, Dixon JE (1991) *Nature* **350**: 359-362
67. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK (1991) *Science* **253**: 401-406
68. Dunphy WG, Kumagai A (1991) *Cell* **67**: 189-196
69. Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, Buzan JF, Kirschner MW (1991) *Cell* **67**: 197-211
70. Millar JBA, McGowan CH, Lenaers G, Jones R, Russel P (1991) *EMBO J* **10**: 4301-4309
71. Galaktionov K, Beach D (1991) *Cell* **67**: 1181-1194
72. Millar JBA, Blewitt J, Gerace L, Sadhu K, Featherstone C, Russel P (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10500-10504
73. Lee MS, Ogg S, Xu M, Parker LL, Donoghue DJ, Maller JL, Piwnicka-Worms H (1992) *Mol Biol Cell* **3**: 73-84
74. Millar JBA, Russel P (1992) *Cell* **68**: 407-410
75. Jessus C, Beach D (1992) *Cell* **68**: 323-332
76. Dunphy W, Newport J (1989) *Cell* **58**: 181-191
77. Riabowol K, Draetta G, Brizuela D, Vandre D, Beach D (1989) *Cell* **57**: 393-401
78. Jessus C, Ducommun B, Beach D (1990) *FEBS Lett* **266**: 4-8
79. Azzi L, Meijer L, Reed SI, Pidikit R, Tung HYL (1992) *Eur J Biochem* **203**: 353-360
80. Ducommun B, Brambilla P, Draetta G (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 6177-6184
81. Felix MA, Cohen P, Karsenti E (1990) *EMBO J* **9**: 675-683
82. Picard A, Labbe JC, Barakat H, Cavadore JC, Doree M (1991) *J Cell Biol* **115**: 337-344
83. Lee TH, Solomon MJ, Mumby MC, Kirschner MW (1991) *Cell* **64**: 415-423
84. Sola MM, Langan T, Cohen P (1991) *Biochim Biophys Acta* **1094**: 211-216
85. Agostinis P, Derau R, Sarno S, Goris J, Merlevede W (1992) *Eur J Biochem* **205**: 241-248
86. Murray AW, Kirschner MW (1989) *Science* **246**: 614-621
87. Hartwell LH, Weinert TA (1989) *Science* **246**: 629-634
88. Nishimoto T, Eilen E, Basilico C (1978) *Cell* **15**: 475-483
89. Kai R, Ohtsubo M, Sekiguchi M, Nishimoto T (1986) *Molec Cell Biol* **5**: 2027-2032
90. Osmani S, Engle D, Doonan J, Morris N (1989) *Cell* **52**: 241-252
91. Osmani S, Pu R, Morris N (1988) *Cell* **53**: 237-244
92. Weinert T, Hartwell L (1988) *Science* **241**: 317-322
93. Dasso M, Newport W (1990) *Cell* **61**: 811-829
94. Enoch T, Nurse P (1991) *Cell* **65**: 921-923
95. Furukawa Y, Piwnicka-Worms H, Ernst TJ, Kanakura Y, Griffin JD (1990) *Science* **250**: 805-808
96. Surmacz E, Nugent P, Pietrzykowski Z, Basegra T (1992) *Exp Cell Res* **199**: 275-278
97. Richter KH, Afshari CA, Annab LA, Burkhart BA, Owen RD, Boyd J, Barret JC (1991) *Cancer Res* **51**: 6010-6013
98. Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11012-11016
99. D'Urso G, Maraccino RL, Marshak DR, Roberts JM (1990) *Science* **250**: 786-791
100. Yasuda H, Kamijo M, Honda R, Nakamura M, Hanaoka F, Ohba Y (1991) *Cell Structure & Function* **16**: 105-112
101. Kung AL, Sherwood SW, Shimke RT (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9553-9557
102. Lock RB, Ross WE (1992) *Cancer Res* **52**: 1817-1823
103. Lock RB, Ross WE (1990) *Cancer Res* **50**: 3767-3771
104. Blow JJ, Sheehan MA, Watson JV, Laskey RA (1989) *J Cell Sci Suppl* **12**: 183-195
105. Enoch T, Nurse P (1990) *Cell* **60**: 665-673
106. Blow JJ, Nurse P (1990) *Cell* **62**: 855-862
107. Murray AW (1991) *Nature* **349**: 367-368
108. Wittenberg C, Sugimoto K, Reed SI (1990) *Cell* **62**: 225-237
109. Richardson HE, Wittenberg C, Cross F, Reed SI (1989) *Cell* **59**: 1127-1133
110. Nasmyth K, Dirick L (1991) *Cell* **66**: 995-1013
111. Reed SI (1991) *Trends in Genet* **7**: 95-99
112. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJC (1991) *Cell* **67**: 1169-1179
113. Lew DJ, Dulic V, Reed SI (1991) *Cell* **66**: 1197-1206
114. Motokura T, Bloom T, Kim YG, Jueppner H, Ruberman J, Kronenberg H, Arnold A (1991) *Nature* **350**: 512-515
115. Hunt T (1991) *Nature* **350**: 462-463
116. Xiong Y, Beach D (1991) *Curr Biol* **1**: 362-364
117. North G (1991) *Nature* **351**: 604-605
118. Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Le Guellec K, Philippe M, Roberts JM (1991) *Cell* **66**: 1217-1228
119. Lehner CF, O'Farrell PH (1990) *EMBO J* **9**: 3573-3581
120. Paris J, Le Guellec R, Couturier A, Le Guellec K, Omilli F, Camonis J, MacNeill S, Philippe M (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1039-1043
121. Fang F, Newport JW (1991) *Cell* **66**: 731-742
122. Gabrielli BG, Roy LM, Gautier J, Philippe M, Maller JL (1992) *J Biol Chem* **267**: 1969-1975
123. Elledge SJ, Spottswood MR (1991) *EMBO J* **10**: 2653-2659
124. Ninomiya-Tsui J, Nomoto S, Yasuda H, Reed SI, Matsumoto K (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9006-9010
125. Tsai LH, Harlow E, Meyerson M (1991) *Nature* **353**: 174-177
126. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G (1992) *EMBO J* **11**: 961-971
127. Osmani AH, McGuire SL, Osmani SA (1991) *Cell* **67**: 283-291
128. Osmani AH, O'Donnell K, Pu RT, Osmani SA (1991) *EMBO J* **10**: 2669-2679
129. Murray AW (1991) *Nature* **353**: 701-702
130. Al-Khodairy R, Carr AM (1992) *EMBO J* **11**: 1343-1350
131. Rowley R, Subramani S, Young PG (1992) *EMBO J* **11**: 1335-1342



132. Rowley R, Hudson J, Young PG (1992) *Nature* **356**: 353-355
133. Matsumoto T, Beach D (1991) *Cell* **66**: 347-360
134. Ohtsubo M, Yoshida T, Seino H, Nishitani H, Clark KL, Sprague GF jr, Frasch M, Nishimoto T (1991) *EMBO J* **10**: 1265-1273
135. Nishitani H, Ohtsubo M, Yamashita K, Jida H, Pines J, Yasudo H, Shibata Y, Hunter T, Nishimoto T (1991) *EMBO J* **10**: 1555-1564
136. Baguley BC (1991) *J Natl Cancer Inst* **83**: 896-898
137. Riale V, Meijer L (1991) *Anticancer Res* **11**: 1581-1590
138. Gaetano C, Matsumoto K, Thiele CJ (1991) *Cell Growth & Different* **2**: 487-493
139. Lees JA, Buchkovich KJ, Marshak DR, Anderson CW, Harlow E (1991) *EMBO J* **10**: 4279-4290

## Metabolizm fosfatydyloinozytoli i ich rola w przekazywaniu informacji w komórkach roślinnych

### Metabolism of phosphoinositides and their role in signal transduction in plant cells.

MAŁGORZATA CZARNY<sup>1</sup>  
HANNA PODDANA<sup>1</sup>  
JOLANTA BARAŃSKA<sup>2</sup>

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Przekazywanie informacji w komórce
  1. Stymulacja komórki
  2. Białka G
  3. Fosfolipaza C
  4. Fosfolipidy inozytowe
  5. Diacyloglicerole i białkowa kinaza C
  6. Fosfoinozytyle
  7. Mobilizacja wapnia w komórce
- III. Uwagi końcowe

#### Contens:

- I. Introduction
- II. Signal transduction in the cell
  1. Cell stimulation
  2. G proteins
  3. Phospholipase C
  4. Phosphoinositides
  5. Diacylglycerol and protein kinase C
  6. Inositol phosphates
  7. Calcium mobilization in the cell
- III. Concluding remarks

#### Wykaz stosowanych skrótów:

CDPDG — CDPdiacyloglicerol; DG — diacyloglicerol; Ins — myoinozytol; InsP — monofosfoinozytyle; Ins(1)P — inozytolo(1)fosforan; Ins(4)P — inozytolo(4)fosforan;

InsP<sub>2</sub> — bisfosfoinozytyle; Ins(1, 4)P<sub>2</sub> — inozytolo(1, 4)bisfosforan; Ins(4, 5)P<sub>2</sub> — inozytolo(4, 5)bisfosforan; Ins(1, 4, 5)P<sub>3</sub> — inozytolo(1, 4, 5)trisfosforan, InsP<sub>3</sub>, trisfosfoinozytol; Ins(1, 3, 4)P<sub>3</sub> — inozytolo(1, 3, 4)trisfosforan (nie objęty nazwą InsP<sub>3</sub>); Ins(2, 4, 5)P<sub>3</sub> — inozytolo(2, 4, 5)trisfosforan; InsP<sub>4</sub> — tetrakisfosfoinozytyle; Ins(1, 3, 4, 5)P<sub>4</sub> — inozytolo(1, 3, 4, 5)tetrakisfosforan; Ins(1, 3, 4, 6)P<sub>4</sub> — inozytolo(1, 3, 4, 6)tetrakisfosforan; InsP<sub>5</sub> — pentakisfosfoinozytyle; Ins(1, 3, 4, 5, 6)P<sub>5</sub> — inozytolo(1, 3, 4, 5, 6)pentakisfosforan; InsP<sub>6</sub> — heksakisfosfoinozytol; InsP<sub>3</sub>R — receptor trisfosfoinozytoli; PA — kwas fosfatydowy; PLC — fosfolipaza C; PKC — kinaza białkowa C; PtdIns — fosfatydyloinozytol; PtdInsP — fosfatydyloinozytlofosforan; PtdIns(3)P — fosfatydyloinozytolo(3)fosforan; PtdIns(4)P — fosfatydyloinozytolo(4)fosforan; PtdIns(3, 4)P<sub>2</sub> — fosfatydyloinozytolo(3, 4)bisfosforan; PtdIns(4, 5)P<sub>2</sub> — fosfatydyloinozytolo(4, 5)bisfosforan; PtdIns(3, 4, 5)P<sub>3</sub> — fosfatydyloinozytolo(3, 4, 5)trisfosforan; TPA — ester forbolu (12-mirystylo, 13-acetylo ester forbolu).

#### I. Wstęp

Niewiele jeszcze wiadomo na temat mechanizmów przewodzenia wewnątrzkomórkowego sygnałów i ich przemiany w odpowiedź w komórkach roślinnych [1, 2, 3]. W komórkach zwierzęcych funkcjonują dwa podstawowe szlaki przekazywania informacji wewnątrzkomórkowej. Pierwszy związany jest z powstawaniem cyklicznego AMP, drugi — z hydrolizą fosfatydyloinozytoli. W roślinach wyższych stwierdzono istnienie cyklicznego AMP [4], ale jak do tej pory nie wykazano, czy pełni on rolę wtórnego przekaźnika

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

informacji [3]. Wiadomo jednak, że i w tych organizmach znajdują się układy prowadzące do hydrolizy fosfolipidów inozytolowych, oraz zachodzą przekształcenia metaboliczne produktów ich degradacji. Choćby dlatego można sądzić, że i w roślinach funkcjonuje drugi szlak przekazywania informacji, w którym powstają dwa wtórne przekaźniki — trisfosfoinozytol,  $\text{Ins}(1, 4, 5) \text{P}_3$  i diacyloglicerol, DG [1, 2, 3]. Znaczenie tych przekaźników, jak również czynników pobudzających hydrolizę fosfolipidów inozytolowych w komórkach zwierzęcych omawiają liczne artykuły przeglądowe [5-9]\*.

Niniejsza praca stara się podsumować stan wiedzy na temat metabolizmu fosfatydyloinozytoli i ich roli w przekazywaniu informacji w komórkach roślinnych, próbując znaleźć analogie pomiędzy światem roślin i zwierząt.

## II. Przekazywanie informacji

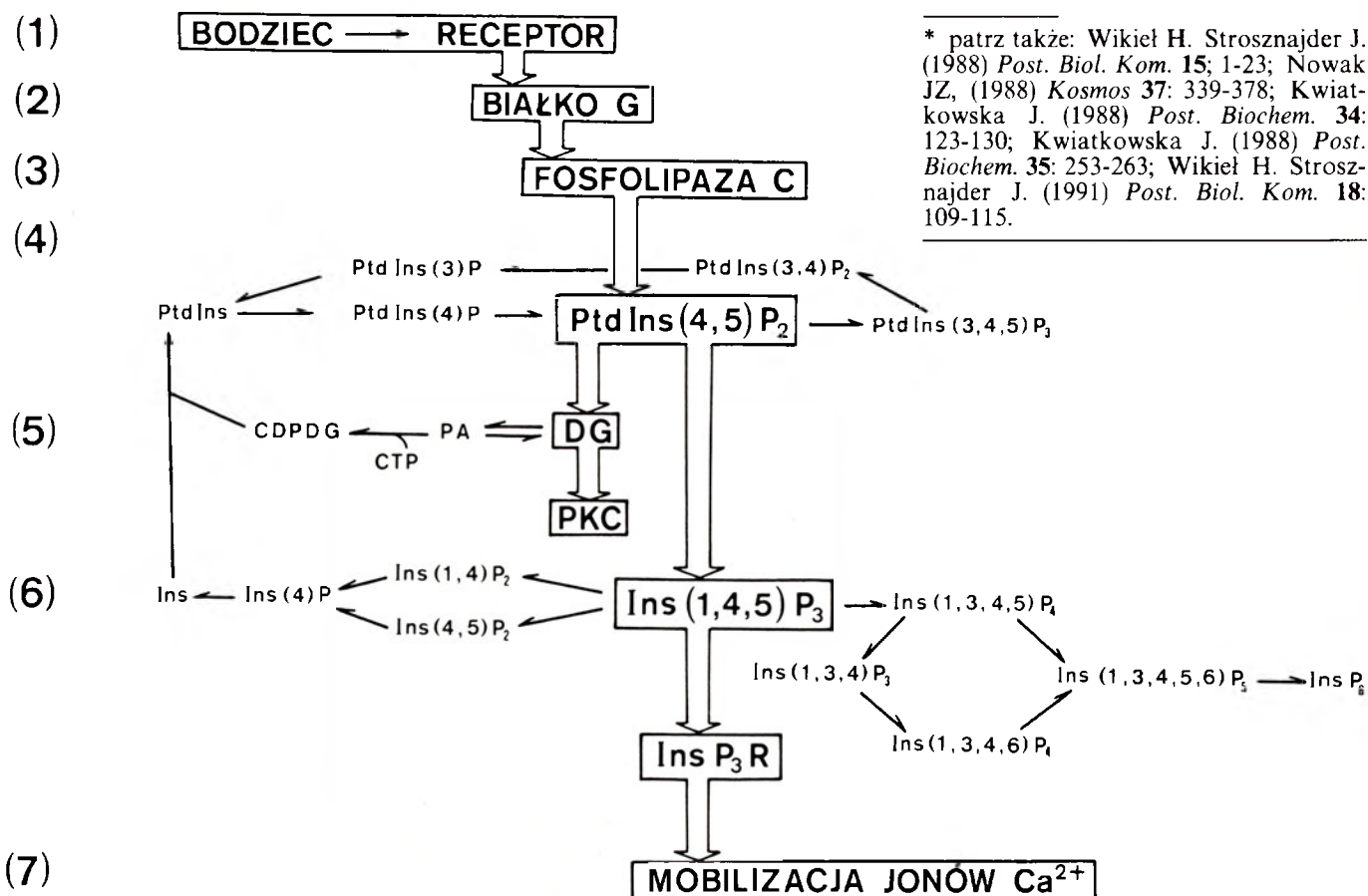
Rycina 1 prezentuje schemat ilustrujący metabolizm fosfatydyloinozytoli i ich rolę w przekazywaniu informacji w komórkach zwierzęcych i roślinnych; stanowi także plan artykułu z zaznaczeniem kolejności omawianych problemów.

### 1. Stymulacja komórki

Mechanizm przekazywania informacji z udziałem fosfatydyloinozytoli jest już dobrze poznany [5-7]. Powszechnie wiadomo, że w komórkach zwierzęcych

informacja niesiona przez różnorodne bodźce jest odbierana przez receptory znajdujące się na zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej [5-7]. W komórkach roślinnych, jak do tej pory, nie udało się wyizolować tego rodzaju receptorów [1, 2, 3]. Fakt ten, nawet przy ogólnie niskim stanie wiedzy o roślinnych białkach błonowych, jest zdumiewający [2]. Dlatego rozważając wczesny etap procesu sygnałowego, jedynie zakłada się istnienie systemu receptorów odbierających określone bodźce. Pośrednich dowodów na istnienie takiego systemu dostarczają badania nad działaniem auksyny [10], światła [11], szoku osmotycznego [12], czy grawitacji [2, 3]. I tak, dodanie do znakowanej uprzednio [ $^3\text{H}$ ] inozytlem kultury komórkowej *Catharanthus roseus*, syntetycznego analogu auksyny — 2, 4-D, powoduje szybki wzrost poziomu  $\text{Ins}(4, 5) \text{P}_2$  i  $\text{Ins}(1, 4, 5) \text{P}_3$  [10]. Tak jak w organizmach zwierzęcych zmianom tym towarzyszy spadek poziomu znakowanego  $\text{PtdInsP}$  i  $\text{PtdIns}(4, 5) \text{P}_2$ . Także ekspozycja na światło poduszczonej liściowej *Samanea saman* (roślina z rodziny Mimoszowatych) już po 15 s powoduje wzrost poziomu  $\text{Ins}(4, 5) \text{P}_2$  oraz  $\text{Ins}(1, 4, 5) \text{P}_3$  [11]. Podobnie reagują jednokomórkowe glony *Dunaliella salina*, w których szok hypoosmotyczny powoduje gwałtowny spadek poziomu fosfolipidów inozytolowych  $\text{PtdInsP}$  i  $\text{PtdIns}(4, 5) \text{P}_2$  [12].

Dane te pozwalają sądzić o istnieniu specyficznych receptorów, ale pozostawiają wątpliwości, czy na pewno są one integralnymi składnikami białkowymi plazmolemy [2].



## 2. Białka G

Występowanie białek G w organizmach roślinnych wykazano pośrednio, dzięki doświadczeniom stwierdzającym wiązanie GTP i jego niehydrolizującego analogu do frakcji błonowej [13]. Ostatnio zidentyfikowano białka G w plazmolemme wielu roślin wyższych, używając przeciwciał przeciwko podjednostce  $\alpha$  króliczych białek G [13]. Wyizolowane białka G (podjednostka  $\alpha$ ) charakteryzują się niższą masą cząsteczkową (20-30 kD) niż ta, która występuje w organizmach zwierzęcych (39-41 kD). Na tej podstawie E i n s p a h r i T h o m p s o n [2] wysunęli przypuszczenie, że być może nie należą one do tej samej rodziny co trójpodjednostkowe zwierzęce białka G.

Dowody na włączenie białek G w łańcuch przekazywania informacji w komórkach roślinnych pochodzą z prób ich izolowania, identyfikacji, porównania właściwości z własnościami charakterystycznymi dla zwierzęcych białek G, oraz z prób wykazania ich udziału w obrocie polifosfoinozytoli. Jak do tej pory nie uzyskano bezpośrednich dowodów na udział białek G w przekazywaniu informacji związanej z hydrolizą

**Ryc. 1.** Udział fosfolipidów inozytolowych w przekazywaniu informacji w komórce zwierzęcej i roślinnej. Kolejne numery znajdujące się po lewej stronie rysunku (1-7) odpowiadają poszczególnym podrozdziałom artykułu.

- (1) W komórce zwierzęcej zewnętrzne bodźce działają na znajdujące się na zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej receptory. W komórce roślinnej, jak dotąd nie udało się wykazać ich obecności.
- (2) Zarówno w komórkach zwierzęcych, jak i roślinnych, istnieją pośrednie dowody na włączenie białek G w proces przekazywania informacji.
- (3) Sygnał poprzez białko G przekazywany jest na fosfolipazę C, która zarówno w roślinach, jak i w zwierzętach hydrolizuje  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  do dwóch wtórnych przekaźników informacji:  $\text{DG}$  i  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .
- (4)  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  jest defosforylowany do  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$  i dalej do  $\text{PtdIns}$ . Odpowiednie kinazy (z udziałem ATP i  $\text{Mg}^{2+}$ ) odwracają przebieg tych reakcji. Powyższe przekształcenia występują zarówno w świecie zwierząt i roślin. Klasa fosfolipidów inozytolowych (z grupą fosforanową w pozycji 3 pierścienia inozytolowego) znaleziona została w organizmach zwierzęcych i jednokomórkowych glonach. W komórkach roślin wyższych nie stwierdzono występowania tych związków.
- (5) Wtórny przekaźnik informacji  $\text{DG}$ , aktywuje kinazę białkową C (PKC) i jest szybko metabolizowany z udziałem kinazy diacyloglicerolowej i ATP do kwasu fosfatydowego (PA). PA przekształca się w  $\text{CDP}$ -diacyloglicerol ( $\text{CDPDG}$ ), który reaguje z *myo*-inozytolem ( $\text{Ins}$ ) tworząc  $\text{PtdIns}$ . Przekształcenia te zachodzą w obu typach komórek.
- (6) Drugi wtórny przekaźnik —  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ulega zarówno w jednych jak i drugich komórkach licznym przekształceniom metabolicznym. Głównym produktem defosforylacji tego związku w świecie zwierząt i u jednokomórkowych glonów jest  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ , podczas gdy  $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$  jest dominującym produktem wśród roślin wyższych. Polifosfoinozytole są szeroko rozpowszechnione w organizmach zwierzęcych. W świecie roślin wykazano ich obecność jedynie w glonach *Chlamydomonas eugametos*, gdzie  $\text{InsP}_3$  wydaje się pochodzić z bezpośrednich fosforylacji  $\text{InsP}_3$ , (b) podczas gdy u zwierząt powstaje w wyniku następujących po sobie procesów fosforylacji i defosforylacji (a).
- (7) Biologiczna rola  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  polega na mobilizacji  $\text{Ca}^{2+}$  zarówno w komórce zwierzęcej jak i roślinnej. W endoplazmatycznym retikulum komórek zwierzęcych i w wakuolach komórki roślinnej wykazano obecność specyficznych receptorów dla  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  wiążąc się z receptorem ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) powoduje zmianę konformacyjną jego podjednostek, otwarcie kanału i wpływ  $\text{Ca}^{2+}$  do cytosolu.

