

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

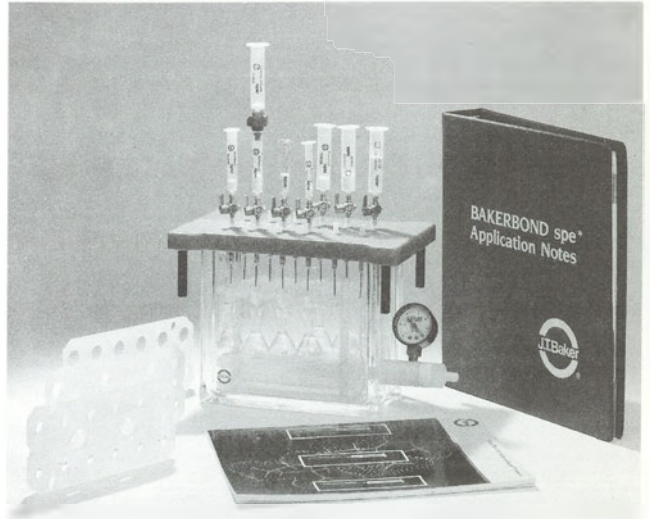
PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 37, NR 2, 1991

<i>In vivo</i> role of CSF-1 in hemopoiesis . . . . .	54
Niedobór mięśniowej AMP-deaminazy . . . . .	58
Rodzina genów <i>hsp</i> 70 . . . . .	62
Białka GRP78, GRP95 . . . . .	70
Układ grupowy Gerbich . . . . .	75
Mechanizm działania endonukleazy Eco RI . . . . .	82
Nefrotoksyczne działania antybiotyków . . . . .	92
Fitoaleksyny a odporność roślin . . . . .	104
Izoenzym- $\gamma\gamma$ enolazy . . . . .	112
Prenumerata . . . . .	120
Bio-telefony . . . . .	okładka

## Przejrzyste przygotowanie próbek: metoda BAKER spe J.T.Baker 12 próbek jednocześnie



Przygotowanie próbek metodą BAKER spe przebiega szybko, odtwarzalnie i ekonomicznie. Prawie dla każdej próbki można dobrać odpowiednią kolumnę rozdzielczą spe, wypełnioną fazą stałą, analityczną. Szczegółowe świadectwo analizy znajduje się w każdym opakowaniu. Metoda jest prezentowana w ponad 300 pozycjach literatury i przepisach postępowania, dostępnych na życzenie. Przy zakupie systemu BAKER spe otrzymuje się podręcznik „Solid Phase Extraction for Sample Preparation” i zbiór „BAKERBOND spe Application Notes”, bezpłatnie.

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

ZO/133/90-P



**Zawsze jednakowo wysoka jakość.**

Najważniejszą sprawą dla analityka jest gwarancja powtarzalności. Musi ona cechować każdy etap postępowania analitycznego a najwięcej błędów popełnia się w czasie przygotowania próby. Kolumnki ze znakiem BAKERBOND spe są zawsze sprawdzane wg jednoznacznych ścisłych kryteriów. Każde opakowanie kolumnki ma własne świadectwo kontroli jakości „Analysen-Report”. Dlatego też nie ma problemu z powtarzalnością, jeżeli stosuje się kolumnki do oczyszczania prób BAKERBOND spe. Dowód wysokiej powtarzalności otrzymuje do ręki każdy użytkownik. Daje mu on gwarancję dokładności analiz i pewność uzyskanych wyników.