$\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , natomiast pośrednie dowody wskazują na ich rolę w regulacji aktywności fosfolipazy C (PLC).

## 3. Fosfolipaza C

W wielu tkankach roślin wyższych wykazano aktywność fosfolipazy C (PLC) specyficznie hydrolizującej fosfolipidy inozytolowe [1, 2, 3]. Udało się wyizolować dwie formy tego enzymu — rozpuszczalną i związaną z błoną komórkową [14]. Substratami dla fosfolipazy C w plazmolemme są fosfatydyloinozytolo(4)fosforan ( $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ ) i fosfatydyloinozytolo(4, 5) bisfosforan ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ), natomiast nie jest nim fosfatydyloinozytol ( $\text{PtdIns}$ ). Odwrotna sytuacja ma miejsce z fosfolipazą C występującą w cytosolu. Aktywność wszystkich izomerycznych form roślinnej fosfolipazy C zależy od  $\text{Ca}^{2+}$ . Optymalne stężenie wapnia jest typowe dla określonych gatunków roślin i waha się w granicach od  $10^{-5}$  do  $10^{-4}$  M [14]. Ta właściwość roślinnego enzymu odróżnia go od analogicznej fosfolipazy C działającej w komórkach zwierzęcych. Fosfolipaza C hydrolizująca  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  wykazuje bowiem maksimum aktywności przy stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  poniżej  $10^{-6}$  M, które odpowiada poziomowi tego jonu w komórce zwierzęcej przed pobudzeniem [5-7].

## 4. Fosfolipidy inozytolowe

Zarówno w materiale z całych roślin, jak i w hodowlach komórek i tkanek, stwierdzono występowanie  $\text{PtdIns}$ ,  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$  i  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ . Wykazano, że ilość  $\text{PtdIns}$  jest dwukrotnie większa (8—15 mol%) niż ta znajdująca w błonach komórek zwierzęcych [2]. Ufosforylowane formy  $\text{PtdIns}$ , przez wiele lat nie były identyfikowane w organizmach roślinnych z powodu ich znikomych ilości. W roślinach występują ponadto znaczne ilości fosfolipidowych lipopochodnych migrujących w układach chromatograficznych (chromatografia cienkowarstwowa — TLC) razem z fosfolipidami inozytolowymi [14]. Dopiero bardziej nowoczesne techniki analityczne (HPLC — wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa) pozwoliły na ich wyodrębnienie i oznaczenie ilościowe. Stwierdzono, że zawartość  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  w komórkach roślinnych nie przekracza 1% wszystkich fosfolipidów inozytolowych [2]. W błonie plazmatycznej poziom  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$  i  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  wynosi odpowiednio 5% i 1,5% całości fosfolipidów błonowych [14, 16]. Roślinne fosfolipidy inozytolowe różnią się zasadniczo od fosfolipidów inozytolowych zwierzęcych składem kwasów tłuszczowych. Główne kwasy tłuszczowe fosfolipidów inozytolowych komórek zwierzęcych to kwas stearynowy i kwas arachidonowy [9], natomiast komórek roślinnych kwas palmitynowy, linolowy i linolenowy [3]. Jak dotąd nie stwierdzono w cząsteczce fosfolipidów inozytolowych roślin wyższych obecności kwasu arachidonowego.



Fosforylacja PtdIns do PtdIns(4)P i dalej PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> przebiega, podobnie jak w organizmach zwierzęcych z udziałem określonych kinaz, ATP i Mg<sup>2+</sup>. Wykazano, że u zwierząt PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> może ulegać dalszej fosforylacji z udziałem specyficznej kinazy wprowadzającej grupę fosforanową w położeniu 3 pierścienia inozytolowego. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oraz 3-podstawione produkty jego degradacji stanowią klasę fosfolipidów inozytolowych, której znaczenie biologiczne nie jest w pełni wyjaśnione, choć uważa się, że są istotne w procesach różnicowania komórek [17]. Fosfolipidy tej klasy nie zostały jeszcze wykryte wśród roślin wyższych [1, 2, 3], natomiast znaleziono je u jednokomórkowych glonów *Chlamydomonas eugametos* [18]. W komórkach *Catharantus roseus* zaobserwowano, że aktywności kinaz PtdIns i PtdInsP zmieniają się w cyklu komórkowym osiągając maksimum w fazie podziału. W fazie elongacji komórki aktywność kinaz jest dużo niższa, jednak także znacząca [19]. Odwrotna reakcja — defosforylacja — zachodzi z udziałem fosfomonoesteraz. W glonach *Dunaliella salina* wykazano aktywność enzymów degradujących PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> do PtdIns(4)P i PtdIns(4)P do PtdIns [15]. W błonach plazmatycznych nasion soi występuje natomiast zależna od Ca<sup>2+</sup> fosfomonoesteraza, wysoce specyficzna wobec PtdIns(4)P [3].

Fosfolipidem, który „odpowiada” na bodziec jest w komórkach roślinnych, podobnie jak i w zwierzęcych, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Należy sądzić, że zaktywowana poprzez białko G fosfolipaza C powoduje rozpad tego fosfolipidu do dwóch wtórnych przekazników InsP<sub>3</sub> i DG.

## 5. Diacyloglicerole i białkowa kinaza C

Wydaje się, że podobnie jak u zwierząt tak i u roślin, DG pojawia się w wyniku stymulacji komórki. Zaobserwowano, że w komórkach poduszeczki liściowej *Samanea saman*, ekspozycja na światło powoduje w ciągu 30 s podwyższenie zawartości DG [20].

Utworzone DG ulegają szybkim przemianom metabolicznym. Przez lipazy są degradowane do monogliceroli i glicerolu, a przez kinazę diacyloglicerolową fosforylowane do kwasu fosfatydowego (PA). Związana z błoną roślinna kinaza diacyloglicerolowa została ostatnio oczyszczona; jej masa cząsteczkowa wynosi 51 kD. Enzym wymaga do pełnej aktywności zarówno kationów dwuwartościowych jak i fosfolipidów [21]. W odróżnieniu, w komórkach zwierzęcych enzym ten został zidentyfikowany jako białko cytosolowe, 80 kD, którego translokacja do błony plazmatycznej jest indukowana przez DG [22]. Reakcja prowadzona przez ten enzym zapoczątkowuje resyntezę PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, podobnie jak ma to miejsce w świecie zwierząt.

W poddawanych szokowi osmotycznemu glonach *D. salina* obserwowano podwyższenie poziomu PA przy równoczesnym obniżeniu zawartości PtdIns(4)P

i PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Zjawisko to tłumaczono gwałtowną przemianą DG [12].

Diacyloglicerole są w komórkach zwierzęcych naturalnymi aktywatorami kinazy białkowej C (PKC). W roślinach opisano serynowo/treoninowe kinazy białkowe o podobnych własnościach jak PKC zwierzęce, to znaczy, wymagające do pełnej aktywacji Ca<sup>2+</sup>, fosfolipidów i DG. Wyizolowano i oczyszczono kinazy białkowe z *Cucurbita pepo* [23] oraz *Amaranthus tricolor* [24]. Kinaza z nasion *A. tricolor* o masie cząsteczkowej 84.5 kD maksimum aktywności wykazuje w obecności 1 μM Ca<sup>2+</sup>, 40 μg/ml fosfatydyloseryny i 8 μg/ml dioleiny (diacyloglicerolu zawierającego w cząsteczce dwa kwasy oleinowe) [24]. Aktywność tych enzymów, w przeciwieństwie do PKC z tkanek zwierzęcych, nie jest modyfikowana przez estry forbolu (TPA) [23, 24]. Natomiast aktywność kinazowa tego typu badana w ekstrakcie z pszenicy była zależna od estrów forbolu i ulegała stymulacji zarówno przez mieszaninę fosfatydyloseryny i TPA, jak i fosfatydyloseryny z dioleiną [25]. Ostatnie badania na komórkach *Nitella syncarpa* wykazały, że TPA modyfikuje napięciowo-zależne kanały wapniowe, a polimyksyna B (inhibitor PKC) znosi ten efekt [26].

Badania nad roślinną kinazą białkową C są jednak dopiero na początkowym etapie rozwoju, dlatego nie ma danych dotyczących regulacji tego enzymu.

## 6. Trisfosfoinozytol i inne fosfoinozytole

Identyfikacja rozpuszczalnych w wodzie produktów rozpadu fosfolipidów inozytolowych następczała dużych trudności. Problem stanowił fakt, że znakowane *in vivo* [<sup>3</sup>H] inozytolem rośliny, mogą metabolizować ten związek do kwasu glukuronowego, arabinozy, czy ksylozy [1, 2, 3]. Związki te, jako rozpuszczalne w wodzie wymywają się wspólnie z frakcją fosfoinozytoli zanieczyszczając ją. Jak dotąd, najlepszą metodą identyfikacji fosfoinozytoli roślinnych jest analiza HPLC, po rozdziale na kolumnie z wymiennicem anionowym [2].

W roślinach wyższych potwierdzono dotychczas obecność następujących polifosfoinozytoli: Ins(1)P, Ins(1,4)P<sub>2</sub>, Ins(4,5)P<sub>2</sub>, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> i Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> [2, 10, 14]. W organizmach tych występuje też inozytol podstawiony sześcioma grupami fosforanowymi. Ze względu na wrażliwość na działanie agonistów wyodrębniono dwie grupy polifosfoinozytoli występujących w komórkach zwierzęcych. Poziom „wrażliwych” polifosfoinozytoli zmienia się szybko po stymulacji komórki, natomiast „niewrażliwe”, takie jak InsP<sub>3</sub> i InsP<sub>6</sub>, reagują bardzo wolno [27]. Podejrzewa się, że te ostatnie związki pełnią funkcje strukturalne stanowiąc składniki błon [6]; mogą też działać jako bodźce zewnętrzne [28].

W roślinach InsP<sub>6</sub> jest szeroko rozpowszechniony i znany od dawna pod nazwą kwasu fitynowego. Wiadomo również o nim, że pełni funkcję wewnątrz-

komórkowego magazynu fosforu i innych jonów nieorganicznych, ważnych w rozwoju i kiełkowaniu roślin.

Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> w tkankach zwierzęcych jest metabolizowany do *myo*-inozytolu przez kolejne defosforylacje, bądź ulega fosforylacji z udziałem określonej kinazy i ATP. Proces defosforylacji Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> w roślinach wydaje się przebiegać w sposób bardziej skomplikowany. Defosforylacja Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> w świecie zwierząt prowadzi do powstania Ins(1,4)P<sub>2</sub>, podczas gdy u roślin powstają dwa związki: Ins(1,4)P<sub>2</sub> i Ins(4,5)P<sub>2</sub>. Ponadto, u zwierząt jony Li<sup>+</sup> hamują defosforylację monofosfoinozytoli, podczas gdy u roślin, w zależności od gatunku, odpowiedź na Li<sup>+</sup> może być różna — od braku wpływu do działania hamującego na reakcję defosforylacji bisfosfoinozytoli [3].

W świecie zwierząt fosforylacja Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> prowadzi do powstania polifosfoinozytolu z czterema grupami fosforanowymi — Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> [6]. Związek ten prawdopodobnie pełni rolę wtórnego przekaznika informacji działając synergistycznie z Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> w aktywacji kanałów w błonie plazmatycznej, a co za tym idzie, powoduje wnikanie Ca<sup>2+</sup> do komórki [6, 8].

Występowanie polifosfoinozytoli z czterema i pięcioma grupami fosforanowymi nie zostało jak dotąd potwierdzone w komórkach roślin wyższych [1, 2, 3]. Natomiast opisano je w zielonych glonach *Chlamydomonas eugametos* [18]. W tych jednokomórkowych organizmach wykazano, że fosforylacja Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> prowadzi do powstania Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>. Związek ten ulega defosforylacji do Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> lub dalszej fosforylacji do polifosfoinozytolu z pięcioma grupami fosforanowymi Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> [18].

Jednokomórkowe glony *C. eugametos* są także jedyne organizmami roślinnymi, w których wykazano występowanie niedawno odkrytej u zwierząt klasy fosfolipidów inozytolowych posiadających grupę fosforanową w pozycji 3 pierścienia inozytoloowego.

To podobieństwo przekształceń metabolicznych polifosfoinozytoli i fosfolipidów inozytolowych u jednokomórkowych glonów i u zwierząt, świadczy według Irvina o wykształceniu się tych związków już na wczesnym etapie rozwoju ewolucyjnego organizmów eukariotycznych [18].

## 7. Mobilizacja wapnia w komórce\*

W komórkach zwierzęcych powstaniu Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> towarzyszy zawsze wypływ Ca<sup>2+</sup> z magazynów wewnątrzkomórkowych do cytosolu [8]. Uważa się, że organellą, z której uwalniany jest wapń w czasie stymulacji komórki jest endoplazmatyczne retikulum. Wiadomo, że w jego błonie znajdują się specyficzne receptory (InsP<sub>3</sub>R) wiążące trisfosfoinozytol — Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. InsP<sub>3</sub>R jest tetramerem, jego pojed-

nostki tworzą kanał, przez który następuje uwolnienie Ca<sup>2+</sup> do cytosolu. W organizmach zwierzęcych zawartość Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie wynosi od 10<sup>-8</sup> do 10<sup>-7</sup> M [29].

Podobne stężenie wolnych jonów Ca<sup>2+</sup> występuje w komórkach roślinnych [3]. Natomiast wchodzący do komórki roślinnej wapń jest magazynowany głównie w wakuolach, a także w retikulum endoplazmatycznym. Stężenie Ca<sup>2+</sup> w wakuolach wynosi od 10<sup>-4</sup> do 10<sup>-2</sup> M. Pierwsze dane mówiące o uwalnianiu Ca<sup>2+</sup> przez Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> w komórkach roślinnych pochodzą z badań na frakcji mikrosomalnej z dyni [30] i z kukurydzy [31]. Ostatnio wykazano, że w izolowanych błonach wakuolarnych buraka znajdują się receptory dla Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> [32]. Związek ten już w stężeniu 10<sup>-6</sup> M wiąże się z receptorem, powoduje otwarcie kanału i wypływ Ca<sup>2+</sup>. Inne polifosfoinozytole, jak: Ins(1,4)P<sub>2</sub>, Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>, Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> i Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> nie wywierają podobnego działania. Otwieranie kanału InsP<sub>3</sub>R jest zależne od napięcia i podobnie jak w organizmach zwierzęcych [8, 29], jest hamowane przez heparynę [32].

To odkrycie wskazuje także na pokrewieństwo ewolucyjne świata roślin i zwierząt, które mimo szeregu różnic mają podobny model przekazywania informacji w komórce i związany z nim podobny system receptorów wewnątrzkomórkowych.

## III. Uwagi końcowe

Jest coraz bardziej oczywiste, że poszczególne elementy poznanego w świecie zwierząt układu przetwarzania informacji związanego z hydrolizą fosfolipidów inozytolowych występują także u roślin. Zasadniczą różnicą wydaje się być brak receptorów w błonie plazmatycznej komórek roślinnych. Wydaje się także, że roślinne białka G, ze względu na ich małą masę cząsteczkową, można zakwalifikować do innej rodziny niż trójpodjednostkowe białka zwierzęce. Występujące w świecie roślin fosfolipidy inozytowe nie zawierają, w odróżnieniu od zwierząt, kwasu arachidonowego. Charakteryzują się natomiast znacznymi ilościami lizopochodnych co stanowi dodatkową trudność w ich badaniu, nie tylko przy oznaczeniach lecz także przy rozumieniu ich roli biologicznej.

Poszczególne szlaki przemian metabolicznych fosfolipidów inozytolowych i polifosfoinozytoli w świecie roślin i zwierząt różnią się między sobą. Na przykład, znaleziono nieco inny szlak degradacji Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> w roślinach, i jak narazie, nie wykazano obecności InsP<sub>4</sub> i InsP<sub>5</sub> w roślinach wyższych. Jednak w ogólnym zarysie model przekształceń tych związków jest podobny.

Można przypuszczać, że wtórne przekazniki informacji DG i InsP<sub>3</sub> pełnią u roślin podobną rolę jak w organizmach zwierzęcych. Wydaje się, że DG aktywuje kinazę białkową C, choć nie zostało to jednoznacznie wykazane. Natomiast wiadomo, że InsP<sub>3</sub>

\* patrz także: Białczyk J. Lechowski Z. „Rola wapnia w funkcjonowaniu systemów informacyjnych komórki roślinnej”, *Wiadomości Botaniczne* 34(4): 11-30, 1990

odpowiada za mobilizację wapnia w komórce.

Ogromnie interesujące okazało się spostrzeżenie, że wakuole będące głównym magazynem  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce roślinnej mają specyficzne receptory dla  $\text{InsP}_3$  i podobnie jak w retikulum endoplazmatycznym zwierząt uwalniają przez nie wapń do cytoplazmy.

Podobieństwa układów przetwarzania informacji z udziałem fosfolipidów inozytowych w świecie zwierząt i roślin prowadzą także do wniosków ewolucyjnych. W organizmach prokariotycznych fosfolipidy inozytowe spotykane są rzadko [33]. Można zatem sądzić, że skok ewolucyjny między organizmami prokariotycznymi i eukariotycznymi nie polega tylko na różnicach morfologicznych czy metabolicznych, lecz także przejawia się w innym sposobie przekazywania informacji w komórce.

Artykuł otrzymano 5 maja 1992 r.

Zaakceptowano do druku 29 maja 1992 r.

## Piśmiennictwo

1. Morse MJ, Satter RL, Crain RG, Cotté GG (1989) *Physiologia Plantarum* **76**: 118-121
2. Einspahr KJ, Thompson GA Jr (1990) *Plant Physiol* **93**: 361-366
3. Lehle L (1990) *Plant Molecular Biology* **15**: 647-658
4. Brown EG, Newton RP (1981) *Phytochemistry* **20**: 2453-2463
5. Berridge MJ, Irvine RF (1984) *Nature* **312**: 315-321
6. Berridge MJ, Irvine RF (1989) *Nature* **341**: 197-205
7. Kwiatkowska J (1986) *Post Biochem* **32**: 329-334
8. Poddana H, Barańska J (1991) *Post Biochem* **37**: 2-5
9. Barańska J, Czarny M (1991) *Post Biochem* **37**: 129-132
10. Ettliger C, Lehle L (1988) *Nature* **331**: 176-178
11. Morse MJ, Crain RC, Satter RL (1987) *Proc. Natl. Acad Sci USA* **84**: 7075-7078
12. Einspahr KJ, Peeler TC, Thompson GA Jr (1988) *J Biol Chem* **263**: 5775-5779
13. Blum W, Hinsch KD, Schultz G, Weiler EW (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **156**: 954-959
14. McMurray WC, Irvine RF (1988) *Biochem J* **249**: 877-881
15. Einspahr KJ, Peeler TC, Thompson GA JR (1989) *Plant Physiol* **90**: 1115-1120
16. Peeler TC, Stephenson MB, Einspahr KJ, Thompson GA Jr (1989) *Plant Physiol* **89**: 970-976
17. Stephens LR, Hughes KT, Irvine RF (1991) *Nature* **351**: 33-39
18. Irvine RF, Letcher AJ, Stephens LR, Musgrave A (1992) *Biochem J* **281**: 261-266
19. Heim S, Wagner KC (1989) *Plant Sci* **63**: 159-165
20. Morse MJ, Crain RC, Cotté GG, Satter RL (1989) *Plant Physiol* **89**: 724-727
21. Wissing J, Heim S, Wagner KG (1989) *Plant Physiol* **90**: 1546-1551
22. Besterman JM, Pollenz RS, Booker EL Jr, Cuatrecasas P (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 9378-9382
23. Schafer A, Bygrave F, Matzenauer S, Marme D (1985) *FEBS Lett* **187**: 25-28
24. Elliot DC, Skinner JD (1986) *Phytochemistry* **25**: 39-44
25. Olah Z, Kiss Z (1986) *FEBS Lett* **195**: 33-37
26. Zherelova OM (1989) *FEBS Lett* **242**: 330-332
27. Tilly BC, van Paridon PA, Verlaan I, Wirtz KWA, de Laat SW, Moonenaar WH (1987) *Biochem J* **244**: 129-135
28. Vallejo M, Jakson T, Lightman S, Hanley MR (1987) *Nature* **330**: 656-658
29. Henzi V, MacDermott AB (1992) *Neuroscience* **46**: 251-273
30. Drobak BK, Ferguson IB (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **130**: 1241-1246
31. Reddy ASN, Poovaiah BW (1987) *J Biochem* **101**: 569-573
32. Alexandre J, Lassalles JP, Kado RT (1990) *Nature* **343**: 567-569
33. Vance DE (1985) w *Biochemistry of Lipids and Membranes* (red. Vance DE, Vance JE) str. 242-269, Benjaming/Commings Publishing Company, Inc

# Rybonukleaza P — przykład katalitycznej aktywności RNA

## Ribonuclease P — an example of catalytical RNA activity

JOANNA SADOWSKA<sup>1</sup>

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. RNaza P — funkcja, budowa, występowanie
- III. Rozpoznawanie substratu
- IV. Mechanizm cięcia
- V. Rola białka
- VI. Struktura i funkcja RNA
- VII. Różnice międzygatunkowe
- VIII. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. RNaza P — Function, Structure and Localisation
- III. Substrate Recognition
- IV. Mechanism of Cleavage
- V. The Role of Protein Subunit
- VI. Structure — Function Relationships in RNase P RNA
- VII. Differences among Species
- VIII. Conclusions

### I. Wstęp

Ukazanie się w 1972 roku artykułu [1] opisującego rybonukleazę P (RNazę P), enzym uczestniczący

<sup>1</sup> mgr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, 02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36.



w procesie dojrzewania tRNA, nie zapowiadało lawiny zmian w enzymologii, którą wywołały późniejsze badania nad cząsteczką tego enzymu. Trudno też było przewidzieć, że jeden z autorów tej publikacji — Sidney Altman — zostanie za 17 lat uhonorowany nagrodą Nobla.