Więcej informacji na ten temat można uzyskać:  
EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, skr. poczt. 46,  
90-980 Łódź-7, tel. 81 31 40, tlx 88 53 67 zab, fax 81 52 83  
(Skład celny ul. Tylna 3)

ZO/133/90-K



## WYDAWCA

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

Oficyna wydawnicza  
BIO-TEXT sp. z o. o.  
Dantego 1/49  
01-914 Warszawa

## REDAKCJA

Editorial Board

### REDAKTOR NACZELNY

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

### REDAKTORZY

Editors  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 49-04-15  
JACEK KUŹNICKI  
tel. 659-85-71  
fax: (22) 22-53-42  
BOŻENA SZYMANOWSKA

### RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
STEFAN ANGIELSKI  
(Gdańsk)  
MAGDALENA FIKUS  
(Warszawa)  
MACIEJ GARSTKA  
(Warszawa)  
JERZY KOŚCIELAK  
(Warszawa)  
JACEK KUŹNICKI  
(Warszawa)  
JANINA  
KWIATKOWSKA-KORCZAK  
(Wrocław)  
ANNA SZKOPIŃSKA  
(Warszawa)  
LESZEK TOMASZEWSKI  
(Warszawa)  
LIDIA WASILEWSKA  
(Warszawa)

## ADRES REDAKCJI

Address  
REDAKCJA  
"POSTĘPÓW BIOCHEMII"  
INSTYTUT BIOLOGII  
DOŚWIADCZALNEJ  
m. M. Nenckiego PAN  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa  
tel. (2) 659-85-71 w.209  
fax: (22) 22-53-42  
telex: 81-48-92

## Spis treści Contents

<b>Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1) and its in vivo role as delineated using osteopetrotic op/op mice</b> WIESŁAW WIKTOR-JĘDRZEJCZAK . . . . .	54
<b>Niedobór mięśniowej AMP-deaminazy</b> Myoadenylate Deaminase deficiency KRYSTIAN KALETHA, GRZEGORZ NOWAK, KRYSTIAN ANDRYCH, WIESŁAW MAKAREWICZ . . . . .	58
<b>Struktura i ekspresja genów należących do rodziny genów szoku termicznego <i>hsp 70</i></b> Structure and expression of genes of the heat-shock gene family <i>hsp 70</i> ZDZISŁAW KRAWCZYK . . . . .	62
<b>Struktura, regulacja ekspresji i funkcja białek siateczki śródplazmatycznej GRP78 i GRP95</b> Structure, expression, regulation and function of the endoplasmic-reticulum GRP78 and GRP95 proteins ZDZISŁAW KRAWCZYK . . . . .	70
<b>Molekularne i genetyczne podstawy układu grupowego Gerbich ludzkich erytrocytów</b> Molecular and genetics basis of blood-group Gerbich system of human erythrocytes EWA JAŚKIEWICZ . . . . .	75
<b>Zastosowanie zmodyfikowanych oligonukleotydów w badaniach nad mechanizmem działania endonukleazy Eco RI</b> Application of modified oligonucleotides in the studies on the mechanism of Eco RI endonuclease action MARIA KOZIOLKIEWICZ . . . . .	82
<b>Biochemiczne podstawy nefrotoksycznego działania antybiotyków aminoglikozydowych</b> Biochemical aspects of aminoglycoside nephrotoxicity MARIUSZ MICHALIK . . . . .	92
<b>Rola fitoaleksyn w naturalnej odporności roślin</b> Phytoalexins in natural plant resistance ANNA SZAKIEL . . . . .	104
<b>Biochemiczna charakterystyka izoenzymu—<math>\gamma\gamma</math> enolazy i jego znaczenie diagnostyczne</b> Isoenzyme— $\gamma\gamma$ of enolase - biochemical properties and its role in diagnosis ELŻBIETA KULIG . . . . .	112
Sprawozdanie z II Międzynarodowego Sympozjum "Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases" . . . . .	90
Warunki prenumeraty . . . . .	120

# Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1) and its *in vivo* role as delineated using osteopetrotic *op/op* mice

WIEŚLAW WIKTOR-JĘDRZEJCZAK<sup>1</sup>

## Contents:

- I. Introduction
- II. Biochemical characterization of CSF-1
- III. Biochemical properties of CSF-1 receptor
- IV. The *in vivo* role of CSF-1 in hemopoiesis as delineated using the *op/op* mice
- V. Possible extra-hematopoietic role of CSF-1 as evaluated using the *op/op* mice
- VI. Distance and developmental limits to the action of CSF-1
- VII. Concluding remarks