Prace nad tym enzymem spowodowały znaczne rozszerzenie pola badań biochemicznych, ukazały bowiem nowe aspekty wewnątrzkomórkowych procesów oraz nowe role cząsteczek w nich uczestniczących. Dzięki nim zostało przełamane dotychczasowe myślenie o enzymie wyłącznie jako o białku. Ta zmiana sposobu myślenia była w pewnym stopniu ułatwiona wcześniejszym odkryciem, dokonanym przez Cech a w 1981 roku [2], dotyczącym samowycinających się intronów [3, 4, 5, 6, 7], lecz i tak nie przysłała ona łatwo.

## II. RNaza P — funkcja, struktura, występowanie

RNaza P uczestniczy w dojrzewaniu tRNA, tnąc odpowiednio pre-tRNA, w wyniku czego powstaje 5' koniec cząsteczki [8, 9]. W skład tego enzymu np. u *E. coli* wchodzi niewielka część białkowa (13,8 kDa) [10] oraz cząsteczka RNA o długości 377 nukleotydów [11]. Enzym wymaga jonów  $Mg^{2+}$ , które mogą być zastąpione jedynie przez jony  $Mn^{2+}$  ale wtedy aktywność enzymu jest niższa [12].

W środowisku o niskiej sile jonowej (100 mM  $NH_4Cl$  i 10 mM  $Mg^{2+}$ ) obie składowe enzymu są niezbędne dla jego aktywności. Stwierdzono, że zarówno działanie proteaz jak i nukleaz znosi aktywność enzymu [13]. W obecności 7M mocznika następuje dysocjacja obu składników enzymu [14]. Usunięcie mocznika w wyniku dializy powoduje przywrócenie natywnej formy i aktywności enzymu. Początkowo sądzono, że RNA enzymu odpowiada za rozpoznanie substratu, a część białkowa za właściwości katalityczne. Jednak badania Guerrier-Takady opublikowane w 1983 roku [13] wykazały, że w środowisku o wysokiej sile jonowej (100 mM  $NH_4Cl$  i 100 mM  $Mg^{2+}$ ) już sama cząsteczka RNA ma właściwości katalityczne.

Sklonowano gen kodujący RNA rybonukleazy P, uzyskano w procesie transkrypcji *in vitro* czysty RNA i wykazano, że za reakcję cięcia substratu odpowiada kwas nukleinowy, a nie np. niewielkie pozostałości białkowej komponenty enzymu nie usunięte w trakcie izolowania RNA [15]. Prace prowadzone nad określeniem optymalnych warunków działania enzymu wykazały, że holoenzym z *E. coli* wykazuje maksymalną aktywność w obecności 10 mM  $Mg^{2+}$  i 100 mM  $NH_4Cl$ , a z *B. subtilis* w obecności 60-90 mM  $Mg^{2+}$  i 100-200 mM  $NH_4Cl$ . Sam RNA enzymu z *E. coli* wykazuje maksymalną aktywność przy 100 mM  $Mg^{2+}$  i 100 mM  $NH_4Cl$ , natomiast RNA enzymu *B. subtilis* w środowisku zawierającym 250-400 mM  $Mg^{2+}$  i 1,2-2 M  $NH_4Cl$  [16, 17]. Optimum pH dla aktywności RNA z rybonukleazy P jest bardzo szerokie, i mieści się

w granicach 5,5-9,0, a poza tym obszarem aktywność ta gwałtownie spada [16]. Badając właściwości katalityczne RNA rybonukleazy P stwierdzono, że kwas ten spełnia podstawowe warunki wymagane w enzymologii dla określenia cząsteczki jako enzymu, a więc niewielka jego ilość działa na znaczny nadmiar substratu, jest odpowiedzialny za przeprowadzenie reakcji, i po reakcji uwalnia się w niezmienionej formie oraz wykazuje stałą liczbę obrotów.

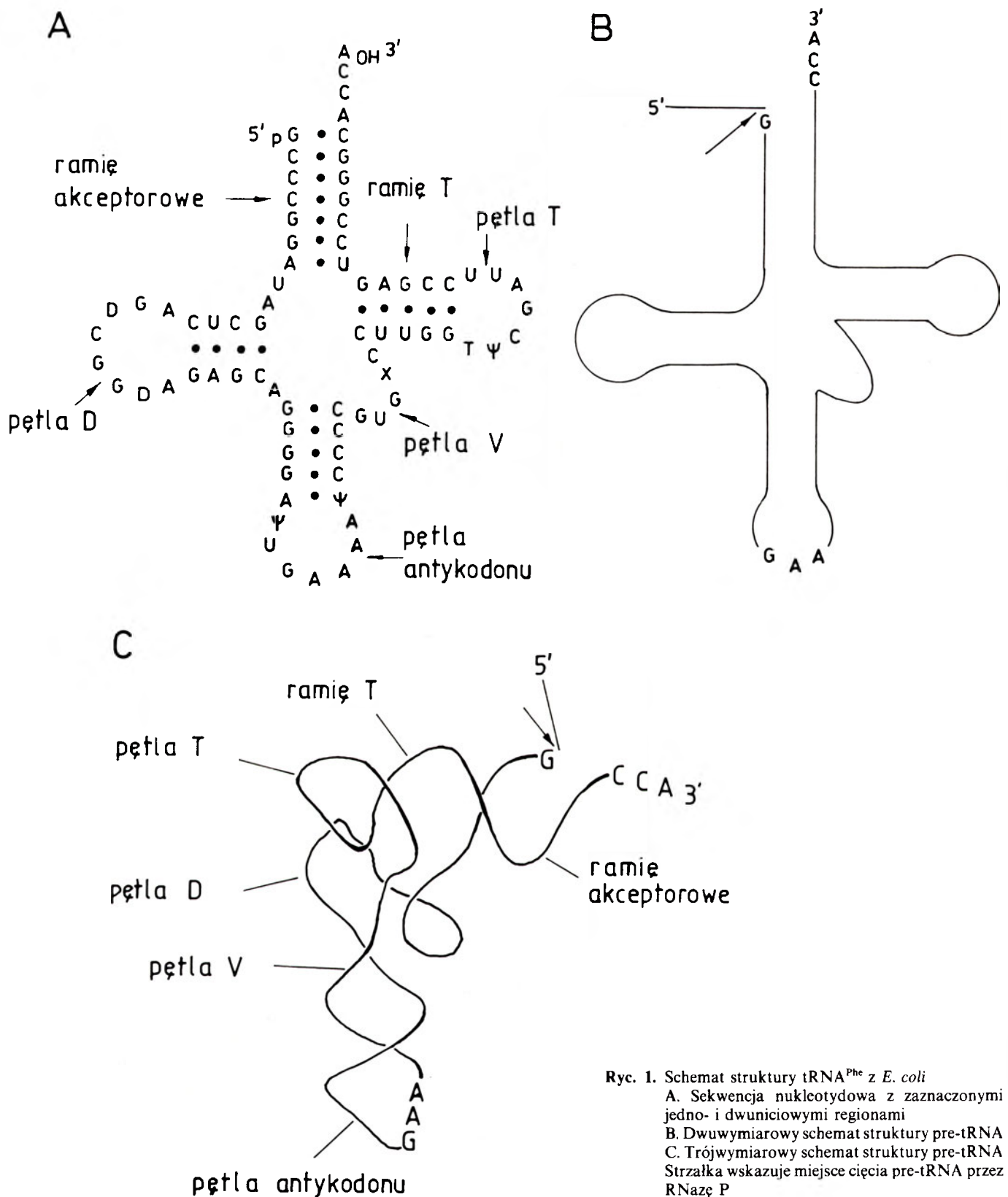
Badania kinetyczne reakcji katalizowanej przez RNA wykazały, że stała Michaelisa ( $K_M$ ) jest taka sama przy reakcji samego RNA jak i holoenzymu, co wskazuje, że RNA jest odpowiedzialny za rozpoznanie substratu i cięcie, a białko odpowiada za zwiększoną szybkość reakcji czyli działa jako kofaktor [13].

Jak dotąd u wszystkich badanych organizmów stwierdzono występowanie RNazy P [18]. Występuje ona zarówno u archebakterii [19, 20], eubakterii [10, 21, 22], jak i eukariontów [23, 24]. U organizmów eukariotycznych RNaza P występuje w jądrze komórkowym, w mitochondriach [25, 26] i w chloroplastach [27]. Obydwie komponenty jądrowej RNazy P kodowane są przez geny jądrowe [13], natomiast mitochondrialna RNaza P składa się z RNA kodowanego przez genom mitochondrialny [28, 29], a białko kodowane jest w jądrze [25]. Znacznie mniej wiadomo o chloroplastowej RNazie P. Jak dotąd była ona badana jedynie fragmentarycznie i struktura tego enzymu jest ciągle nieznaną [27, 30].

## III. Rozpoznawanie substratu

RNaza P rozpoznaje i wprowadza cięcie w ponad 60 różnych pre-tRNA [31]. Nasuwa się zatem pytanie, jakie cechy tych cząsteczek są wspólne i które z nich rozpoznaje enzym. Ponieważ sekwencje usuwane z pre-tRNA są bardzo różne w różnych cząsteczkach, główne cechy decydujące o rozpoznaniu substratu muszą być zlokalizowane w dojrzałej cząsteczce [32]. Świadczy o tym również to, że dojrzały tRNA jest kompetywnym inhibitorem RNazy P jak i samego RNA tego enzymu [33]. Stwierdzono, że jeżeli RNA z rybonukleazy P zostanie umieszczony w roztworze z dojrzałym tRNA, a następnie doda się pre-tRNA to tempo reakcji będzie niskie [34]. Wskazuje to na powinowactwo RNA do dojrzałej cząsteczki tRNA.

Pierwotnie wysunięto przypuszczenie, że RNaza P rozpoznaje wspólną dla wielu tRNA sekwencję GTΨCR występującą w T pętli [13, 15]. Stosując technikę rekombinacji DNA wyizolowano gen kodujący RNA z RNazy P u *E. coli*. Poznanie sekwencji tego genu pozwoliło na stwierdzenie występowania w nim dwóch regionów komplementarnych do określonej, wspólnej dla różnych tRNA sekwencji. Zmieniając lub usuwając nukleotydy w tych obszarach wykazano, że nie są one odpowiedzialne za rozpoznawanie substratu [35, 36]. Potwierdza to również wzrastająca liczba poznawanych, eukariotycznych tRNA, które nie za-



Ryc. 1. Schemat struktury tRNA<sup>Phe</sup> z *E. coli*  
 A. Sekwencja nukleotydowa z zaznaczonymi jedno- i dwuniciowymi regionami  
 B. Dwuwymiarowy schemat struktury pre-tRNA  
 C. Trójwymiarowy schemat struktury pre-tRNA  
 Strzałka wskazuje miejsce cięcia pre-tRNA przez RNazę P

wierają tej niezmienniej sekwencji.

Wprowadzenie mutacji dotyczących pojedynczych nukleotydów zaangażowanych w utrzymanie struktury drugo- i trzecio-rzędowej substratu znacznie zmniejsza tempo reakcji [32]. Aby stwierdzić, które cechy budowy przestrzennej tRNA są rozpoznawane przez RNazę P skonstruowano wiele substratów o odmiennej budowie [38]. Wiadomo było, że RNaza P z *E. coli* jest w stanie przeprowadzić reakcję cięcia

pewnych nietypowych mitochondrialnych pre-tRNA. Nie mają one ramienia i pętli D, mają one natomiast normalne ramię akceptorowe i ramię T z pętlą [39]. Na bazie genu kodującego supresorowe tRNA<sup>Phe</sup> *E. coli* skonstruowano RNA tak zmienione, że przypominało ono długością i strukturą przestrzenną bydlęcy mitochondrialny tRNA<sup>Ser</sup> [38]. Nukleotydy z ramienia i pętli D były usunięte, a podstawiono sekwencje charakterystyczne dla mitochondrialnego tRNA<sup>Ser</sup>.







teczką, EGS nie jest związana z RNA RNazy P. Normalnie jest ona integralną częścią substratu, lecz umożliwia cięcie RNazy P również gdy nie jest kowalencyjnie związana z substratem.

Używając pochodnych minimalnego substratu, w których usunięto sekwencję EGS, stwierdzono, że cząsteczki te nie są cięte przez RNazę P ani przez jej RNA. Gdy dodano 20-to lub 29-cio nukleotydowe RNA zawierające EGS, cząsteczki te były wydajnie i specyficznie cięte zarówno przez RNazę P jak i jej RNA.

Skonstruowano także 17-to nukleotydowy odcinek RNA, którego sekwencja była tak dobrana, że w jego skład wchodziła 3' końcowa sekwencja substratu łącznie z EGS [45]. 5' końcowe nukleotydy były komplementarne do nukleotydów wchodzących w skład EGS. Tak skonstruowany odcinek RNA był zdolny tworzyć w roztworze określoną strukturę przestrzenną. Substrat ten był również wydajnie cięty przez RNazę P, ale słabo przez samo RNA. Badania nad skonstruowanym 17-to nukleotydowym odcinkiem RNA wskazują, że niewielka część pre-tRNA jest wystarczająca do wydajnego cięcia tzn. obecność aminocyelowanego ramienia akceptorowego i 3' końcowych sekwencji umożliwia reakcję.

Niska wydajność cięcia 17-to nukleotydowego RNA przez sam RNA RNazy P wydaje się być spowodowana występowaniem sekwencji CCA na złączu jedno- i dwu-niciowych odcinków, gdy normalnie lokuje się ona w części jednoniciowej.

Chociaż badany 17-to nukleotydowy odcinek RNA zawiera tę samą 8-mio nukleotydową sekwencję z 3' końca co 20-to i 29-cio nukleotydowe odcinki (w skład których wchodzi sekwencja EGS) to w jego obecności pochodne minimalnego substratu, nie zawierające EGS nie były cięte ani przez RNazę P ani jej RNA. Wskazuje to na udział w reakcji nie tylko 8-mio nukleotydowej sekwencji lecz również innych nukleotydów leżących poza tą sekwencją. Pochodne minimalnego substratu, które nie posiadają końcowych 3' nukleotydów, nie są cięte. Tak więc, nukleotydy te są niezbędne w reakcji.

Podkreślona na rycinie sekwencja GUUC występująca w pętli i charakterystyczna dla wszystkich pre-tRNA nie jest konieczna do przeprowadzenia cięcia.

Forster i Altman uważają [45], że w zasadzie każdy RNA może być cięty przez RNazę P w obecności odpowiedniego EGS. Być może organizm mógłby w ten sposób walczyć ze szkodliwymi dla niego cząsteczkami RNA np. wirusowymi.

#### IV. Mechanizm cięcia

W wyniku cięcia RNA przez RNazę P powstają dwie cząsteczki: jedna zakończona grupą fosforanową na 5' końcu, a druga z grupą hydroksylową na 3' końcu. Nie poznano, jak dotąd, szczegółów przebiegu reakcji.

Zakłada się, że wymaga ona usunięcia protonu z cząsteczki wody w trakcie nukleofilowego ataku i przyłączenia protonu do tlenu w pozycji 3' co prowadzi do przecięcia wiązania fosfodwuestrowego [34].

Grupa 2'-OH przylegająca bezpośrednio do miejsca cięcia pozostaje po reakcji niezmienną [49]. Przypuszcza się, że pośrednio bierze ona udział w reakcji ponieważ stwierdzono, że cząsteczki tRNA z przyłączoną grupą 2'-H zamiast grupy 2'-OH do 5' końca są cięte specyficznie w miejscu połączenia RNA i DNA, ale szybkość reakcji jest 45 razy niższa [45]. Uważa się, że grupa 2'-OH może stabilizować grupę 3'-O<sup>-</sup> lub wiązać się z cząsteczką wody, z Mg<sup>2+</sup> lub z grupami występującymi w centrum aktywnym enzymu.

Niektóre doniesienia sugerują możliwość łączenia się dwóch cząsteczek RNA, które dopiero w tej formie tworzą aktywny kompleks [35].

#### V. Rola białka

Sam RNA z rybonukleazy P jest zdolny do przeprowadzenia cięcia w cząsteczce pre-tRNA przy odpowiedniej sile jonowej środowiska reakcji. Jednak obecność części białkowej znacznie zwiększa szybkość reakcji. Jak stwierdzono, mutacja w genie kodującym część białkową, powodująca termowrażliwość jest przyczyną gromadzenia pre-tRNA w temperaturze niepermycyjnej, a w temperaturze permycyjnej komórki wykazują niewielką akumulację pewnych pre-tRNA i obniżone możliwości syntezy określonych dojrzałych tRNA [50]. Wskazuje to na ważną rolę komponenty białkowej. Sklonowanie genu kodującego białko [51, 52] pozwoliło na otrzymanie szczepów bakteryjnych produkujących znaczne ilości tego białka, a tym samym ułatwiło jego badanie.

Białko rybonukleazy P z *E. coli* składa się z 119 aminokwasów, i ma ciężar cząsteczkowy 13,8 kDa [13]. Masa cząsteczkowa tego białka w porównaniu z masą RNA jest niewielka. Uważa się, że białko oddziałuje z RNA głównie w miejscu wiązania substratu [33].

Wysoka siła jonowa, podobnie jak obecność białka, umożliwia aktywność RNA. Ponieważ RNA niesie znaczący ujemny ładunek wydaje się więc, że oddziaływanie między kwasem nukleinowym a kationami środowiska reakcji polegają na osłabianiu sił odpychających zarówno wewnątrz samego RNA jak i między RNA a substratem. Umożliwianie wiązania substratu przez kationy potwierdzają dane kinetyczne wskazujące na zmniejszanie stałej Michaelisa gdy wzrasta siła jonowa środowiska reakcji [33]. Jednak badania mające na celu ustalenie wymagań jonowych dla aktywności RNazy P nie są całkowicie zgodne z tym założeniem. Gdyby jedyną rolą jonów dodatnich była osłona przed siłami odpychającymi to kationy o małym promieniu byłyby bardziej efektywne w niskich stężeniach niż kationy większe dzięki możliwości ściślejszego przylegania do kwasów nukleinowych.

Jednak okazało się, że jest inaczej. Wskazuje to na istnienie dodatkowej, nie ustalonej dotąd roli tych jonów [17]. Wydaje się, że funkcja białka jest podobna do roli kationów. Z całą pewnością białko wpływa na powinowactwo enzymu do substratu. Jak stwierdzono jedynym jak dotąd poznanym substratem ciętym *in vivo*, nie będącym tRNA, jest 4, 5 S RNA z *E. coli* [54]. Częsteczka ta jest cięta tylko przez holoenzym. Nie ulega ona reakcji przy udziale samego RNA mimo stosowania środowiska o różnych siłach jonowych [13].

Z kolejnych obserwacji wynika, że ta sama mutacja w genie kodującym białko wpływa odmiennie na tempo dojrzewania różnych tRNA [50]. Tak więc holoenzym oddziałuje różnie z cząsteczkami pre-tRNA i niekoniecznie tnie każdą z nich z tą samą szybkością.

Stwierdzony zasadowy charakter białka, wpływa z pewnością na powinowactwo wobec kwasów nukleinowych. Badania nad wybiórczym wiązaniem RNA przez białko wykazały, że białko to nie jest selektywne wobec pre-tRNA czy tRNA. Białko enzymu wiąże z taką samą siłą 5S RNA jak i tRNA. W środowisku zawierającym 0,4M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  komponenta białkowa wiąże specyficznie katalityczny RNA [56], a w środowisku o niższej sile jonowej traci tę specyficzność i wiąże różne cząsteczki RNA z równą siłą [57].

Pełne ustalenie roli białka w reakcji wymaga jednak dalszych badań.

## VI. Struktura i funkcja RNA

Jak wspomniano wyżej wykluczenie założenia o rozpoznawaniu substratu przez RNazę P w wyniku oddziaływań pomiędzy komplementarnymi odcinkami RNA enzymu i pre-tRNA, spowodowało zwrócenie uwagi na powiązanie struktury przestrzennej RNA rybonukleazy P z jego funkcją. Tym bardziej, że wiadomo było iż zliofilizowany preparat RNA RNazy P, po rozpuszczeniu, wymaga do osiągnięcia aktywności uprzedniej denaturacji, a następnie powolnej renaturacji [58]. Korzystając z wcześniej ustalonych sekwencji RNA rybonukleazy P z *E. coli* [13, 59] oraz z *B. subtilis* [21] próbowano ustalić ich strukturę przestrzenną używając programów komputerowych przewidujących, na podstawie istniejących założeń termodynamicznych, miejsca występowania odcinków dwuniciowych. Okazało się jednak, że ustalona komputerowo struktura nie odpowiada w pełni danym, uzyskanym przy użyciu sond chemicznych i enzymatycznych. Najlepszym sposobem ustalenia konformacji RNA z RNazy P było porównanie wszystkich danych dla różnych organizmów spokrewnionych ewolucyjnie i ustalenie miejsc o wysokiej homologii.

Celem wielu badań stało się więc określenie które elementy struktury są odpowiedzialne za wiązanie substratu, przeprowadzanie reakcji oraz oddziaływania z białkową częścią enzymu. Korzystając ze sklon-

wanych genów kodujących RNA RNazy P różnych organizmów wprowadzono punktowe mutacje w RNA i badano ich wpływ na funkcję tej cząsteczki. Okazało się, że nukleotydy których mutacja powoduje zmianę stałej Michaelisa i/lub liczby obrotów rozmieszczone są wzdłuż całej cząsteczki. Żaden z tych nukleotydów nie był absolutnie konieczny do funkcjonowania RNA [60].

Badano również wpływ delekcji różnych regionów RNA w celu ustalenia za jaką funkcję regiony te są odpowiedzialne. Okazało się, że RNA rybonukleazy P z *E. coli* z delecją 120 nukleotydów z 3' końca zachowuje jedynie 1-2% wyjściowej aktywności [35]. Usunięcie 25 nukleotydów z 5' końca pozostawiało 30% aktywności. Natomiast usunięcie równocześnie kilku nukleotydów z obu końców całkowicie znosiło aktywność enzymatyczną RNA. Tak więc można było przyjąć, że aktywność RNA zależy od obecności odpowiednich nukleotydów na przynajmniej jednym końcu RNA. Prowadzono również badania, w których łączono oba końce stosując ligazę. Tak otrzymana kolistą cząsteczka RNA była enzymatycznie aktywna. W trakcie przechowywania następowały samorzutne, przypadkowe pęknięcia cząsteczki w okolicy jej końców. Powstałe liniowe cząsteczki o zmienionych końcach były aktywne [61]. Również łagodne trawienie RNA RNazą  $T_1$  nie powoduje zaniku aktywności katalitycznej badanego RNA [61].