## I. Introduction

Colony stimulating factor-1 (CSF-1), also termed macrophage colony stimulating factor (M-CSF), was identified as a functional activity of various materials to support macrophage colony formation by hemopoietic cells *in vitro* [1]. Its major sources at the time were postendotoxin mouse serum, pregnant-mouse uterus extract, and human urine [2]. Moreover, one of the first established lines of murine fibroblasts: L929 cell line was found to release its activity, to the medium in high levels, which helped in biochemical characterization [3].

All these materials used in crude form contained amounts of CSF-1 high enough to produce macrophage colony formation. The factor was then purified from the L-cell conditioned medium and used to produce specific antibody and to establish a specific and sensitive radioimmunoassay [4]. Using this latter technique the presence of the factor in virtually each tissue of the body was documented. Biochemical characterization of the factor allowed to clone its gene [5, 6, 7] and subsequently to produce the protein in recombinant form. Independently, it was found that one of protooncogenes: *c-fms* codes for the receptor for CSF-1 [8].

However, the *in vivo* physiological role of CSF-1 was still difficult to assess, particularly in the context of simultaneous presence in the body of other molecules with overlapping activities such as granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin 3 (IL-3). Recent identification that mice, mutant at the *op* locus, are totally devoid of CSF-1 [9] dramatically changed this situation making available a unique experimental model.

## II. Biochemical characterization of CSF-1

CSF-1 is a homodimer glycoprotein of molecular weight varying from 45 kDa to 90 kDa [3]. Human CSF-1 gene sequence encodes 554 aminoacids, while the murine one 552 aminoacids. This includes 32-aminoacid signal peptide, and hydrophobic sequence of 23-aminoacids near the carboxy terminus [10], which are not present in mature protein.

CSF-1 is synthesized as an integral transmembrane glycoprotein (70 kDa) which is rapidly dimerized by disulfide bond. Subsequently, during transport in secretory vesicle of Golgi apparatus, it is glycosylated. It may be then, either proteolytically cleaved at the carboxyterminal residue and released from cell, or expressed on cell surface as a cell bound form. This latter protein form may also undergo shedding, and be released this way into cell vicinity.

There is evidence that these variable ways of production, and release of mature protein are determined on the DNA level.

Clones of mRNA and cDNA of different length were isolated and all code for functional proteins. These include 1.6 kb, 2.0 kb, 2.3 kb and the most prevalent 4.0 kb clone [5-7, 10] Interestingly, it appears that surface bound CSF-1 form which is slowly cleaved to medium is produced by 1.6 kb species, while rapidly released CSF-1 is produced by 4.0 kb species.

Gene for murine CSF-1 which is 21 kb in length comprises of 10 exons and is located on chromosome 3 [11]. This chromosomal location is unexpected as human CSF-1 gene is located in so called growth factor gene cluster on chromosome 5 along with gene coding for CSF-1 receptor [7, 11]. The murine growth factor gene cluster is on chromosome 11.

Otherwise human and murine CSF-1 genes are very similar and there is large homology in sequence, which reaches 82% for parts coding for soluble factors. All mRNA species contain sequences of exons 1 through 5 in the same order. Heterogeneity is conferred by differential splicing of exon 6 and the alternate use of exons 9 and 10. The 4 kb clone contains all the sequence of exons 6 and 0. The 2.3 kb clone contains all the sequence of exons 6 and 9. Differential splicing of exon 6 together with utilization of exon 9 results in production of either 2.0 kb mRNA or 1.6 kb mRNA.

Coding sequence is on exons 1 through 8. When the shortest 1.6 kb cDNA was further truncated by a mutation introduced after codon 158 it still produced

<sup>1</sup> Prof. dr hab. med. Department of Immunology, Central Clinical Hospital, Military School of Medicine, 00-909 Warsaw 60, Poland.

active protein suggesting that the residues 1-158 represent the biologically active portion of the molecule.