Dane te sugerują, że utrzymanie aktywności katalitycznej mimo występowania różnych cięć w cząsteczce jest spowodowane jej wysokim stopniem strukturalnej integralności. Z tymi danymi zgodne są doniesienia o utrzymaniu aktywności mitochondrialnej RNazy P z drożdży pomimo rozpadu cząsteczki RNA na kilka części w trakcie izolowania enzymu [62].

Bardzo pomocne przy badaniu funkcji określonych regionów RNA okazały się termowrażliwe mutanty *E. coli*. Jeden z nich ts709 różni się dwoma nukleotydami: zamiast guaniny w pozycji 89 i 365 występuje adenina [59]. Stwierdzono, że substytucja w pozycji 89 zmienia parę G-C w A i C co powoduje prawdopodobnie destabilizację helisy. Fenotypowo zmutowany RNA posiada normalną aktywność katalityczną, ale nie jest w stanie wiązać się z białkiem. Jest to cząsteczka termolabilna, znacznie łatwiej ulegająca degradacji pod wpływem komórkowych nukleaz niż niezmutowany RNA [59, 63]. Wskazuje to na różnice konformacyjne tych cząsteczek. Tak znaczny wpływ mutacji w pozycji 89 sugeruje jej lokalizację w miejscu wiązania białka lub w niewielkiej odległości od tego miejsca.

Badając strukturę przestrzenną mutantu ts709 stwierdzono znaczne różnice konformacyjne w obszarze od 89 do 239 nukleotydu. Stąd wniosek, że obszar ten odpowiada za wiązanie białka, zaś funkcja katalityczna jest zlokalizowana w pozostałej części cząsteczki [64].

Porównanie sekwencji RNA rybonukleazy P *E. coli* i *B. subtilis* wykazało istnienie takich samych



sekwencji w obszarach 89-93, 124-133 i 225-238 [21]. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że białko *E. coli* jest w stanie wiązać się z RNA *B. subtilis* tworząc aktywny kompleks [13]. Istnienie wspólnych sekwencji w obszarze o przewidywanej funkcji wiązania białka potwierdza to założenie.

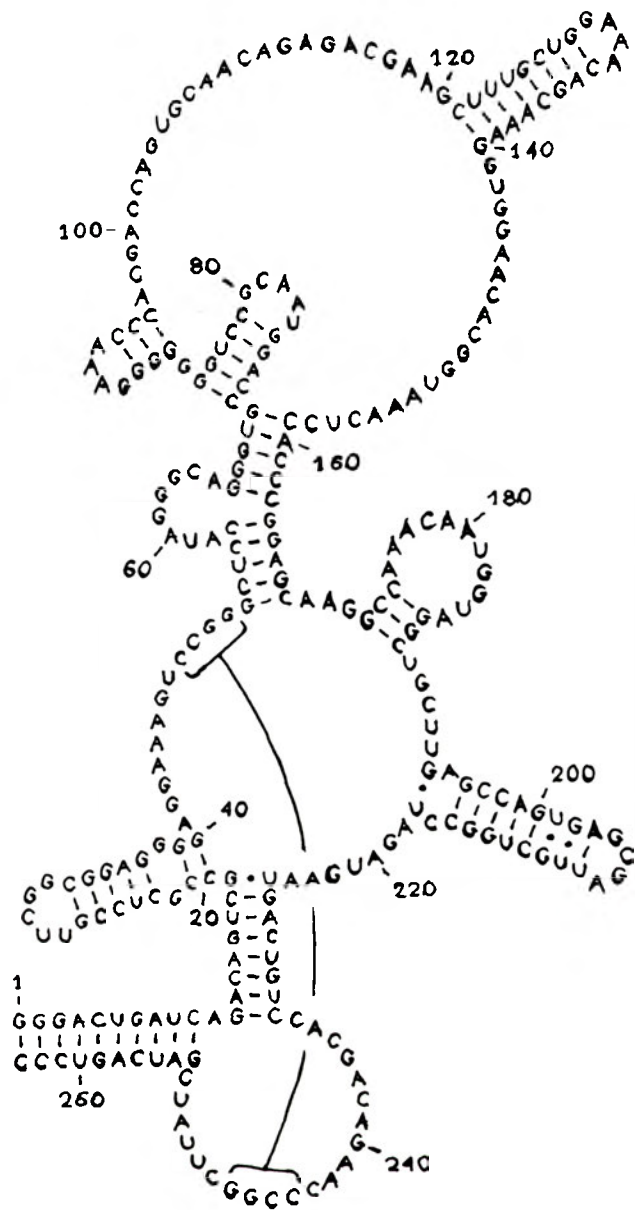
Inny mutant termowrażliwy ts2418 posiada pojedynczą substytucję G → A w pozycji 329. Wiąże on normalnie białko, natomiast charakteryzuje się zredukowaną  $V_{max}$  reakcji wynoszącą 1/400  $V_{max}$  normalnego RNA jak i RNA mutantu ts709. Chociaż  $K_M$  dla tych trzech typów RNA jest taka sama [63]. Na podstawie tych wyników uważa się, że RNA RNazy P składa się z dwóch oddzielnych domen, z których jedna odpowiada za wiązanie białka, a druga za katalizę.

Do określania centrum aktywnego enzymu zastosowano metodę wykorzystującą grupę (p-azydofenacylową), która pod wpływem promieni UV wiąże się z RNA. Grupę tę przyłączono do substratu w miejscu działania RNazy P. Podczas reakcji RNA RNazy P z tym substratem, przy jednoczesnym naświetlaniu promieniami UV, następowało związanie tej grupy z katalitycznym RNA. Otrzymane cząsteczki RNA były nieaktywne, zgodnie z założeniem, że ich centrum aktywne zostało zablokowane. Miejsca łączenia czynnika: A248-A249 i A330-A333 znajdowały się w obszarach wcześniej określonych jako zawierające odcinki odpowiedzialne za katalizę [65].

Homologia sekwencji nukleotydowej RNA rybonukleazy P *E. coli* i *B. subtilis* jest niska i wynosi 43% [21]. Wychodząc z założenia, że cechy niezbędne do aktywności enzymu są zachowywane ewolucyjnie, określono wspólne dla obu organizmów struktury tzw. rdzeń.

Korzystając z technik rekombinacji DNA *in vitro* usunięto z genu kodującego RNA rybonukleazy P *E. coli* odcinki uznane za specyficzne, a wstawiono regiony pochodzące z *B. megaterium* w tych miejscach, gdzie były one niezbędne do stabilizacji całej cząsteczki. W ten sposób powstała modelowa cząsteczka RNA tzw. min 1 RNA [66], składająca się z 263 nukleotydów (2/3 RNA *E. coli*). Cząsteczka ta była aktywna i wykazywała identyczną specyficzność jak RNaza P. Jej stała Michaelisa była o dwa rzędy wielkości wyższa niż dla natywnego RNA co świadczyło o zmniejszonym powinowactwie do substratu. Liczba obrotów przy optymalnej sile jonowej była 20 razy wyższa niż dla normalnego RNA i była podobna do wartości uzyskanej dla normalnego holoenzymu. Być może jest to związane z szybszym uwalnianiem produktu przez min 1 RNA. Tym bardziej, że jego powinowactwo do pre-tRNA było niższe. Wymagania jonowe dla aktywności min 1 RNA są nieco zmienione. Maksymalna aktywność osiągana była w wyższych stężeniach jonów jednowartościowych (ale nie dwuwartościowych).

Większa wrażliwość cząsteczki na temperaturę wskazuje na osłabienie sił wewnątrzkomórkowych



Ryc. 4. Struktura i sekwencja min 1 RNA. Linia połączono sekwencje, które tworzą odcinki dwuniciowe określane mianem pseudowęzłów

utrzymujących jej strukturę. Być może dlatego też do uzyskania pełnej aktywności wymaga ona wyższych stężeń jonów jednowartościowych, które mogą osłabiać odpychające siły elektostatyczne, utrudniające przyjęcie przez cząsteczkę aktywnej konformacji.

Wydaje się, że usunięte struktury, charakterystyczne dla typu, pozwalają na lepszą stabilizację aktywnej formy RNA.

Dodanie białka do min 1 RNA nie powoduje podwyższenia aktywności w warunkach fizjologicznych sił jonowych. Być może warunki, w których cząsteczka jest aktywna nie są odpowiednie dla funkcjonowania holoenzymu, a konformacja min 1 RNA w warunkach niskiej siły jonowej uniemożliwia jego związanie z białkiem.

Wydatność min 1 RNA bliska uzyskanej dla zmienionego RNA wskazuje na zbędność struktur specyficznych dla typu w reakcji. Prowadzone są prace nad uzyskaniem nowej, jeszcze mniejszej, aktywnej cząsteczki [66].

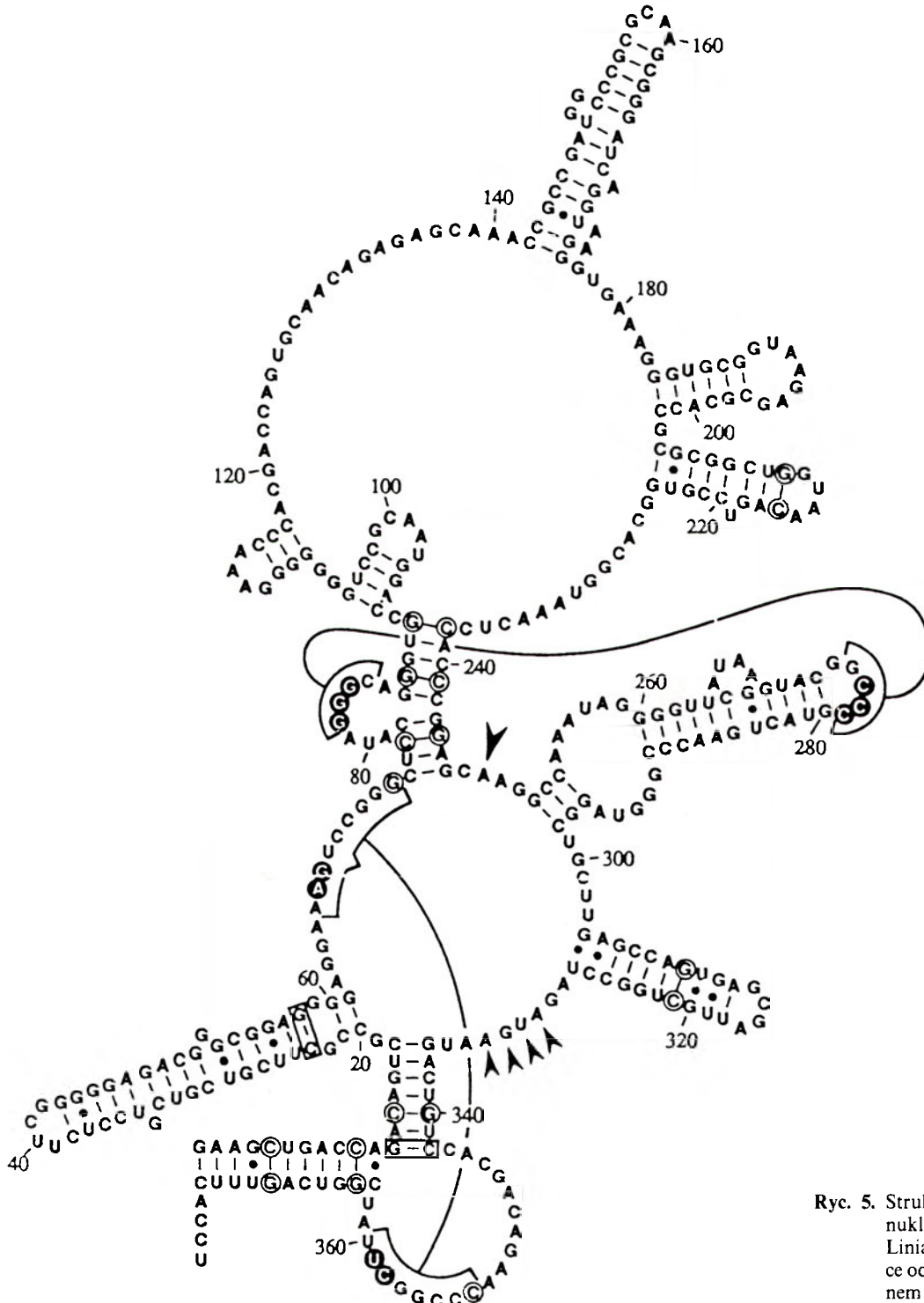
Z ostatnich doniesień wynika [67], że tylko fragmenty RNA zawierające 5' i 3' końcowe odcinki RNA, związane z częścią białkową, wystarczają do przeprowadzenia reakcji *in vitro*. Opracowano uniwersalny model struktury RNA dla prokariotów i eukariotów, w którym określone sekwencje zlokalizowane w pobliżu obu końców mają podstawowe znaczenie, dla przebiegu reakcji. Natomiast rozmiar i sekwencja wewnętrznego regionu RNA są zmienne i mniej istotne [68]. Ten nowy model nawiązuje do rybonukleazy MRP (*mitochondrial RNA processing enzymes*) — enzymów tnących mitochondrialny prekursor startowego (primer) RNA, i ukazuje podobieństwa struktury RNA zawartego w tych cząsteczkach i w RNazie P.

Obie te cząsteczki reagują z tymi samymi przeciwciałami [69]. Istnieje duże prawdopodobieństwo ich wspólnej ewolucji i funkcji.

## VII. Różnice międzygatunkowe

Obecność RNazy P stwierdzono w organizmach trzech głównych typów filogenetycznych: archebakterii, eubakterii i eukariotów. Eubakteryjne i eukariotyczne RNazy P zawierają RNA, różniące się znacznie zarówno sekwencją jak i strukturą.

Scharakteryzowano RNazy P z dwóch gatunków archebakterii *Haloferax volcanii* [56] oraz z *Sulfolobus solfataricus* [19]. Enzym pierwszego organizmu był wrażliwy na nukleazy, struktura jego RNA przypomina



Ryc. 5. Struktura i sekwencja RNA z rybonukleazy P *E. coli*. Liniami połączono sekwencje tworzące odcinki dwuniciowe określane mianem pseudowęzłów

nała strukturę charakterystyczną dla eubakterii. Samo RNA nie wykazywało aktywności w żadnym z przebadanych środowisk. Jednakże gdy dodano do środowiska białko rybonukleazy P z *B. subtilis* i umieszczono w warunkach optymalnych dla holoenzymu tego organizmu to uzyskano 10% aktywności enzymu [21].

Badając RNazę P z *S. solfataricus* stwierdzono, że jest ona niewrażliwa na nukleazy, chociaż w trakcie jej oczyszczania stwierdzono obecność różnych RNA o długości od 200 do 400 nukleotydów. Jedno z nich pozostawało nierozłożone po trawieniu nukleazą. Wyniki wirowania w gradiencie  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ , wskazują na znaczną przewagę białka nad RNA. Ponieważ, nie wydzielono RNA z tego enzymu nie można, jak narazie, określić jego struktury.

Uważa się, że niewrażliwość enzymu na nukleazy jest wynikiem ochronnego działania białka. Być może środowisko życia tego organizmu (optymalna temperatura reakcji dla RNazy P wynosi  $77^\circ\text{C}$ ) [19] wymaga takiej struktury białka, która otacza szczelnie RNA, chroniąc go przed działaniem nukleaz.

Z tych danych wynika, że archebakterie nie mają jednego, charakterystycznego dla siebie typu RNazy P.

Występowanie RNazy P stwierdzono także w mitochondriach i chloroplastach. Mitochondrialna RNaza P drożdży posiada względną gęstość 1,28 g/ml w gradiencie  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  [62].

RNaza P z chloroplastów szpinaku wykazuje niską względną gęstość wynoszącą 1,28 g/ml i jest niewrażliwa na działanie nukleaz. Jej specyficzność wobec substratów jest taka jak innych RNaz P. W celu ustalenia czy nie zawiera ona RNA czy też posiada być może jak RNaza P u *S. solfataricus* kwas nukleinowy chroniony przez białko konieczne są dalsze badania. Tym bardziej że, wcześniejsza praca Yamaguchi i współautorów [31] donosi o istnieniu RNazy P w chloroplastach szpinaku i tytoniu wrażliwej na działanie nukleaz.

Przedstawione dane wskazują, że przebadane RNazy P różnią się znacznie między sobą zarówno gęstością względną (od 1,27 g/ml u *S. solfataricus* do 1,55 g/ml u *E. coli*), stałą sedymentacji (od 11,5S u *E. coli* do 15S dla komórek HeLa) jak również wymaganiami jonowymi, proporcją zawartości białka i kwasu nukleinowego w cząsteczce oraz sekwencją i strukturą samego RNA.

Dotychczasowe badania wskazują że, wszystkie poznane dotąd rybonukleazy P pełnią taką samą funkcję w komórce i wykazują identyczną specyficzność substratową. Wspólną cechą wszystkich przebadanych RNA tych enzymów jest występowanie tzw. pseudowęzłów (pseudoknots) [68, 70]. Struktura ta wiąże ze sobą odległe w cząsteczce, stałe ewolucyjnie sekwencje znalezione we wszystkich enzymach przebadanych organizmów.

Czy to właśnie ta struktura jest odpowiedzialna za utrzymanie tej samej funkcji mimo znacznych różnic w budowie i właściwościach fizycznych enzymów? Pytanie to pozostaje otwarte.

## VIII. Podsumowanie

Jak wiadomo RNaza P jest białkiem złożonym. Powstaje pytanie, dlaczego w odróżnieniu od innych enzymów o jej podstawowej aktywności decyduje RNA a nie jedynie białko. Dla aktywności samowycinających się intronów, wyjaśnienie katalitycznej aktywności RNA wydaje się proste — obecność samego RNA umożliwia reakcję, organizm więc nie potrzebuje wydatkować energii na tworzenie dodatkowych enzymów białkowych. W przypadku RNazy P *in vivo* konieczne są zarówno białko jak i RNA. Wydaje się, że RNA jest bardziej mobilną cząsteczką niż białko, co umożliwia rozpoznawanie i katalizę znacznej liczby substratów. Tym samym jeden enzym „obsługuje” wszystkie dostępne dla niego typy pre-tRNA. Samo białko być może nie mogłoby mieć wysokiej specyficzności do miejsca cięcia dla tylu różnych substratów.

Istnieje sugestia, że katalityczna funkcja RNA może być pozostałością z czasów gdy u pierwotnych organizmów nie był w pełni wykształcony aparat syntezy białka, choć teorię o pierwotnym pochodzeniu RNazy P trudno pogodzić ze znaczną różnorodnością sekwencji i struktury jej RNA.

W 1988 roku Nomura i Ishihama odkryli nową aktywność RNazy P. Stwierdzili oni że, uczestniczy ona w dojrzewaniu 3' końca supresorowego pre-tRNA *E. coli* [71].

Być może nie jest to ostatnie słowo badaczy na temat tego enzymu.

Artykuł otrzymano 5 maja 1992 r.

Zaakceptowano do druku 16 czerwca 1992 r.

## Piśmiennictwo

1. Robertson HD, Altman S, Smith JD (1972), *J Biol Chem* **247**: 5243
2. Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ (1981) *Cell* **27**: 487
3. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR (1982) *Cell* **31**: 147
4. Cech TR, Bass BL (1986) *Annu Rev Biochem* **55**: 599
5. Zaug AJ, Cech TR (1986) *Science* **231**: 470
6. Cech TR (1987) *Science* **236**: 1532
7. Cech TR (1988) *Gene* **73**: 259
8. Altman S, Bowman EJ, Garber RL, Kole R, Koski RA, Stark BC (1980) w *Transfer RNA: Biological Aspects*, (red) Soll D, Abelson JN, Schimmel PR, str 71-82 Cold Spring Harbor Lab Cold Spring Harbor NY
9. Guthrie C, Atchison R (1980) w *Transfer RNA: Biological Aspects*, (red) Soll D, Abelson JN, Schimmel PR str 83-97 Cold Spring Harbor Lab Cold Spring Harbor NY
10. Reed RE, Baer MF, Guerrier-Takada C, Donis-Keller H, Altman S (1982) *Cell* **30**: 627
11. Hansen FG, Hansen EB, Atlung T (1985) *Gene* **38**: 85
12. Stark BC, Kole R, Bowman EJ, Altman S (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 3717
13. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S (1983) *Cell* **35**: 849



14. Kole R, Altman S (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3795
15. Guerrier-Takada C, Altman S (1984) *Science* 223: 285
16. Guerrier-Takada C, Haydock K, Allen L, Altman S (1986) *Biochemistry* 25: 1509
17. Gardiner KJ, Marsch TL, Pace N (1985) *J Biol Chem* 260: 5415
18. Willis I, Frendewey D, Nichols M, Hottinger-Werlen A, Schaack J, Soll D (1986) *J Biol Chem* 261: 5878
19. Darr SC, Pace B, Pace NR (1990) *J Biol Chem* 265: 12927
20. Nieuwlandt DT, Hass ES, Daniels CJ (1991) *J Biol Chem* 266: 5689
21. Reich C, Gardiner KJ, Olsen GJ, Pace B, Marsh TL, Pace NR (1986) *J Biol Chem* 261: 7888
22. Baer M, Altman S (1985) *Science* 228: 999
23. Krupp G, Cherayil B, Frendewey D, Nishikawa S, Soll D (1986) *EMBO J* 5: 1697
24. Bartkiewicz M, Gold H, Altman S (1989) *Genes Develop* 3: 488
25. Hollinesworth MJ, Martin NC (1986) *Mol Cell Biol* 6: 1058
26. Doersen C-J, Guerrier-Takada C, Altman S, Attardi G (1985) *J Biol Chem* 260: 5942
27. Wang MJ, Wise CA, Gegenheimer P (1988) *EMBO J* 7: 1567
28. Miller DL, Martin NC (1983) *Cell* 34: 911
29. Underbrink-Lyon K, Miller DL, Ross NA, Fukuhara H, Martin NC (1983) *Mol Gen Genet* 191: 512
30. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Sugiura M (1987) *FEBS Lett* 215: 132
31. Altman S, Guerrier-Takada C, Franffort HM, Robertson HD (1982) w *Nucleases* (red) Linn SM, Roberts RJ, str 243-274 Cold Spring Harbor Lab Cold Spring Harbor NY
32. Altman S (1978) *Int Rev Biochem* 17: 19
33. Reich CI, Olsen GJ, Pace B, Pace NR (1988) *Science* 239: 178
34. Pace NR, Smith D (1990) *J Biol Chem* 265: 3587
35. Guerrier-Takada C, Altman S (1986) *Cell* 45: 177
36. Baer MF, Reilly RM, McCorkle GM, Hai T-Y, Altman S, RajBhandary UL (1988) *J Biol Chem* 263: 2344
37. McClain WH, Seidman JG (1975) *Nature* 257:106
38. McClain WH, Guerrier-Takada C, Altman S (1987) *Science* 238: 527
39. de Bruijn MHL, Klug A (1983) *Eur J Biochem* 2: 1309
40. McClain WH, Guerrier-Takada C, Altman S niepublikowane dane cyt za McClain WH, Guerrier-Takada C, Altman S (1987) *Science* 238: 527
41. Kahle D, Wehmeyer U, Krupp G (1990) *EMBO J* 9: 1929
42. Guerrier-Takada C, van Belkum A, Pleij C, Altman S (1988) *Cell* 53: 267
43. Mans RWM, Guerrier-Takada C, Altman S, Pleij C (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 3479
44. Carrara G, Calandra P, Fruscoloni P, Doria M, Tocchini-Valentini GP (1989) *Cell* 58: 37
45. Forster AC, Altman S (1990) *Science* 249: 783
46. Michel F, Jacquier A, Dujon B (1982) *Biochimie* 64: 867
47. Davies RW, Waring RB, Ray JA, Brown TA, Scazzocchio C (1982) *Nature* 300: 719
48. Fournier MJ, Ozeki H (1985) *Microbiol Rev* 49: 379
49. Altman S (1989) *Adv Enzymol* 62: 1
50. Schedl P, Primakoff P, Roberts J (1975) *Brookhaven Symp Biol* 26: 53
51. Hansen FG, Hansen EB, Atlung T (1985) *Gene* 38: 85
52. Ogasawara N, Morija S, von Meyenburg K, Hansen FG, Yoshikawa H (1985) *EMBO J* 4: 3345
53. Pace NR, James BD, Reich C, Waugh DS, Olsen GJ, Marsh TL (1987) w *Molecular Biology of RNA* (red) Inouye M, Dudock BS, str 17-36 Academic Press, Inc
54. Garber RL, Bothwell ALM, Altman S (1976) *J Biol Chem* 251: 7709
55. Kirsebom LA, Altman S (1989) *J Mol Biol* 207: 837
56. Lawrence N, Wesolowski D, Gold H, Bartkiewicz M, Guerrier-Takada C, Altman S (1987) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 52: 233-238
57. Vioque A, Arnez J, Altman S (1988) *J Mol Biol* 202: 835
58. Altman S, Guerrier-Takada C (1986) *Biochemistry* 25: 1205
59. Sakamoto K, Kimura N, Nagawa F, Shimura Y (1983) *Nucleic Acids Res* 11: 8237
60. (1987) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 52: cyt za Altman S (1987) *Enzym Relat Areas Mol Biol* 62: 1-36
61. Altman S, Baer M, Gold H, Guerrier-Takada C, Kirsebom L, Lawrence N, Lumelsky N, Vioque A (1987) w *Molecular Biology of RNA* (red) Inouye M, Dudock BS, str 3-16, Academic Press Inc
62. Morales MJ, Wise CA, Hollingsworth MJ, Martin NC (1989) *Nucleic Acids Res* 17: 6865
63. Shiraishi H, Shimura Y (1986) *EMBO J* 5: 3673
64. Shiraishi H, Shimura Y (1988) *Gene* 64: 313
65. Burgin AB, Pace NR (1990) *EMBO J* 9: 4111
66. Waugh DS, Green CJ, Pace NR (1989) *Science* 244: 1569
67. Altman S (1990) *J Biol Chem* 265: 20053
68. Forster AC, Altman S (1990) *Cell* 62: 407
69. Gold HA, Topper JN, Clayton DA, Craft TJ (1989) *Science* 245: 1377
70. Pace NR, Smith DK, Olsen GJ, James BD (1989) *Gene* 82: 65
71. Nomura T, Ishihama A (1988) *EMBO J* 7: 3539

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

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

# Degradacja substancji P — biologiczna aktywność produktów

## Degradation of substance P — biological activity of the products

ZBIGNIEW HRABEC<sup>1\*\*</sup>  
ELŻBIETA HRABEC<sup>2\*</sup>  
JANUSZ GREGER<sup>3\*</sup>  
LILLA LACHOWICZ<sup>4\*\*</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Enzymy uczestniczące w degradacji substancji P
  - II-1. Enzym degradujący substancję P
  - II-2. Enkefalinaza
  - II-3. Peptydaza dipeptydylowa
  - II-4. Enzym przekształcający angiotensynę
  - II-5. Endopeptydaza degradująca substancję P
- III. Biologiczne znaczenie fragmentów substancji P
  - III-1. Działanie *in vivo* fragmentów substancji P
  - III-2. Działanie *in vitro* fragmentów substancji P

### Contents:

- I. Introduction
- II. Enzymes involved in substance P degradation
  - II-1. Substance P degrading enzyme
  - II-2. Enkephalinase
  - II-3. Dipeptidyl peptidase
  - II-4. Angiotensin converting enzyme
  - II-5. Substance P-degrading endopeptidase
- III. Biological significance of substance P fragments
  - III-1. Action of substance P fragments *in vivo*
  - III-2. Action of substance P fragments *in vitro*

### Wykaz stosowanych skrótów:

ACE—enzym przekształcający angiotensynę (*angiotensin converting enzyme*); DA—dopamina; DFP—diizopropylodifluorofosforan; PCMB—p-chlorortęciobenzoesan; Pyr—kwas piroglutaminowy; SP—substancja P; SPDE—enzym degradujący substancję P (*substance P degrading enzyme*).

## I. Wstęp

Wiele biologicznie aktywnych peptydów, w tym także neurokininy (tachykininy), jest syntetyzowanych w postaci nieaktywnych prekursorów o dużej masie

<sup>1,2</sup> dr, <sup>3,4</sup> prof. dr hab., \*I Zakład Biochemii, \*\*II Zakład Biochemii, Instytutu Fizjologii i Biochemii, Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź.

cząsteczkowej. Ich aktywacja zachodzi podczas specyficznej wewnątrzkomórkowej proteolizy, wycinającej z cząsteczki macierzystej aktywny biologicznie związek lub związki. Po wydzieleniu go przez komórkę do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i przetransportowaniu do komórki docelowej, wiąże się on z odpowiednim receptorem, wywołując efekt fizjologiczny. Biosyntezie neurokinin oraz ich receptorom poświęcono prace przeglądowe prezentowane w 1 numerze 38 tomu *Postępów Biochemii* z 1992 roku.

Zakończenie działania hormonu czy neurotransmitera peptydowego spowodowane jest jego degradacją proteolityczną zachodzącą na zewnątrz komórki docelowej; nie można jednak wykluczyć i innego mechanizmu, polegającego na internalizacji kompleksu peptyd-receptor i jego degradacji wewnątrzkomórkowej.

Czy jednak zawsze degradacja neurotransmitera jest równoznaczna z jego inaktywacją? W przypadku niektórych peptydów, np. neurokinin istnieje jeszcze jedna możliwość: enzymy proteolityczne degradujące substancję P (SP) w istocie nie powodują jej inaktywacji, lecz generują fragmenty wykazujące wysoką aktywność biologiczną.

## II. Enzymy uczestniczące w degradacji substancji P

Do tej pory odkryto kilka błonowych proteaz powodujących degradację SP. Rozszczepiają one ten jedenastepeptyd w miejscach zaznaczonych na Ryc. 1.

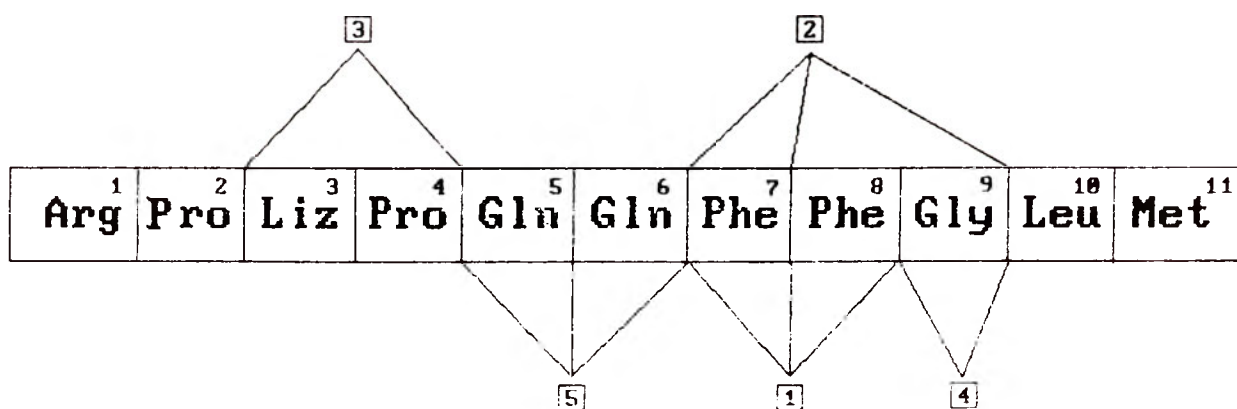
W chwili obecnej trudno przesądzić, który czy też które z tych enzymów są faktycznie odpowiedzialne za przerwanie sygnału zapoczątkowanego uwolnieniem SP do szczeliny synaptycznej. Wyniki badań neurotransmiterów będących aminami wskazują, że główną drogą ich inaktywacji jest zwrotny wychwyt. Nawet

w przypadku acetylocholino, mającej bardzo wydajny układ inaktywacji, głównym powodem zaniku przenoszenia informacji pomiędzy neuronami jest dyfuzja [1]. W przypadku neurotransmiterów peptydowych taki mechanizm jest mało prawdopodobny, choć istnieją prace dowodzące możliwości zwrotnego wychwytu peptydów uwalnianych przez zakończenia presynaptyczne [2, 3, 4]. Wydaje się jednak, że jedynym istotnym sposobem inaktywacji neurotransmiterów peptydowych jest hydroliza enzymatyczna. Przypuszczalnie stosunkowo niewielka liczba egzo- i endopeptydaz preferująca oligopeptydy jako substraty spełnia rolę systemu inaktywującego uwalniane neurotransmitery. Centra aktywne tych enzymów wykazują małą specyficzność w stosunku do konkretnych aminokwasów, a rozpoznają raczej pewne podstawowe cechy chemiczne łańcucha aminokwasów, na przykład jego hydrofobowość czy polarność.

nów czuciowych rogów grzbietowych zaangażowanymi w przewodzenie bólu. Tam także obecne są receptory SP. Fakty te dowodzą, że rozmieszczenie SPDE, SP oraz jej receptorów jest ściśle współzależne. Pozostaje jednak ciągle niewiadomą czy enzym ten odgrywa rolę fizjologiczną w wygaszaniu sygnału generowanego przez ten neuropeptyd, czy też zaangażowane w ten proces są inne peptydazy [8]. Dowiedziono, że SPDE jest enzymem mitochondrialnym, a więc jest mało prawdopodobne by odgrywał istotną rolę w degradacji SP uwalnianej przez zakończenia synaptyczne [9].

## II-2. Enkefalinaza

Neutralna metaloendopeptydaza wrażliwa na fosforamidon (enkefalinaza, endopeptydaza-24.11) [EC 3.4.24.11] — to enzym rozszczepiający SP między



Ryc. 1. Schemat struktury pierwszorzędowej substancji P oraz wiązań rozszczepianych przez proteazy degradujące substancję P.

1. Wiązania rozszczepiane przez enzym degradujący substancję P (SPDE). 2. Wiązania trawione przez enkefalinazę (endopeptydaza-24.11). 3. Wiązania rozszczepiane przez peptydazę dipeptydylową. 4. Wiązania przecinane przez enzym przekształcający angiotensynę (ACE). 5. Wiązania przecinane przez endopeptydazę degradującą substancję P.

## II-1. Enzym degradujący substancję P

W komórkach nerwowych mózgowia człowieka i szczura, występuje metaloendopeptydaza wrażliwa na czynniki chelatujące, zwana enzymem degradującym substancję P (SPDE-*substance P degrading enzyme*) [EC 3.4.24.]. Przecina ona wiązania peptydowe SP pomiędzy Gln<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> i Phe<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup> [5].

SPDE ma masę cząsteczkową około 70 kDa i wykazuje uderzająco wysoką specyficzność w stosunku do SP, w porównaniu z innymi neuropeptydami. Różni się on od ACE i endopeptydazy 24.11 (enkefalinazy) specyficznością (Ryc. 1), właściwościami fizycznymi i wrażliwością na inhibitory. Otrzymanie przeciwciał poliklonalnych przeciw SPDE pozwoliło na wyodrębnienie jej spośród innych peptydaz degradujących SP [5]. Rozmieszczenie SPDE w rdzeniu kręgowym odpowiada lokalizacji włókien nerwowych zawierających SP oraz specyficznych dla niej receptorów [6, 7]. Znaczne ilości SPDE znajdują się w obrębie blaszki I i II rogów grzbietowych rdzenia kręgowego, a właśnie w tym obszarze występują zakończenia nerwowe zawierające substancję P, będące zakończeniami neuro-

Gln<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>, Gly<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup> [10]. Wyniki badań związanych z błonami peptydaz, które hydrolizują substancję P w obrębie istoty czarnej mózgowia, sugerują że głównym enzymem katabolizującym ten neuropeptyd jest enkefalinaza [11]. Specyficzność jej jest niewielka. Przecina ona wiązania peptydowe X-Y (X-dowolny aminokwas, Y-aminokwas hydrofobowy), lecz wykazuje duże powinowactwo do peptydów o małej i średniej wielkości [10]. Początkowo uważano, że główną jego rolą jest inaktywacja enkefalin i SP w prądkowiu [10, 12]. Jednak enkefalinaza występuje głównie w komórkach glejowych, a nie nerwowych i jej funkcją może być degradacja fragmentów neuropeptydów, a nie bezpośrednia inaktywacja peptydów uwalnianych do szczeliny synaptycznej. W badaniach prowadzonych przy użyciu komórek neuroblastomy, stwierdzono, że fosforamidon wywiera bardzo słaby wpływ na hamowanie rozpadu SP. Sugerowałoby to, że degradacja neuropeptydu zachodzi pod wpływem innego enzymu [13, 14], aczkolwiek nie można wykluczyć, że w pewnych obszarach mózgowia, na przykład w prądkowiu omawiana proteaza pełni postulowaną rolę.



### II-3. Peptydaza dipeptydylowa

Peptydaza dipeptydylowa IV [EC 3.4.14.5] (amino-peptydaza postprolinowa) odcina N-końcowe dipeptydy od polipeptydów, których drugim aminokwasem jest prolina ( $X^1$ -Pro $^2$ ). Enzym działa optymalnie w środowisku obojętnym i lekko zasadowym. Wiązanie rozpoznawane przez tę peptydazę nie jest rozszczepiane przez większość innych aminopeptydaz. Ze względu na wysoką specyficzność aminopeptydazy postprolinowej, wielu autorów uważa, że odgrywa ona kluczową rolę w regulacji procesów fizjologicznych. Naturalnymi substratami enzymu są takie peptydy i białka jak: kasomorfin, substancja P, trypsynogen i monomery fibryny [15, 16, 17].

Degradacja SP przez aminopeptydazę postprolinową nie zachodzi zgodnie z kinetyką określoną przez Michaelisa-Menten; przy stężeniu substratu powyżej 50  $\mu$ M dochodzi bowiem do nieproporcjonalnego wzrostu aktywności enzymu [16].

### II-4. Enzym przekształcający angiotensynę

Peptydaza rozszczepiająca wiązania Phe $^8$ -Gly $^9$  i Gly $^9$ -Leu $^{10}$  zwana jest enzymem przekształcającym angiotensynę (ACE—*angiotensin converting enzyme*) [EC 3.4.15.1.] [18]. ACE występuje w komórkach śródbłonna, a szczególnie aktywny jest w komórkach śródbłonna płuc. Obecny jest także w osoczu. Główną funkcją tego enzymu jest przekształcanie angiotensyny I w angiotensynę II, która jest czynnikiem powodującym skurcz naczyń krwionośnych i pobudzającym wydzielanie aldosteronu. Inhibitory ACE, takie jak kaptopril i enalapril są stosowane w leczeniu nadciśnienia tętniczego.

ACE występuje również w mózgowiu, lecz pełni tam prawdopodobnie inną funkcję niż na obwodzie. Enzym z mózgowia ma mniejszą masę cząsteczkową w porównaniu z enzymem znajdującym się w tkankach obwodowych (140 kDa i 180 kDa) [19]. Wykazano, że jest on zdolny do rozszczepiania wiązań peptydowych SP pomiędzy Phe $^8$ -Gly $^9$  i Gly $^9$ -Leu $^{10}$ . Degraduje także neurokininę A [20]. Specyficzność substratowa ACE jest niewielka; działając na enkefalinę odszczepia od nich C-końcowe dipeptydy. Metodami autoradiograficznymi wykazano, że ACE znajduje się głównie w drogach łączących prądkowiec z istotą czarną [21].

### II-5. Endopeptydaza degradująca substancję P

Ostatnio opisano kolejną peptydazę mogącą brać udział w inaktywacji SP. Jest to endopeptydaza wyizolowana z mózgowia szczura, trawiąca peptyd między Pro $^4$ -Gln $^5$ , Gln $^5$ -Gln $^6$  i Gln $^6$ -Phe $^7$  [13]. Enzym ma masę cząsteczkową rzędu 55-58 kDa i wykazuje optimum działania w pH około 7.5. Jest mało wrażliwy na kaptopril, fosforamidon i DFP które są specyficznymi inhibitorami ACE, enkefalinazy i dipetydyloamino-

peptydazy [13], natomiast jego aktywność jest silnie hamowana przez EDTA, o-fenantrolinę i PCMB. Wydaje się, że rozszczepienie wiązania Gln $^6$ -Phe $^7$  przez ten enzym prowadzi do całkowitego zniesienia aktywności fizjologicznej SP, podczas gdy rozszczepienie wiązań peptydowych Pro $^4$ -Gln $^5$  i Gln $^5$ -Gln $^6$  hamuje aktywność odpowiednio w około 30 i 70% [13]. Powstałe w ten sposób C-końcowe fragmenty SP — peptydy SP $_{5-11}$  i SP $_{6-11}$  mogłyby być z kolei substratami aminopeptydazy, co prowadziło do ich całkowitego unieczynnienia. Alternatywnie, C-końcowy fragment SP $_{5-11}$  może być wychwytywany przez komórki, gdyż jak wykazano, takie fragmenty (ale nie cała SP) były pobierane przez skrawki mózgowia w hodowli [13].

## III. Biologiczne znaczenie fragmentów substancji P

### III-1. Działanie *in vivo* fragmentów substancji P

Powstające w wyniku działania peptydaz fragmenty SP wykazują wysoką aktywność biologiczną. Podanie fragmentów N-końcowych czy C-końcowych do jąder śródmózgowia wywołuje podobne reakcje motoryczne do powodowanych przez substancję P [22, 23]. W mózgowiu i płynie mózgowo-rdzeniowym poziom fragmentów N-końcowych SP (SP $_{1-7}$ , SP $_{1-8}$ ) jest znacznie wyższy niż fragmentów C-końcowych (SP $_{7-11}$ , SP $_{5-11}$ ) [5, 24, 25].

Najwyższy poziom SP zanotowano w części siatkowatej istoty czarnej. Stwierdzono ponadto, że stężenie innego neuropeptydu należącego do rodziny tachykinin — neurokininy A, jest w tym obszarze bardzo wysokie. Jednakże do tej pory nie udało się udowodnić istnienia w tym regionie receptorów dyskusowanych neuropeptydów [26, 27]. Z drugiej strony, wiadomo że zarówno SP, jak i neurokinina A odgrywają istotną rolę w istocie czarnej; podanie do tego obszaru jednego z tych peptydów wywołuje gwałtowne uwolnienie DA (dopaminy) w prądkowiu. Wykazano także, że spantyd I (ang. *spantide I*; *antagonista SP*) selektywnie blokuje stymulujące działanie SP [28]. Ponieważ nie udało się wykazać istnienia receptorów tachykinin w istocie czarnej mózgowia, zasugerowano, że SP ujawnia swe działanie biologiczne poprzez wytworzenie metabolitu powstającego w wyniku proteolizy [29]. Obecność N- i C-końcowych fragmentów SP (SP $_{1-7}$ , SP $_{5-11}$ , SP $_{7-11}$ , SP $_{8-11}$ ) wykazano w istocie czarnej szczura [24], płynie mózgowo-rdzeniowym człowieka [30], preparatach błon komórkowych otrzymanych ze śródmózgowia szczura [31] oraz w błonach komórkowych jądra ogoniastego świni [10].

Reid i współautorzy [24] stwierdzili, że podanie do istoty czarnej N-końcowego fragmentu SP (SP $_{1-7}$ ) powoduje stymulację bądź inhibicję (w zależności od dawki) uwalniania DA w prądkowiu. Małe

dawki SP<sub>1-7</sub> (0.01 nmola) hamują, zaś duże (1-5 nmoli) stymulują ten proces. Małe dawki SP<sub>1-7</sub> hamują także wydzielanie DA wywołane podaniem SP. Efektu tego nie wykazywał natomiast fragment SP<sub>1-7</sub> w stosunku do neurokininy A, co sugeruje, że działa on za pośrednictwem receptora SP. SP<sub>1-7</sub> występuje stale w istocie czarnej w stężeniu około 15 razy mniejszym niż SP [24]. Wydaje się więc, że działając przeciwnie do SP może on pełnić funkcję regulatora wydzielania DA, tworząc pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego [24]. Mechanizm podany wyżej, wyjaśnia przyczyny dwufazowego działania SP: małe dawki SP wywołują wzrost uwalniania DA w prążkowie, a duże hamują ten proces. Związane to jest z tworzeniem się w tych warunkach większych ilości fragmentu SP<sub>1-7</sub>, działającego antagonistycznie w stosunku do SP.