Identification that the *op/op* mouse has no bioactive CSF-1 [8, 12] strongly suggested that this mutation in fact affects the CSF-1 gene. This suggestion was strengthened by the aforementioned finding that CSF-1 gene in the mouse is located in the same region of chromosome 3 as the *op* locus [13]. Subsequently, Yoshida et al. [14] have established the presence of a point mutation in the coding region of CSF-1 gene in the *op/op* mouse. This mutation apparently has arisen by a duplication of a thymidine in the position 261 downstream from the ATG initiation codon (corresponding to the aminoacid 56 of mature protein). Such insertion is changing the reading frame and subsequently the aminoacid sequence for several codons until 21 bp further downstream, where TGA stop codon appears [14].

Interestingly, this mutation prevents formation of 2.3 kb mRNA, but not 4 kb RNA [9]. However, even this 4 kb RNA which is present in *op/op* mice is not able to form any active protein [9].

### III. Biochemical properties of CSF-1 receptor

The CSF-1 receptor is identical to the *c-fms* proto-oncogene product. The molecule was originally identified as a product of an oncogene of the *McDonough* strain of feline sarcoma virus [15]. Then structural analysis has provided evidence that this molecule is similar to the known growth factor receptors sharing with them tyrosine kinase activity [15]. Subsequently, it was found that in adult mammals it is expressed exclusively on cells of mononuclear phagocyte lineage and that it is in fact a CSF-1 receptor [16]. Additionally, its presence was observed on trophoblast and placenta and on related cell lines.

CSF-1 receptor is a large 165 kDa protein, which besides having tyrosine kinase activity belongs to the immunoglobulin family of cell communication proteins. There is only one class of such CSF-1 receptors known and they possess high affinity for this growth factor [15, 16, 17]. There is neither indication of CSF-1 receptor deficiency in the *op/op* mouse nor is the deletion mutation of this receptor known in the mouse. The importance of knowing which cells bear these receptors, lies in their determination of the range of cells, that can directly respond to CSF-1. Additional information on CSF-1 receptor, as being beyond the scope of this article, is available in several reviews [15, 16].

### IV. The *in vivo* role of CSF-1 in hemopoiesis as delineated using the *op/op* mice

The *op/op* mouse was originally identified because of the presence of congenital osteopetrosis i.e. a disorder in which normal marrow cavities do not develop due to the fact that bone resorption and remodelling is deficient compared to the bone formation. These mice were found to be almost completely devoid of osteo-

clasts, to possess weight deficiency throughout the lifespan, and to be toothless [18].

Subsequently, we have identified a severe deficiency of macrophages in these mice and related this phenomenon to the inability of stromal fibroblastoid cells to produce macrophage colony forming activity [19]. Simultaneously, normal macrophage progenitors were observed in these mice [19].

Finally, a total absence of any biologically active form of CSF-1 was established [9, 12], and moreover, mutant phenotype was reverted by exogenous natural or recombinant CSF-1, [9, 20, 21, 22].

This allows us to assume that the pattern of abnormalities observed in the *op/op* mouse determines the *in vivo* scope of physiological activities of this molecule. More precisely, it defines these activities which cannot be substituted for by other functionally related molecules.