C-końcowy fragment SP (SP<sub>6-11</sub>) hamuje uwalnianie DA w prążkowie. Nie zaobserwowano natomiast wpływu hamującego SP<sub>6-11</sub> na uwalnianie DA po podaniu SP czy neurokininy A. Sugeruje to, że mechanizm tego zjawiska nie polega na oddziaływaniu SP<sub>6-11</sub> z receptorami SP czy neurokininy A. Stwierdzono ponadto, że wpływ ten ujawniał się dopiero przy bardzo wysokich dawkach SP<sub>6-11</sub> (kilka nanomoli); stąd wniosek, że zjawisko to nie ma większej roli biologicznej [24].

Przytoczone wyżej fakty nasuwają szereg pytań. Z jednej strony wiadomo, że w istocie czarnej stężenie neurokinin jest wysokie i odgrywają one kluczową rolę w regulacji uwalniania DA w prążkowie, a z drugiej strony nie udało się do chwili obecnej udowodnić istnienia receptorów neurokinin w istocie czarnej mózgowia. Założywszy, że SP wykazuje swe działanie biologiczne dopiero po przecięciu cząsteczki przez odpowiednią peptydazę czy peptydazy, należałoby poszukiwać w tym obszarze receptorów o wysokiej specyficzności w stosunku do fragmentów SP lub zbadać powinowactwo fragmentów SP do dobrze już scharakteryzowanych na poziomie molekularnym receptorów neurokinin [32].

### III-2. Działanie *in vitro* fragmentów substancji P

Badania wpływu fragmentów SP i analogów tych fragmentów na aktywność pomp jonowych, takich jak ATPazy (sodowo-potasowa i wapniowo-magnezowa), obecnych w błonach synaptosomalnych różnych obszarów mózgowia szczura, wykazały że najsilniej aktywował (Na, K) ATPazę analog fragmentu SP ([Pyr<sup>6</sup>, Tyr<sup>8</sup>] SP<sub>5-11</sub>) (10 μM). Podobnie aktywująco wpływał on na (Ca, Mg) ATPazę [33]. Stwierdzono również, że N-końcowy fragment SP (SP<sub>1-4</sub>), podobnie jak SP, zwiększa intensywność endogennej (stymulowanej cAMP) fosforylacji synapsyny I (białko błon pęcherzyków synaptycznych), natomiast fragment C-końcowy nie wykazywał żadnego wpływu na ten proces [34]. Intensywność endogennej fosforylacji synapsyny I stymulowanej jonami wapnia i kalmoduliną ulegała nato-

miast drastycznemu zmniejszeniu pod wpływem SP, fragmentu SP<sub>1-4</sub> oraz analogów fragmentu C-końcowego ([Pyr<sup>6</sup>, Tyr<sup>8</sup>] SP<sub>6-11</sub>, [Tyr<sup>8</sup>] SP<sub>6-11</sub>). We wszystkich tych przypadkach SP i jej fragmenty lub analogi fragmentów działały jednak w wysokich stężeniach (1 mM, 100 μM) [35]. Badając działanie analogów C-końcowego fragmentu SP ([Pyr<sup>5</sup>, Tyr<sup>8</sup>] SP<sub>5-11</sub>, [Pyr<sup>6</sup>, Tyr<sup>8</sup>] SP<sub>6-11</sub>) (40 nM) na aktywność monooaminooksydazy [EC 1.4.3.4], wykazano że analog [Pyr<sup>6</sup>, Tyr<sup>8</sup>] SP<sub>6-11</sub> zwiększa jej aktywność w homogenatach kory mózgowej i hipokampa szczura, natomiast analog [Pyr<sup>5</sup>, Tyr<sup>8</sup>] SP<sub>5-11</sub> hamuje jej aktywność w homogenatach hipokampa [36].

Przytoczone wyniki wskazują, że nie tylko substancja P, ale też jej fragmenty i analogi mogą *in vitro* wpływać modulująco na tak istotne procesy jak aktywny transport kationów w błonach synaptosomalnych czy fosforylacja synapsyny I. Niewykluczone, że również *in vivo* aktywacja ATP-az jest regulowana podobnie. *In vivo*, bezpośredni wpływ fragmentów SP na fosforylację synapsyny I jest raczej mało prawdopodobny, ponieważ zmianę stopnia fosforylacji tego białka można było zaobserwować dopiero przy wysokim stężeniu tych fragmentów. Zważywszy jednak, że w tym samym układzie eksperymentalnym (wyzolowane błony synaptosomalne), N-końcowy fragment SP (SP<sub>1-4</sub>) zwiększa intensywność fosforylacji synapsyny I przy udziale endogennej kinazy białkowej zależnej od cAMP, hamując jednocześnie fosforylację tego białka stymulowaną przez jony wapnia i kalmodulinę, to fakt ten nie może pozostawać bez znaczenia [34, 35]. Najprawdopodobniej jednak jest to efekt pośredni (wynikający np. z hamowania aktywności fosfataz przez fragmenty SP czy wiązania się tych fragmentów z kalmoduliną).

Autorzy świadomi są faktu, że informacje zebrane na temat biologicznego działania produktów degradacji SP są fragmentaryczne i Czytelnikowi mogą wydawać się niespójne. Mimo to odzwierciedlają one obecny stan wiedzy dotyczący tego zagadnienia. Nasuwa się oczywisty wniosek — peptydazy degradujące neurokininy niekoniecznie muszą powodować ich inaktywację, a więc substancja P jest nie tylko neurotransmiterem ale jednocześnie może pełnić funkcję cząsteczki prekursorowej.

Artykuł otrzymano 17 marca 1992 r.

Zaakceptowano do druku 27 kwietnia 1992 r.

### Piśmiennictwo

1. White JD, Stewart KD, Krause JE, McKelvy JF (1985) *Physiol Rev* 65: 553-606
2. Charli JL, Ponce G, McKelvy JF, Joseph-Bravo P (1984) *J Neurochem* 42: 981-986
3. George SR, Van Loon GR (1981) *Neurosci Lett* 26: 297-300
4. Nakata Y, Kusaka Y, Yajima H, Segawa T (1981) *J Neurochem* 37: 1529-1534
5. Lee C-M, Sandberg BEB, Hanley MR, Iversen LL (1981) *Eur J Biochem* 144: 315-327

6. Barber RP, Vaughn JE, Slemmon JR, Roberts PM, Leeman SE (1979) *J Comp Neurol* **184**: 331-352
7. Charlton CG, Helke CJ (1985) *J Neurosci* **5**: 1653-1661
8. Probert L, Hanley MR (1987) *Neurosci Lett* **78**: 132-137
9. Horsthem B, Leblanc P, Kordon C, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R, Bauer K (1984) *Eur J Biochem* **139**: 315-320
10. Matsas R, Fulcher I, Kenny AJ, Turner AJ (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3111-3115
11. Oblin A, Danse MJ, Zivkovic B (1988) *Neurosci Lett* **84**: 91-96
12. Schwartz JC (1983) *Trends Neurosci* **6**: 43-48
13. Endo S, Yokosawa H, Ishii S-I (1988) *J Biochem* **104**: 999-1006
14. Endo S, Yokosawa H, Ishii S-I (1985) *J Biochem* **98**: 1293-1299
15. Mentlein R (1988) *FEBS Lett* **234**: 251-256
16. Nausch I, Mentlein R, Heymann E (1990) **371**: 1113-1118
17. O'Connor B, O'Cuinn G (1986) *Eur J Biochem* **154**: 329-335
18. Yokosawa H, Endo S, Oguro Y, Ishii S-I (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **116**: 735-742
19. Strittmatter SM, Lynch DR, De Souza EB, Snyder SH (1985) *Endocrinology* **117**: 1667-1674
20. Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdos EG (1984) *Peptides* **5**: 769-776
21. Strittmatter SM, Lo MMS, Javitch JA, Snyder SH (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1523-1527
22. Hall ME, Stewart JM (1983) *Peptides* **4**: 763-768
23. Pinnock RD, Woodruff GN, Turnbull MJ (1983) *Neuropharmacology* **22**: 687-696
24. Reid MS, Herrera-Marschitz M, Terenius L, Ungerstedt U (1990) *Brain Res* **526**: 228-234
25. Sakurada T, Kuwahra H, Takahashi K, Sakurada S, Kisara K, Terenius L (1988) *Neurosci Lett* **95**: 281-285
26. Nilsson G, Hokfelt T, Pernow B (1974) *Med Biol* **52**: 424-427
27. Kanazawa I, Ogawa T, Kimura S, Munekata E (1984) *Neurosci Rev* **2**: 111-120
28. Reid MS, Herrera-Marschitz M, Hokfelt T, Terenius L, Ungerstedt U (1988) *Eur J Pharmacol* **147**: 411-420
29. Hokfelt T, Terenius L (1987) *Trends Neurosci* **10**: 22-23
30. Nyberg F, LeGreves P, Sundquist C, Terenius L (1984) *Biochem Biophys Res Commun* **125**: 244-250
31. Sakurada T, LeGreves P, Stewart J, Terenius L (1985) *J Neurochem* **44**: 718-722
32. Nakanishi S, Ohkubo H, Kakizuka A, Yokota Y, Shigemoto R, Sasai Y, Takumi T (1990) *Recent Prog Hormone Res* **46**: 59-84
33. Lachowicz L, Janiszewska G (1987) *Int J Biochem* **8**: 737-740
34. Hrabec Z, Szkudlarek J, Lachowicz L (1990) *Comp Biochem Physiol* **96C**: 59-63
35. Hrabec Z, Szkudlarek J, Lachowicz L (1991) *Gen Pharmacol* **22**: 879-882
36. Turska E, Lachowicz L, Koziolkiewicz W, Wasiaik T (1985) *Gen Pharmacol* **16**: 293-295

## N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidaza — enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa

### N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase — enzyme Tay-Sachss and Sandhoffs diseases

KRZYSZTOF ZWIERZ<sup>1\*</sup>  
 JAROSŁAW JUSZKIEWICZ<sup>2\*</sup>  
 LESZEK ARCIUCH<sup>2\*</sup>  
 ANDRZEJ GINDZIENSKI<sup>1\*\*</sup>

#### Spis treści:

- I. Medyczne znaczenie enzymu
- II. Budowa N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy
- III. Posttranslacyjne dojrzewanie N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy
  - III-1. Modyfikacje w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej
  - III-2. Modyfikacje N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy w aparacie Golgiego i lizosomach
- IV. Podsumowanie

#### Contents:

- I. Medical significance of the enzyme
- II. Structure of N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase
- III. Posttranslational processing of N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase
  - III-1. Modifications in the rough endoplasmic reticulum (RER)
  - III-2. Modifications of N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase in the Golgi apparatus and lysosomes
- VI. Conclusions

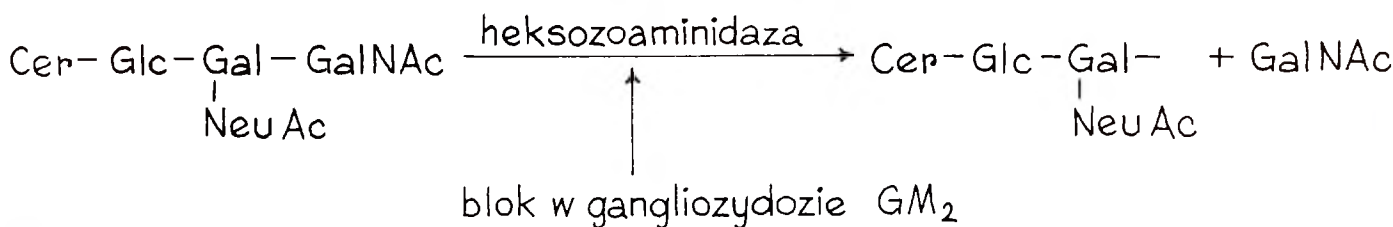
#### I. Medyczne znaczenie enzymu

N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidaza (EC 3.2.1.52) odszczepia reszty N-acetyloglucozamininy lub N-acetylo-

<sup>1</sup> prof. dr hab., <sup>2</sup> mgr, \* Zakład Biochemii Farmaceutycznej; \*\* Zakład Chemii Ogólnej i Organicznej; Instytut Chemii, Akademia Medyczna w Białymstoku, 15-230 Białystok, ul. Mickiewicza 2.



galaktozoaminy z nieredukującego końca łańcuchów oligosacharydowych glikolipidów, glikoprotein i proteoglikanów [1] (Ryc. 1). Enzym występuje prawie we wszystkich tkankach, ale szczególnie wysoką jego aktywność stwierdzono w nerce [2-5], śledzionie [6], wątrobie [7-10], błonie śluzowej żołądka [11] i jelit [12, 13], korze mózgowej [14], fibroblastach skóry [15], łożysku [16, 17] oraz tkankach zmienionych nowotworowo [13]. Dla celów klinicznych aktywność enzymu oznaczana jest w moczu, surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w płynie stawowym [5, 10, 11, 18-21]. Oznaczanie zmiany aktywności enzymu w moczu ma znaczenie diagnostyczne w chorobach nerek [22] oraz przy monitorowaniu stanu pacjentów chorych na cukrzycę [23].



Ryc. 1. Schemat działania N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy.

Spśród reakcji katalizowanych przez N-acetylo-β-D-heksozoaminidazę największe znaczenie medyczne ma degradacja gangliozydów GM<sub>2</sub> [24, 25]. Bardzo dramatyczny przebieg kliniczny mają tzw. choroby spichrzania związane z wrodzonym niedoborem aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy, znane pod nazwą choroby Tay-Sachsa i choroby Sandhoffa (Tab. 1) [26-29]. Wskutek obniżenia lub braku aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy dochodzi do gromadzenia się w komórkach nerwowych gangliozydów GM<sub>2</sub>. Postępująca kumulacja tych związków prowadzi do stopniowej dezintegracji prawidłowych czynności układu nerwowego, czego objawami są m.in. niedorozwój umysłowy, zaburzenia motoryczne, ślepotą, utrata mowy, agresywność. Choroby Tay-Sachsa i Sandhoffa mają podłoże genetyczne i są schorzeniami nieuleczalnymi, powodującymi śmierć w dzieciństwie [26, 27].

## II. Budowa N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy

N-acetylo-β-D-heksozoaminidaza jest glikoproteiną zbudowaną z dwóch łańcuchów polipeptydowych oznaczanych α i β. W cząsteczce enzymu występują dwa łańcuchy w trzech możliwych kombinacjach. Izoenzym A ma budowę αβ, izoenzym B-ββ i izoenzym S-αα [30-32]. U człowieka geny kodujące syntezę N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy są zlokalizowane na dwóch różnych parach chromosomów: gen kodujący syntezę łańcuchów α na chromosomach 15 pary, a łańcuchów β na chromosomach 5 pary [33, 34].

W szorstkiej siateczce endoplazmatycznej są syntetyzowane dwa odpowiednie prepolipeptydy:

α zbudowany z 528 aminokwasów i β zbudowany z 556 aminokwasów (Ryc. 2) [30, 32]. Pomimo, że każdy z prepolipeptydów jest kodowany przez inny gen homologia ich jest wysoka i sięga 57%.

## III. Posttranslacyjne dojrzewanie N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy

### III-1. Modyfikacje w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej

Po translacji prepolipeptydy α i β są przekształcane w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej w polipeptydy (Ryc. 2 i 3). Modyfikacja polega na proteolitycznym „odcięciu” od strony N-końcowej

krótkich peptydów: z łańcucha α fragmentu „a” zawierającego 22 aminokwasy (jest to prawdopodobnie tzw. sekwencja liderowa, od której rozpoczyna się właściwy łańcuch polipeptydowy), z łańcucha β fragmentu „b” zawierającego 42 aminokwasy (jest to 23 aminokwaso-

Tabela 1.

Niedobory aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy w/g [26-29].

Choroba	Niedobór heksozoaminidazy	Natura defektu na poziomie molekularnym
Tay-Sachsa (wariant A)	β-heksozoaminidazy A	1. Brak mRNA dla α-prekursora. 2. Zredukowana synteza α-prekursora. 3. Nierozpuszczalny α-prekursor. 5. Dojrzały α-prekursor dłuższy niż normalnie i posiada nieaktywne pola. 6. Defekt w łączeniu α i β podjednostek. 7. Zredukowana synteza α-prekursora i defekt w łączeniu z β-prekursorem.
Tay-Sachsa (wariant AB)	Brak aktywności β-heksozoaminidazy w stosunku do GM <sub>2</sub> -gangliozydu jako substratu	Nieobecność aktywatora białkowego wymaganego do hydrolizy GM <sub>2</sub> -gangliozydu
Sandhoffa	β-heksozoaminidazy A i B	1. Brak syntezy β-prekursora. 2. Zredukowane dojrzewanie α-prekursora.

wa sekwencja liderowa i 19 aminokwasowy peptyd) [31, 35, 36].

W szorstkiej siateczce endoplazmatycznej prepropolipeptydy  $\alpha$  i  $\beta$  ulegają N-glikozylacji (Ryc. 2 i 4). Polega ona na przeniesieniu oligosacharydu  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  z dolicholu na reszty asparaginy, które występują w sekwencji: -Asn-X-Ser/Thr- (gdzie -X- może być każdym aminokwasem oprócz proliny). Asparagina w tej sekwencji musi występować w określonej konformacji przestrzennej: w postaci  $\beta$ -zgięcia (ang.  $\beta$ -turn), struktury pofalowanej kartki (ang.  $\beta$ -sheet) lub konformacji przypadkowego kłęбка (ang. *random coil*), zajmując w łańcuchach prepropolipeptydów  $\alpha$  i  $\beta$  określoną pozycję, od N-końca łańcucha białkowego [37, 38]. Prepropolipeptyd  $\alpha$  ulega glikozylacji w dwóch miejscach; są to reszty asparaginy o numerach 114 w strukturze *random coil* i 294 w strukturze  $\beta$ -turn. W cząsteczce propolipeptydu  $\beta$  glikozylowane są cztery reszty asparaginy; dwie o numerach 84 i 142 w strukturze *random coil*, jedna

o numerze 190 w strukturze  $\beta$ -sheet oraz jedna w pozycji 327 w strukturze  $\beta$ -turn [39-41]. Asparagina w pozycji 497 propolipeptydu  $\beta$  nie ulega glikozylacji; jej obecność wydaje się mieć istotne znaczenie dla ekspresji izoenzymu B i jego stabilności. Zastąpienie asparaginy glutaminą na drodze tzw. mutagenyzy kierowanej powoduje 90% obniżenie aktywności izoenzymu B [40].

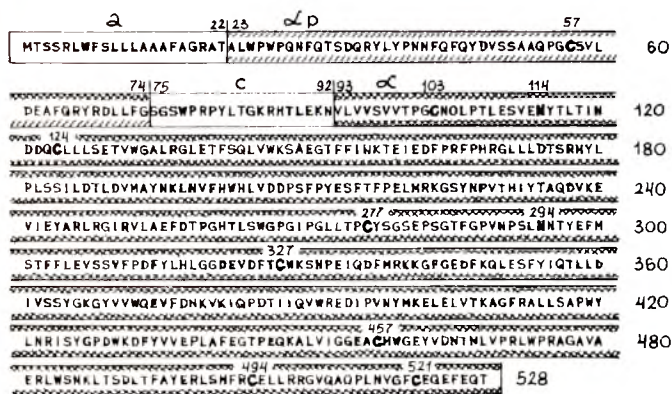
Przyłączone oligosacharydy ulegają złożonym i do końca jeszcze niewyjaśnionym przekształceniom, rozpoczynającym się w obrębie szorstkiej siateczki endoplazmatycznej, kontynuowanym w aparacie Golgi'ego i kończącym się w lizosomach. Modyfikacje łańcuchów oligosacharydowych w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej, które są najlepiej poznane i wspólne dla wszystkich N-glikoprotein, polegają na „odcięciu” w dwustopniowej reakcji katalizowanej przez odpowiednie glikozydazy, trzech terminalnych reszt glukozy i jednej reszty mannozy (Ryc. 4) [38, 41].

### III-2. Modyfikacje N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy w aparacie Golgi'ego i lizosomach

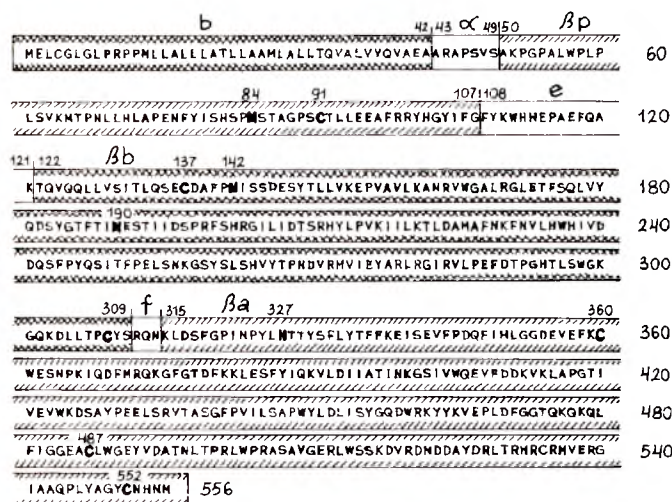
Po N-glikozylacji i proteolitycznej modyfikacji zachodzącej w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej propolipeptydy  $\alpha$  i  $\beta$  translokowane są do aparatu Golgi'ego, gdzie ulegają działaniu wielu transferaz cukrowych i glikozydaz. Poszczególne łańcuchy są przekształcane w zupełnie różny sposób, ponieważ w dojrzałej cząsteczce ich struktura jest odmienna. Jak dotąd znane są tylko niektóre struktury oligosacharydowe powstałe w wyniku wspomnianych przekształceń w dojrzałych łańcuchach  $\alpha$  i  $\beta$ . W łańcuchu  $\alpha$  zidentyfikowano oligosacharyd związany z Asn 114 o składzie  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , natomiast skład oligosacharydu związanego z Asn 294 nie został jak dotąd określony (Ryc. 4). W łańcuchu  $\beta$  nie znany jest skład oligosacharydów związanych z Asn 84 i 327. Z Asn 142 związany jest oligosacharyd  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , natomiast z Asn 190 mogą być związane dwa rodzaje oligosacharydów polimannozowych:  $\text{Man}_{5-7}\text{GlcNAc}_2$  oraz oligosacharyd o nieustalonym dotychczas składzie. Interesująca jest obecność pojedynczej reszty N-acetyloglukozoaminy w dojrzałym łańcuchu  $\beta$  dołączonej do Asn w pozycji 327 [40], co może wskazywać na istnienie endoglikozydaz w lizosomach lub na bezpośrednie przeniesienie N-acetyloglukozoaminy z pochodnych urydynowych z pominięciem fosforanu dolicholu.

Przed transportem propolipeptydów  $\alpha$  i  $\beta$  do lizosomów w aparacie Golgi'ego zachodzi synteza markera, rozpoznawanego przez receptor enzymu w błonie lizosomalnej. Markerem jest reszta kwasu fosforowego dołączonego do szóstego atomu węgla reszty mannozowej, wbudowanej do oligosacharydu wiązaniem  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 2. Jest to reakcja dwustopniowa (Ryc. 5). W pierwszym etapie N-acetyloglukozoaminotransferaza przenosi N-acetyloglukozoamino-1-fosforan z UDP-

#### PREPROPOLIPEPTYD $\alpha$



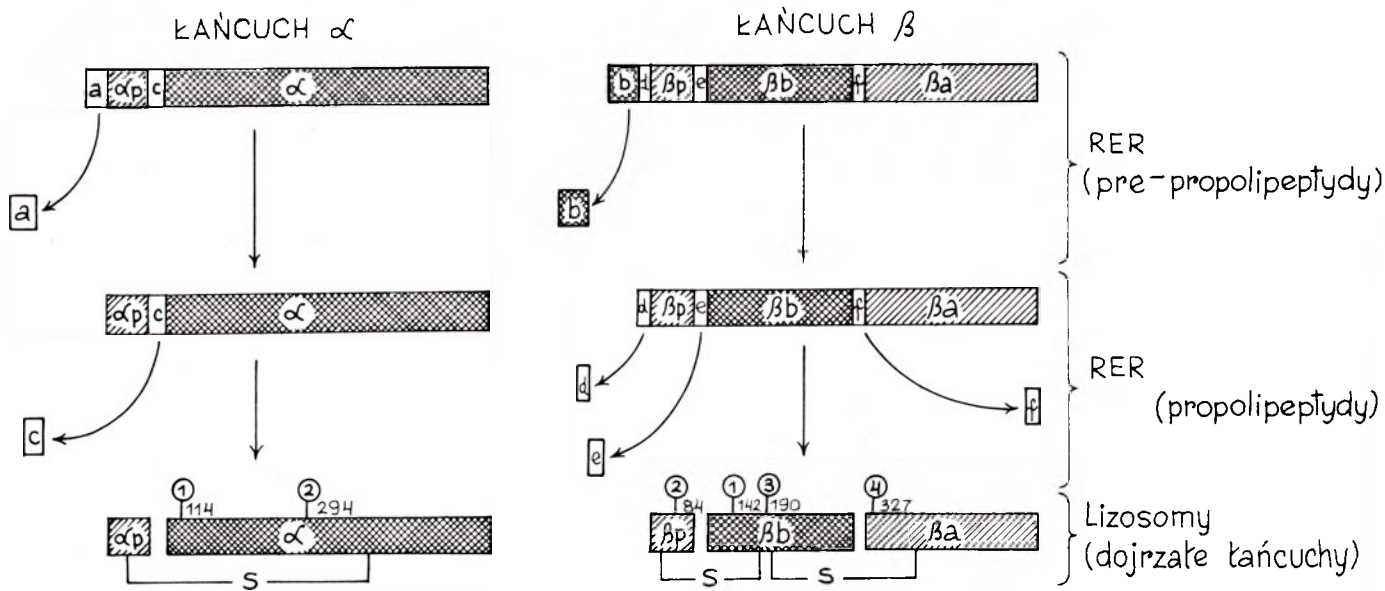
#### PREPROPOLIPEPTYD $\beta$



Ryc. 2. Sekwencja aminokwasowa prepropolipeptydów  $\alpha$  i  $\beta$  N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy, w/g [30, 32] zmodyfikowana.

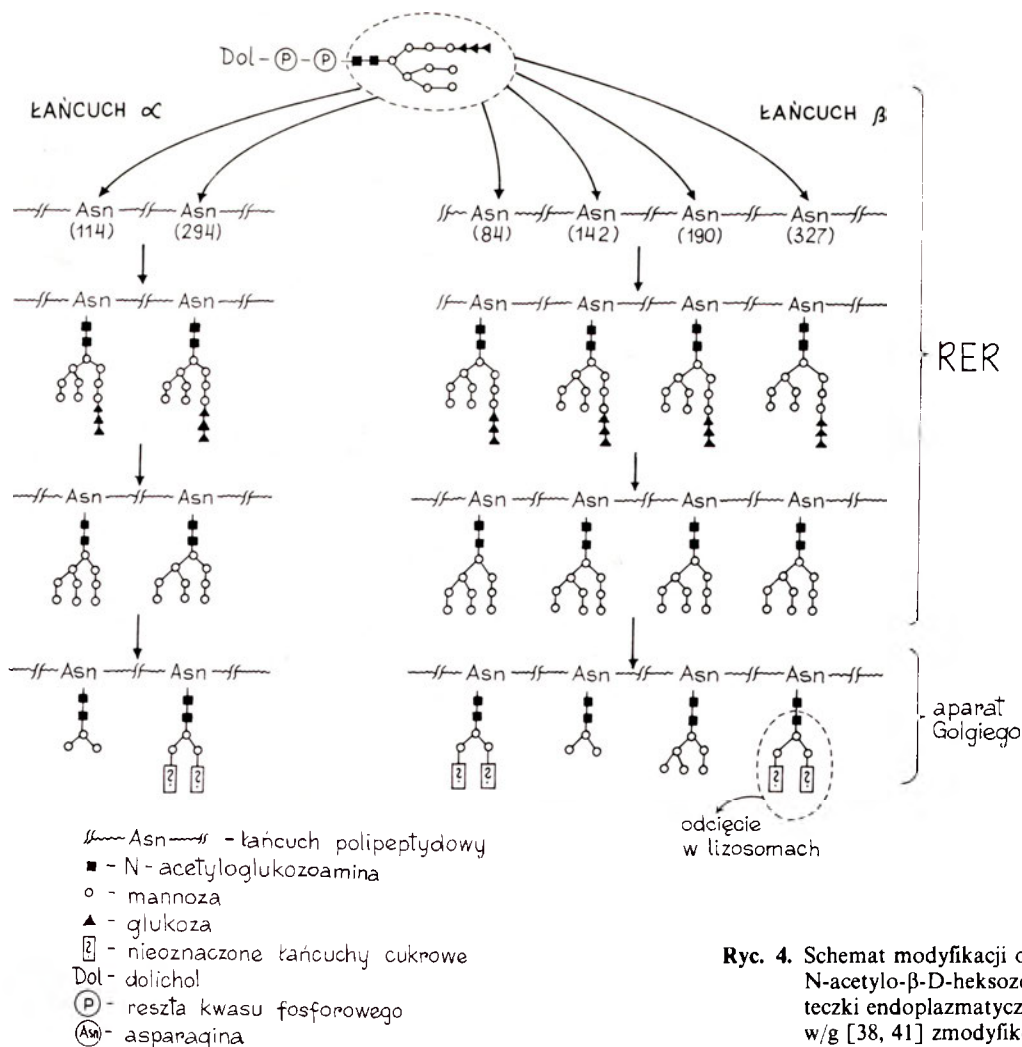
- a, c — fragmenty prepropolipeptydu  $\alpha$  ulegające „odcięciu”;
- $\alpha_p$ ,  $\alpha$  — fragmenty prepropolipeptydu  $\alpha$  tworzące łańcuch  $\alpha$ ;
- b, d, e, f — fragmenty prepropolipeptydu  $\beta$  ulegające „odcięciu”;
- $\beta_p$ ,  $\beta_b$ ,  $\beta_a$  — fragmenty prepropolipeptydu  $\beta$  tworzące łańcuch  $\beta$ ;
- N — reszty asparaginy ulegające glikozylacji;
- C — reszty cysteiny.





- ① -  $\text{Man}_3 \text{GlcNAc}_2$
- ② - nie scharakteryzowane łańcuchy cukrowe
- ③ -  $\text{Man}_5 \rightarrow 7 \text{GlcNAc}_2$  lub łańcuch cukrowy o mniejszej ilości mannozy (nie określony jeszcze)
- ④ - N-acetyloglukozoamina

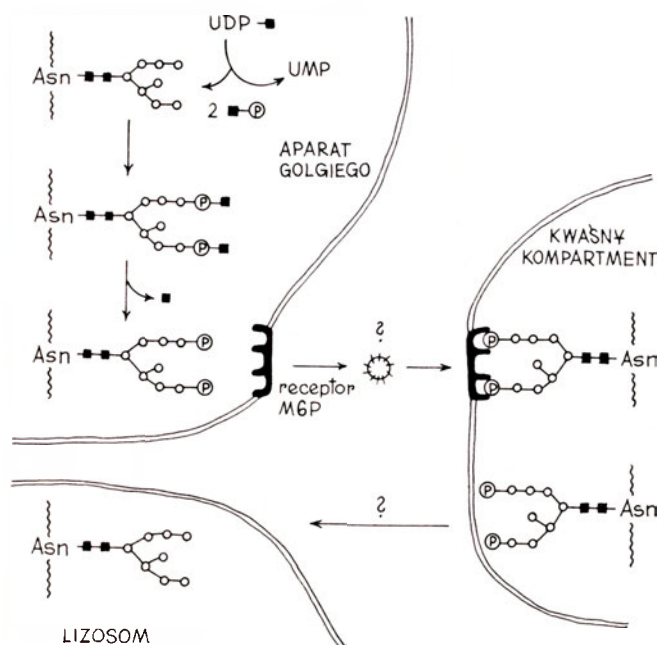
Ryc. 3. Schemat dojrzewania łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy, w/g [31, 32, 35, 36] zmodyfikowana. Wyjaśnienia skrótów opisano przy Ryc. 2.



Ryc. 4. Schemat modyfikacji oligosacharydów łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy w obrębie szorstkiej siateczki endoplazmatycznej, aparatu Golgiego i lizosomów, w/g [38, 41] zmodyfikowana.



-N-acetyloglukozoaminy na C<sub>6</sub> mannozy. W drugim etapie odszczepiana jest N-acetyloglukozoamina, a pozostawiona reszta fosforanowa jest związana z C<sub>6</sub> mannozy [38].



Ryc. 5. Schemat fosforylacji łańcucha polimannozowego i transportu N-glikoprotein do lizosomów, w/g [37, 38] zmodyfikowana.

Wyjaśnienia symboli opisano przy Ryc. 4;  
M6P — mannozo-6-fosforan

Badania *in vitro* poszukujące miejsca przyłączenia markerowej reszty fosforanowej do łańcucha  $\beta$  wskazały, że tylko oligosacharydy związane z Asn 84 i 327 są fosforylowane [40], ale jak już wspomniano, struktura tych oligosacharydów nie jest znana. Nie jest także jasne dłaczego oligosacharydy przy Asn 190, posiadające reszty mannozy w połączeniu  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 2, nie są substratem N-acetyloglukozaminotransferazy. Nie wiadomo również, czy do efektywnego łączenia się ufosforylowanych oligosacharydów enzymu z receptorem Man-6-P w błonie lizosomalnej wymagana jest obecność jednej czy więcej reszt mannozy. Istnieją bowiem różne doniesienia na temat fosforylacji poszczególnych łańcuchów. Według jednych autorów fosforylowany jest tylko łańcuch  $\beta$  [40], według innych fosforylowane są oba łańcuchy, a transport do lizosomów łańcucha  $\alpha$  jest niezależny od transportu łańcucha  $\beta$  [42]. Potwierdzeniem pierwszej hipotezy mogą być doniesienia, w których wykazano łączenie się prepolipeptydów  $\alpha$  i  $\beta$  jeszcze w obrębie aparatu olgi'ego poprzez tworzenie mostków dwusiarczkowych (Ryc. 3) [43, 44].

Po połączeniu się Man-6-P z receptorem, łańcuchy  $\alpha$  i  $\beta$  enzymu trafiają do tzw. kwaśnego przedziału (Ryc. 5), który jest strukturą komórki pośredniczącą w wymianie między aparatem Golgi'ego i lizosomami. Tam, prawdopodobnie pod wpływem obniżonego pH, następuje odłączenie enzymu od receptora błonowego.

W jaki sposób enzym z kwaśnego przedziału trafia do lizosomów, dotychczas nie wiadomo [38, 40].

Końcowe dojrzewanie łańcuchów propolipeptydowych (Ryc. 3) zachodzi prawdopodobnie w lizosomach i polega na wycięciu 14 aminokwasowego fragmentu „c” z łańcucha  $\alpha$  oraz fragmentów „d”, „e”, „f” (kolejno 8, 14 i 3 lub 5 aminokwasowych) z łańcucha  $\beta$  [32]. Usuwanie tych fragmentów peptydowych jest procesem wielostopniowym i zachodzi pod wpływem kilku różnych proteaz lizosomalnych. Powstałe podjednostki łańcucha  $\alpha$  ( $\alpha_p$  i  $\alpha$ ) oraz  $\beta$  ( $\beta_p$ ,  $\beta_b$  i  $\beta_a$ ) łączą się ze sobą, prawdopodobnie za pomocą mostków dwusiarczkowych. W grę wchodzi jedna reszta cysteiny fragmentu  $\alpha_p$  w pozycji 57 oraz reszta cysteiny fragmentu  $\alpha$  w pozycjach 103, 124, 277, 327, 457, 494 i 521 łańcucha  $\alpha$ . W łańcuchu  $\beta$  w grę wchodzi jedna reszta cysteiny w pozycji 91 fragmentu  $\beta_p$ , dwie reszty cysteiny w pozycjach 137 i 309 fragmentu  $\beta_b$ , oraz reszta cysteiny w pozycjach 360, 487, 534 i 551 fragmentu  $\beta_a$  (Ryc. 2 i 3). Nie ustalono jeszcze, które reszty cysteiny biorą udział w łączeniu podjednostek heksozoaminidazy [30, 32].

#### IV. Podsumowanie

Postępy w badaniach ludzkiego genomu stwarzają nadzieję na zlokalizowanie zmian DNA leżących u podstaw chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa. Poznanie ciągu reakcji prowadzących od DNA do dojrzałego enzymu zmierza do wypracowania strategii leczenia schorzeń wynikających z niedoboru lub braku aktywności N-acetylo- $\beta$ -D-heksozoaminidazy.

Artykuł otrzymano 17 marca 1992 r.

Zaakceptowano do druku 27 kwietnia 1992 r

#### Piśmiennictwo

- Barret AJ, Heath MF (1977) Lysosomal enzymes. w: Lysosomes. A laboratory handbook, Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 19-127
- Dance N, Price RG, Robinson D, Stirling JL (1969) *Clin Chim Acta* **24**: 189-197
- Ellis BG, Tucker SM, Tompson AE, Price RG (1975) *Clin Chim Acta* **64**: 195-202
- Marinkovic DW, Marinkovic JN, Jelka JK (1977) *Biochem J* **163**: 133-140
- Price RS, Dance N, Robinson D (1970) *Biochim Biophys Acta* **222**: 662-664
- Robinson D, Stirling JL (1968) *Biochem J* **107**: 321-327
- Lityńska A (1981) *Folia Biol Kraków* **29**: 201-209
- Oberkötter LV, Kern R, Koldovsky O (1980) *Biochim Biophys Acta* **630**: 279-286
- Pott G, Chi-Boester D, Gerlach V (1978) *J Clin Chem Biochem* **16**: 15-18
- Ikonne BJU, Ellis RB (1973) *Biochem J* **135**: 457-462
- Zwierz K, Gindziński A, Głowacka D, Porowski T (1981) *Acta Med Acad Sci Hung* **38**: 145-152
- Genel M, Holtzappie P, Koldovsky O, Segel S (1973) *Clin Chim Acta* **62**: 247-251
- Brattain MG, Green C, Kimball PM, Marks M, Khaled M (1979) *Cancer Res* **39**: 4083-4090
- Khawaja JA, Sellinger OZ (1976) *Biochem J* **158**: 513-527

15. Inui K, Yukata T, Okada S, Yabuuchi H (1985) *J Inher Metab Dis* 8: 149-150
16. Geiger B, Arnon R (1976) *Biochemistry* 15: 3484-3493
17. Huddleston JF, Lee G, Robinson JC (1971) *Am J Obstet Gynecol* 109: 1017-1020
18. Bannerjee DK, Basu D (1975) *Biochem J* 145: 113-118
19. Hultberg B, Wieslander J (1982) *Acta Med Scand* 211: 257-259
20. O'Brien JS, Okada S, Chen A, Fillerup DI (1970) *N Eng J Med* 283: 15-21
21. Tucker SM, Pierce RJ, Pierce RG (1980) *Clin Chim Acta* 102: 29-40
22. Gosiewska A (1988) Ocena przydatności oznaczania N-acetylo- $\beta$ -D-glukozaaminidazy (NAG) w leczeniu cukrzycy i rozpoznawaniu jej wczesnych powikłań. Praca doktorska, AM Białystok
23. Tager JM (1985) *Trends Biochem Sci* 10: 324-326
24. Hechtman P, Gorden BA, Ng Ying Kin (1982) *Pediatr Res* 16: 217-222
25. Kolodny EH, Brady RD, Volk BW (1969) *Biochem Biophys Res Commun* 37: 526-531
26. Sriwastawa SK, Bentler E (1973) *Nature* 241: 463
27. Czochońska J (1985) Neurologia dziecięca, PZWŁ, Warszawa, str. 244-248
28. Johnson W (1981) *Neurology* 31: 1453-1458
29. Brett EM, Ellis RB, Haas L (1973) *Arch Dis Child* 48: 775-785
30. Mahuran D, Lowden JA (1980) *Can J Biochem* 58: 287-294
31. Mahuran D, Neote K, Klavins MH, Leung A, Gravel RA (1988) *J Biol Chem* 263: 4612-4618
32. Mahuran D (1990) *J Biol Chem* 265: 6794-6799
33. Gilbert F, Kucherlapati R, Creagan RP, Murane MJ, Darlington GJ, Ruddle FH (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 263-267
34. Proia RL (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1883-1887
35. Little LE, Lau MHH, Quon DVK, Fowler AV, Neufeld EF (1988) *J Biol Chem* 263: 4288-4292
36. Quon DVK, Proia RL, Fowler AV, Bleibaun J, Neufeld EF (1988) *J Biol Chem* 264: 3380-3384
37. Montreuil J (1984) *Biol Cell* 51: 115-152
38. Verbert A, Cacan B, Cecchelli R (1987) *Biochemie* 69: 91-99
39. O'Dowd BF, Cumming DA, Gravel RA, Mahuran D (1988) *Biochemistry* 27: 5216-5226
40. Sonderfeld-Fresko S, Proia RL (1989) *J Biol Chem* 264: 7692-7697
41. Berger EG, Buddecke E, Kemreling JP, Kobata A, Paulson JC, Vliegenthart JFG (1982) *Experientia*, str. 1129-1258
42. Hasilik A, Neufeld EF (1980) *J Biol Chem* 255: 4946-4960
43. Proia RL, d'Azzo A, Neufeld EF (1984) *J Biol Chem* 259: 3350-3354
44. Sonderfeld-Fresko S, Proia RL (1980) *J Biol Chem* 263: 13463-13469

## Automatyczne metody analizy obrazów i ich zastosowanie w biologii komórkowej

### Automatic image analysis as used in cell biology

KRYSTYNA FILIPIAK<sup>1</sup>  
JERZY B. WARCHOŁ<sup>2</sup>

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Opis urządzenia
- III. Zasada działania automatycznego analizatora obrazu
- IV. Najważniejsze programy komputerowe automatycznego systemu analizy obrazów „MAGICAL”

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Device description
- III. Principles of the automatic image analyzer
- IV. The most important programs of the image analysis system „MAGICAL”

#### I. Wstęp

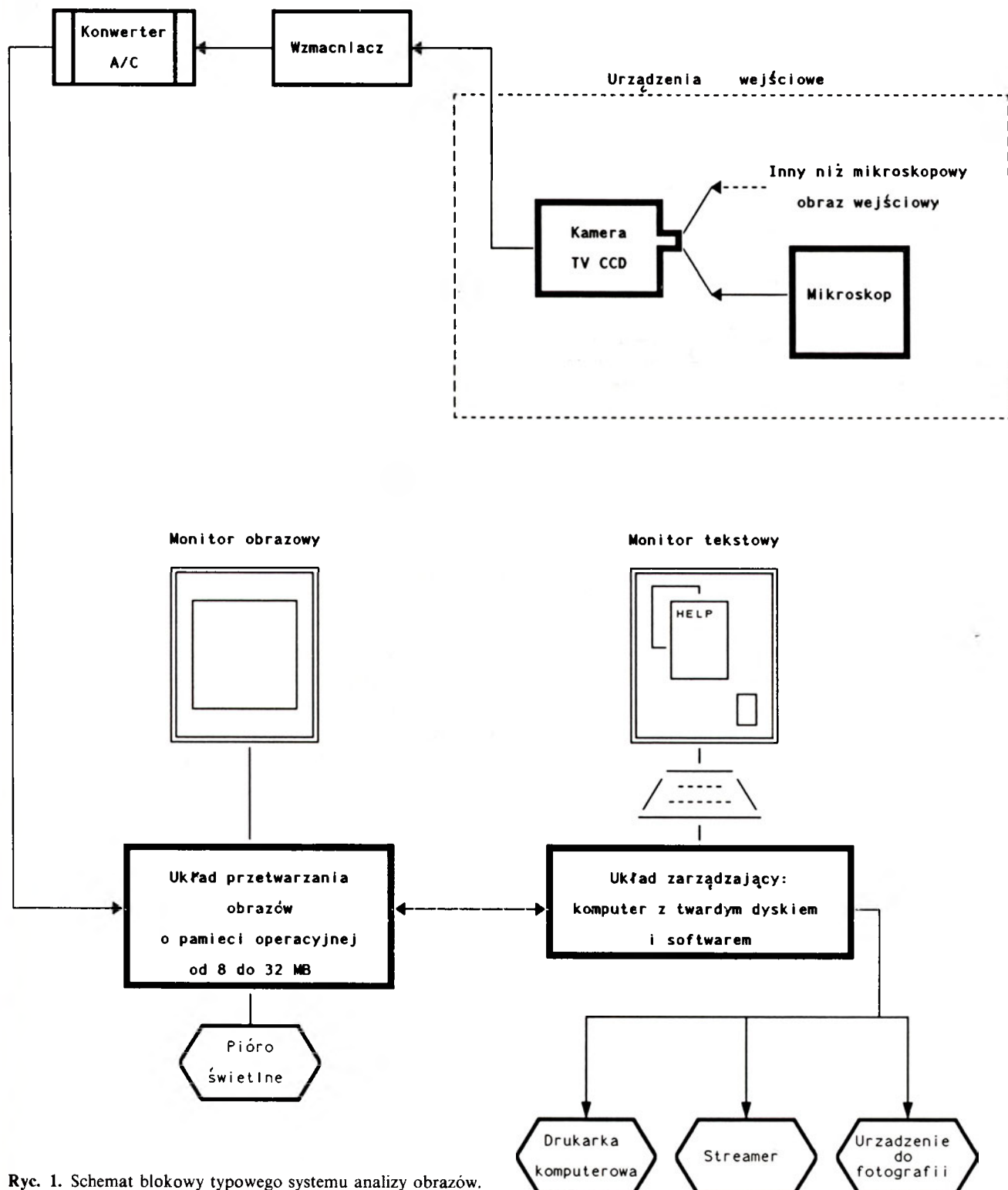
W ostatnich latach nastąpił gwałtowny postęp w produkcji sprzętu przeznaczonego do automatycznej analizy obrazów. Początkowo analiza obrazów opierała się prawie wyłącznie na wzroku ludzkim. Ten system analizujący, utworzony przez układ „oko — mózg” był i jest najbardziej uniwersalnym „aparatem” pozwalającym na analizę obrazów w sposób szybki oraz ciągły. Jego mankamentem jest często mała dokładność, zwłaszcza przy ocenie takich parametrów jak wielkość powierzchni, poziom szarości czy intensywność zabarwienia. Dzięki pojawieniu się sprzętu komputerowego dysponującego dużą pamięcią operacyjną, zdolnego do szybkiego przeprowadzania operacji obliczeniowych, stało się możliwe skon-

<sup>1</sup> mgr fizyki, <sup>2</sup> prof. dr hab. med., Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań.

struowanie urządzeń, w których obraz rejestrowany przez kamerę telewizyjną mógł być dalej opracowywany i oceniany w oparciu o cyfrową technikę obliczeniową. Ponadto powstały realne możliwości badania procesów przyżyciowych zachodzących w komórkach, oparte na rejestracji ciągu następujących po sobie obrazów mikroskopowych i to z szybkością milisekundową. Dzięki temu mogły rozwinąć się nowe techniki badawcze pozwalające na przyżyciową obserwację zmian stężenia i rozmieszczenia jonów  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$  [1]. Wykorzystano w nich indykatory jonów, które po wprowadzeniu do komór-

ki dawały określoną fluorescencję o intensywności zależnej od ich stężenia. Opracowano również metody pozwalające na zastosowanie automatycznego analizatora obrazu jako fotometru [2], który ocenia zmiany gęstości optycznej obrazu w oparciu o analizę stopni szarości rejestrowanych przez kamerę. Dzięki temu zaczęto wykorzystywać go do odczytywania profili elektronogramów, oceny preparatów histologicznych, odczynów histo- i immunohistochemicznych oraz do analizy zmian stężenia jonów.