As mentioned, colony stimulating factor-1 was identified as one of the molecules supporting the formation of macrophage colonies by normal murine marrow cells *in vitro*, hence its another name: macrophage colony stimulating factor (M-CSF). Pattern of macrophage deficiencies in the *op/op* mouse fully substantiates this latter name. However, these deficiencies are neither absolute nor similar in different organs. Thus, resident macrophages are totally absent in the bone marrow, reduced to about 5% in peritoneal cavity similarly as monocytes in peripheral blood. Whereas, macrophage numbers in liver and spleen are reduced to only about 30% of the normal (Wiktor-Jędrzejczak et al. in preparation), a number of skin macrophages was recently reported to be normal [12]. This suggests that local macrophage dependency on CSF-1 is differential and depends on location. Such situation may suggest that other locally available macrophage growth factors may substitute for CSF-1 and allow for production of functionally active macrophages. In fact, increased production of GM-CSF and increased potential for production of IL-3 and interleukin 2/4 was observed in the *op/op* mouse [9]. Therefore, most likely GM-CSF and IL-3 may at least partly compensate for the absence of CSF-1. This suggests that, in the mouse there are *in vivo* at least two major maturation pathways leading to the production of functional macrophages: CSF-1 dependent and CSF-1 independent, and only the first one is deficient in the *op/op* mice.

Macrophage progenitors and hemopoietic stem cells (as measured using colony forming unit in the spleen: CFU-S assay) are present in the *op/op* mice in large numbers [9, 19] which suggests that CSF-1 does not play a critical role in the generation and maintenance of their population sizes.

In contrast to many studies done *in vitro*, where osteoclast-like cells were formed only under influence of GM-CSF and not CSF-1, [23, 24, 25] both the therapeutic success of CSF-1 in *op/op* mice and their disease pattern (osteopetrosis related to the apparent absence of osteoclasts) suggests the essential role of CSF-1 in osteoclastogenesis. This two partly contrasting observations may be explained by the hypothesis that in osteoclastogenesis CSF-1 acts prior GM-CSF,

which would be in contrast to the formation of macrophages where it is well established that GM-CSF stimulates more primitive progenitors than CSF-1.

Therefore, the common hypothesis that emerges from these studies is that although osteoclast lineage is related to the macrophage lineage, there may also be an important difference, which is an absolutely critical presence of a CSF-1 dependent early progenitor/precursor cells for osteoclasts.

## V. Possible extra-hematopoietic role of CSF-1 as evaluated using the *op/op* mice

Female *op/op* mice can become pregnant and deliver progeny [18, J. W. Pollard, J. Hunt, W. Wiktor-Jędrzejczak, E. R. Stanley, manuscript in preparation]. This observation seems to be in contrast to the conclusions of earlier studies, which have shown a 1000-fold elevation of uterine CSF-1 during gestation and the presence of CSF-1 receptor on trophoblast in addition to macrophages [26, 27]. These latter studies suggested a critical and specific role of CSF-1 in placental development. One possible initial explanation was that 2.3 kb CSF-1 mRNA, which is partly specific for CSF-1 production in this location through alternative splicing phenomenon omits the block produced by the *op* mutation and allows for local production of protein. This was proven not to be true (J. W. Pollard, personal communication) and no CSF-1 is available in *op/op* also in the uterus.

However, the mice are severely compromised both in their pregnancy rate, litter size and ability to foster progeny [J. W. Pollard, J. Hunt, W. Wiktor-Jędrzejczak, E. R. Stanley, manuscript in preparation] which is compatible with the notion that CSF-1 in fact plays an *important* role in placental development but that similarly as in the case of macrophage production this role may be partly compensated for by other factors. Interestingly, treatment with exogenous CSF-1 does not seem to correct this deficiency, which suggest that this function of CSF-1 is under local control and not under control of systemic level of CSF-1 which is corrected by injection.

Marks and Lane [18], while describing the *op/op* mouse for the first time, have identified a profound weight deficiency in animals of both sexes throughout the whole lifespan. With establishing that the disease can be traced to the absence of a single functional molecule, namely CSF-1, it became clear that this molecule also directly or indirectly regulates body growth probably also affecting some other metabolic processes. In fact, treatment of *op/op* mice with recombinant CSF-1, among other effects, leads also to weight gain. In contrast, normal mice receiving similar doses of CSF-1 in addition to their endogenous CSF-1 production loose weight (Wiktor-Jędrzejczak et al. in preparation for publication). These findings even more strongly suggest that CSF-1 belongs to the group of hormones regulating body growth such as somatotropine, insulin etc.