Analizatory obrazów stwarzają tak szerokie możliwości w naukach przyrodniczych (zwłaszcza w bio-



Ryc. 1. Schemat blokowy typowego systemu analizy obrazów.



logii komórkowej), iż wydaje się uzasadnionym przedstawienie w krótkim zarysie ich budowy i zasady działania.

## II. Opis urządzenia

Schemat obrazujący typowy system analizy obrazów przedstawiono na rycinie 1.

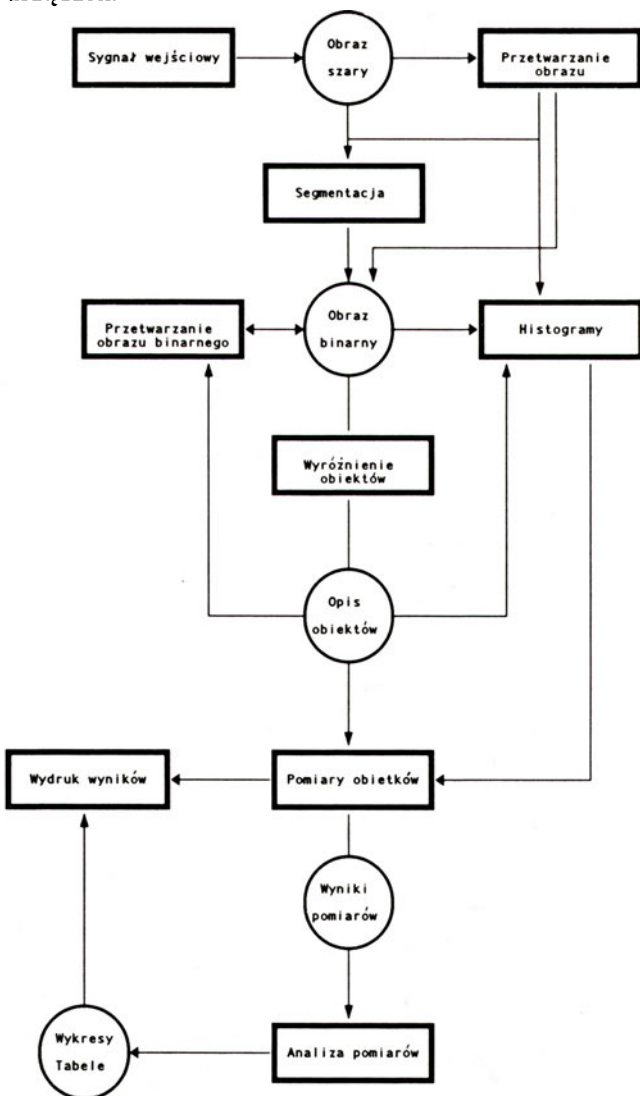
Można w nim wyróżnić następujące części składowe:

**1. Urządzenie wejściowe** — złożone z kamery telewizyjnej (zazwyczaj wysokiej klasy typu CCD) wyposażonej w odpowiednie oprzyrządowanie pozwalające na bezpośrednią rejestrację badanego obrazu (np. zdjęcie mikroskopowo-elektronowe lub elektrofotogram) lub pośrednią poprzez dodatkowe urządzenie optyczne (mikroskop, projektor itp.).

**2. Wzmacniacz** — układ wzmacniający sygnał wideo, pochodzący z kamery telewizyjnej i przekazujący go do następnego etapu opracowywania.

**3. Konwerter A/C** — urządzenie zamieniające wzmożony sygnał analogowy uzyskany z kamery na sygnał cyfrowy możliwy do dalszego przetwarzania w komputerze.

**4. Jednostkę komputerową składającą się z dwóch urządzeń:**



Ryc. 2. Główne etapy automatycznej analizy obrazów.

**a) układu przetwarzania obrazu** (ang. *image processing unit*) czyli jednostki odpowiedzialnej za obróbkę obrazu ukazującego się na ekranie monitora wysokiej rozdzielczości. Pamięć operacyjna takiej jednostki wynosi kilkadziesiąt Megabajtów, co umożliwia analizę wielu obrazów jednocześnie. Często dla uzyskania czytelniejszego i bardziej zróżnicowanego obrazu przypisuje się określonym stopniom jego szarości odpowiednie kolory (zwane pseudo kolorami).

**b) komputera klasy IBM z kartą graficzną stanowiącego układ zarządzający systemem** (ang. *control processor*). Posiada on twardy dysk o dużej pojemności od kilkudziesięciu do kilkuset Megabajtów pamięci, na którym znajdują się pliki z programami użytkowymi systemu, uzyskane dane liczbowe oraz analizowane obrazy.

**5. Pióro świetlne** pozwalające na manualne wydzielenie interesującego fragmentu obrazu przeznaczonego do dalszej analizy.

**6. Urządzenia wyjścia:** zaliczyć do nich należy przede wszystkim drukarkę umożliwiającą wydruk wszystkich danych liczbowych i wykresów oraz pamięć taśmową (ang. *tape streamer*) pozwalającą na archiwizowanie na taśmie magnetofonowej zarówno obrazów jak i danych liczbowych. Ponadto do urządzeń wyjścia zalicza się sprzęt umożliwiający wykonywanie przeźroczy i fotografii bądź „elektronicznych”, bądź z monitora o wysokiej rozdzielczości.

## III. Zasada działania automatycznego analizatora obrazów

W pracy każdego automatycznego analizatora obrazu wyróżnić można pewne stałe etapy [3, 4], których przesłedzenie umożliwia rycina 2.

### 1. Rejestracja i wstępne przetworzenie obrazu

Informacje o obrazie zarejestrowanym przez kamerę przekazywane są w postaci sygnału elektronicznego do dalszego opracowywania przez komputer. Aby było to możliwe, zarejestrowany obraz szary zostaje programowo podzielony, za pomocą regularnej kratki, na określoną ilość równych pól elementarnych (ich liczba jest ograniczona przez zdolność rozdzielczą karty graficznej komputera i najczęściej odpowiada jednej z następującej wartości  $64^2$ ,  $128^2$ ,  $256^2$  lub  $512^2$ ). Takie elementarne pola stają się dla komputera jednostkami obrazu zwanymi pikselami. Każdemu pikselowi przypisane są współrzędne określające jego położenie w analizowanym obrazie oraz wartość odpowiadająca jego poziomowi szarości rejestrowanemu przez kamerę. Dzięki temu obraz może być traktowany przez komputer jako 2-wymiarowa funkcja rozkładu gęstości optycznej, której zbiór wartości reprezentowany jest zazwyczaj przez 64 lub 256 stopni szarości. Może on być bezpośrednio analizowany lub poddany dalszym etapom przetworzenia.

**2. Przeprowadzenie segmentacji obrazu** czyli ustalenie, które jego obszary znajdują się w zakresie zainteresowań, a które mogą być traktowane jako tło. Jednym z najprostszych sposobów realizacji tego etapu jest tzw. progowanie. Operacja ta polega na selekcji wszystkich pikseli obrazu według zadanego kryterium, którym jest ich poziom szarości. Efektem końcowym tego działania, jest obraz binarny, w którym każdemu pikselowi obrazu będącemu w obszarze zainteresowań przypisana zostaje wartość 1, a pozostałym wartość 0.

**3. Podział obszaru zainteresowań na oddzielne obiekty** Innymi słowy jest to dalsza redukcja obszaru zainteresowania do konkretnych pojedynczych obiektów. (Oczywiście istnieją badania, które nie wymagają identyfikowania pojedynczych obiektów i wtedy ten etap analizy zostaje pominięty).

**4. Przeprowadzenie ostatecznych pomiarów wyróżnionych obiektów i ich analiza**

**5. Wydruk uzyskanych wyników w postaci danych liczbowych, wykresów, tabel, histogramów itp.**

Możliwości działania automatycznych analizatorów obrazów związane są z odpowiednim oprogramowaniem komputerowym. Każdy z producentów tych urządzeń przygotowuje je dla własnego sprzętu i tylko na nim może ono być wykorzystane. Mimo dużej różnorodności oprogramowań, ogólne zadania jakie one spełniają są podobne i zostaną tutaj omówione na przykładzie pakietu programów komputerowych automatycznego systemu analizy obrazów zwanego „MAGICAL”<sup>\*1</sup>

#### **IV. Omówienie najważniejszych programów komputerowych automatycznego systemu analizy obrazów MAGICAL** <sup>\*\*2</sup>

1. GENIAS — program pozwalający na analizę obrazów mikroskopowych preparatów biologicznych uzyskanych z mikroskopów optycznych, elektronogramów z mikroskopów elektronowych czy fotografii elektroforetycznych. Przekazany do pamięci operacyjnej komputera obraz można zapisać i przechowywać na twardym dysku. Jest to bardzo wygodne, gdyż, pozwala na wywołanie go w każdej chwili w celu ponownej analizy lub porównania z innymi obrazami. Pojedynczy obraz można poddawać operacjom geometrycznym (odbiciu zwierciadlanemu względem osi OX lub OY, obrotowi o wybrany kąt, przesunięciu o podany wektor, wielokrotnemu powiększaniu) lub transformacjom morfologicznym: dylatacja, erozja, domknięcie, otwarcie, skeletonizacja (ang. *skeletonise*).

<sup>\*1</sup> System ten wyprodukowany został przez angielską firmę Image Applied dawniej Joyce-Loebl. Nadmienić można, iż firm wyspecjalizowanych w chwili obecnej w produkcji analizatorów obrazu jest kilka: np. Cambridge (Wielka Brytania); Numelec (Francja); Zeiss, Leitz, ICN (Niemcy) itd.

<sup>\*\*2</sup> System ten wykorzystywany jest przez autorów artykułu w pracach badawczych prowadzonych w Pracowni Cytofizjologii Katedry Histologii i Embriologii AM w Poznaniu.

Opcje jednoczesnej analizy dwóch różnych obrazów umożliwiają wykonywanie na nich działań arytmetycznych (tworzenie sumy obrazów, ich różnicy, ilorazu oraz iloczynu) oraz operacji Booleanowskich.

Jednym z najtrudniejszych i najzwyklejszych etapów analizy obrazu jest segmentacja polegająca na poddawaniu obrazu szeregu operacjom prowadzącym do wyróżnienia w jego obrębie istotnych dla badającego struktur. Granice między badanym obiektem a tłem nie zawsze są dostatecznie wyraźne i dlatego program uruchamia działanie operatorów zwanych filtrami, które pomagają między innymi zwiększyć lub zmniejszyć kontrast, wyostrzyć brzegi badanej struktury lub usunąć te elementy obrazu, które nie są dla badacza istotne. Po dokonaniu segmentacji obrazu, komputer mierzy automatycznie takie parametry wszystkich wyróżnionych obiektów jak: pole powierzchni, obwód, współczynnik kształtu, średnice Fereta, środek ciężkości, odległość najdalszych punktów, elongację; może także wykreślić histogram poziomów szarości danego obiektu. Wszystkie wartości liczbowe z pomiarów mogą być przechowywane na twardym dysku lub wydrukowane. Ponadto istnieje możliwość opracowania przez użytkownika programów realizujących stawiane przez niego zadania.

2. TARDIS — program pozwalający na rejestrację sekwencji obrazów zmiennych w czasie. Analizator może rejestrować w dowolnych interwałach czasowych zmiany w 504 różnych obrazach uzyskiwanych np. z mikroskopu optycznego.

Najcenniejsze dla rejestracji procesów zmiennych w krótkim czasie są dwa sposoby: — pozwalający na rejestrację 5 obrazów w każdej sekundzie, pierwszy (*stepping mode*) oraz — pozwalający na rejestrację 25 obrazów w sekundzie, drugi sposób (*video mode*). Program ten może być wykorzystany do obserwacji i analizy zmian stężenia szeregu jonów wewnątrz żywych komórek. Najczęściej jest on stosowany do badania jonów  $Ca^{2+}$ . W tym przypadku wprowadza się do komórki fluorochrom Fura 2/AM [5, 6]. Cechą charakterystyczną tego fluorochromu jest wzbudzenie się przy dwóch różnych długościach światła (340 nm i 380 nm) w zależności od kompleksowania lub nie, jonów wapniowych. Pozwala to uniknąć szeregu błędów występujących przy fluorochromach o jednej długości wzbudzenia. Rejestracja z odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego sekwencji par obrazów otrzymanych przy dwóch różnych długościach wzbudzających pozwala, dzięki opcjom programu, prześledzić zmiany w stężeniu i rozmieszczeniu jonów wapniowych w komórkach poddanych działaniu różnorodnych czynników [7, 8, 9]. System umożliwia obserwację na ekranie monitora zarejestrowanych przemian w zwolnionym tempie oraz pełną ich archiwizację.

3. RESULTS — program ten odczytuje z twardego dysku pliki z danymi liczbowymi uzyskanymi w trak-

cie pracy z innymi programami systemu Magical i opracowuje je statystycznie. Podstawowe jego opcje to obliczanie wartości średniej i odchyłeń standardowych serii pomiarów, weryfikacja danych z wykorzystaniem testów statystycznych takich jak:  $\text{CHI}^2$ , T-Studenta, Mann'a-Whitney'a itp. oraz graficzne przedstawienie wyników i ich wydrukowanie.

Analiza obrazów przy użyciu komputerowego ich przetwarzania jest obecnie wszechstronnie stosowaną techniką. Nie tylko usprawnia ona ocenę dużej liczby obiektów poprzez automatyzację ich pomiarów, ale również umożliwia archiwizację obrazów na dyskach lub taśmach magnetycznych. Wyniki analiz przedstawione w postaci tabel liczbowych lub odpowiednich wykresów ułatwiają ich interpretację. Przypuszczać można, że urządzenia te w niedalekiej przyszłości zaliczane będą do podstawowego wyposażenia pracowni biologii komórki.

*Artykuł otrzymano 19 maja 1992 r.  
Zaakceptowano do druku 4 czerwca 1992 r.*

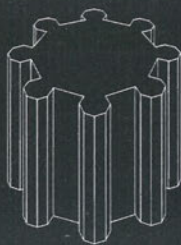
## Piśmiennictwo

1. Moore EDW, Becker PL, Fogarty KE, Williams DA, Fay S (1990) *Cell Calcium* **11**: 157-159
2. Baak JPA (1991) *Quantitative Pathology in Cancer Diagnosis and Prognosis*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona
3. (1989) *Image Analysis: Principles and Practice*. Published by Joyce Loebble Ltd
4. Matyka A (1991) *Elementy cyfrowego przetwarzania i analizy obrazów*, PWN Warszawa—Łódź
5. Roe MW, Lemasters JJ, Herman B (1990) *Cell Calcium* **11**: 63-73
6. Ryan TA, Millard PJ, Webb W (1990) *Cell Calcium* **11**: 145-156
7. Marks PW, Maxfield FR (1990) *Cell Calcium* **11**: 181-190
8. Virgilio FD, Steinberg TH, Silverstein SC (1990) *Cell Calcium* **11**: 57-62
9. Monck JR, Oberhauser AF, Keating TJ, Fernandez J (1992) *J Cell Biol* **116**: 745-759





THE INTERNATIONAL UNION  
OF BIOCHEMISTRY  
AND MOLECULAR BIOLOGY

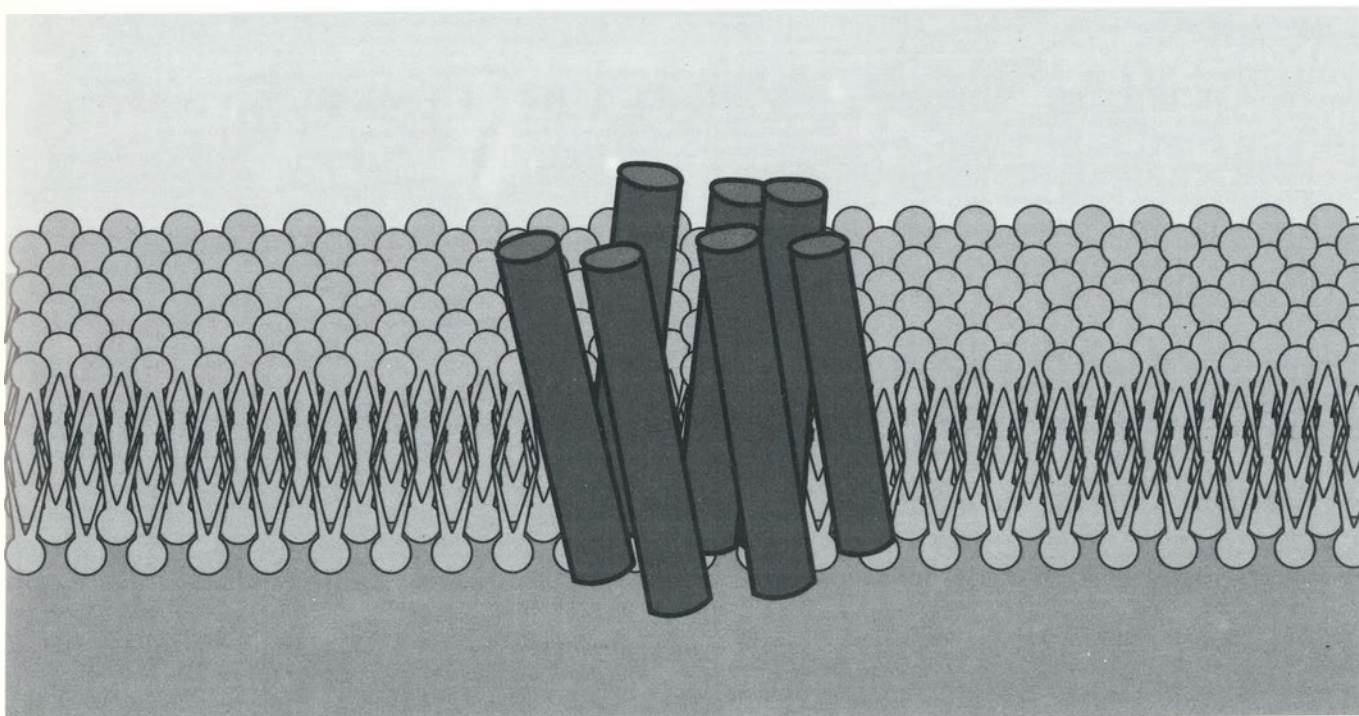


SOCIETA'  
ITALIANA  
DI BIOCHIMICA

2nd IUBMB Conference

# BIOCHEMISTRY OF CELL MEMBRANES

September 29 - October 3 1993  
Bari, Italy



*Post card*

AIRMAIL

Place  
Stamp  
Here

To: The Secretariat  
2nd IUBMB Conference  
c/o Centro Internazionale Congressi  
Viale Papa Pio XII, 18  
70125 Bari, Italy

<http://rcin.org.pl>

# Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

## Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

**TEKST:** Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

**Strona informacyjna** maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim

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

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

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

**PIŚMIENICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe. np. [3,7,9,—26]. Odnośniki bibliograficzne winny mieć nową uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanej przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

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

**ILUSTRACJE:** Ryciny winny być gotowe do reprodukcji. Fotografie czarno-białe (kontrastowe), powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wskazane jest, aby ryciny były dwukrotnie większe od przyszłej reprodukcji, tj. w skali 2:1. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, rycin, czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „gó-ra-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,  
ul. Pasteura 3,  
02-093 Warszawa