However, since there is no corresponding pattern of CSF-1 receptor expression which would explain such a direct role of CSF-1, it appears that CSF-1 may act as a master hormone, which determines the level of production of another molecule (molecules) that are more directly responsible for such effects.

Early trials with recombinant human CSF-1 both in rabbits and in man have shown as an unexpected result hypocholesterolemia [28]. This suggested direct or indirect role of CSF-1 in regulating also lipid metabolism. In fact, Marks and Lane [18] observed in the residual bone marrow of *op/op* mice enigmatic lipid masses. Similarly, during culture of bone, bone marrow, skin and peritoneum *op/op* fibroblasts, in contrast to *+/+* (normal) fibroblasts, amazingly frequently an adipoid transformation occurs [Wiktor-Jędrzejczak, unpublished observations]. In agreement with these notions *op/op* mice have a very significant increase in the serum level of LDL bound cholesterol. Moreover, they have similarly significant decrease in serum triglyceride level (Wiktor-Jędrzejczak) et al. in preparation for publication). When this evidence is put together it suggests an important role of CSF-1 in regulating lipid metabolism. Of course, exact mechanisms of action, possible intermediary steps etc. are all subject to future investigation.

All these studies suggest that CSF-1 should not be any longer regarded as just macrophage progression factor (i.e. factor responsible for maturation of end stages of macrophage lineage, and their functional activator) but rather as a hormone with multiple functions.

## VI. Distance and developmental limits to the action of CSF-1

Cell communication molecules can be divided depending on a distance between cells releasing given molecule and cells responding to this molecule. When molecule released in one or more places in the organism is transported via blood to cells in many other places, it acts in *endocrine* fashion. When molecule acts on responding cells present in the vicinity of producing cells, it acts in *paracrine* fashion. Finally, when molecule acts on the same cell which produces it, then such molecule acts in *autocrine* fashion. CSF-1 acts in all these ways.

First of all, CSF-1 is one of a few in the large battery of cytokines affecting hemopoietic cells, that are constantly detectable in peripheral blood. It is also a major hemopoietic growth factor released in response to endotoxin. However, therapeutic experiments with recombinant human CSF-1 in the *op/op* mice suggest, that not all CSF-1 functions are mediated by circulating CSF-1, corrected by CSF-1 injections. Injected human CSF-1 initiates bone resorption and eventually produce teeth eruption and normal remodelling of the skeleton. On the other hand, peritoneal and pleural cavity macrophages are affected only by very large doses of exogenous CSF-1, except when the factor is administered directly to the respective location. This suggests that in contrast to the bone marrow

macrophages and osteoclasts, being under central CSF-1 control, peritoneal and pleural macrophages were locally regulated by CSF-1. The same is most probably true for the CSF-1 role in placental development, since the litter size, and pregnancy rate are not corrected in CSF-1 treated *op/op* mice. On the other hand, body growth is at least partly corrected in CSF-1 treated *op/op* mice which suggests that it is under control of circulating level of this hormone.

Furthermore, induced monocytes and macrophages were shown to produce CSF-1 themselves [29, 30]. Since, these cells simultaneously possess CSF-1 receptors and are capable to respond to this molecule this is an autocrine regulatory mechanism. Its real role *in vivo* remains hypothetical. It may be theoretized, that it is important for activated macrophage migrating to the focus of infection to self-stimulate, in order to help to maintain activated state, and subsequently greater bacteria clearing efficiency of this cell.

Certain effects of CSF-1 are not only dependent on local versus systemic availability. The 1000-fold increase in uterine CSF-1 during gestation is specific for gestation and is induced by a concomitant increase in progesterone and estradiol. In the *op/op* mice tooth eruption and normal development of skeleton can only be effected when CSF-1 is administered during first 10 days of postnatal life. This suggest also a precise role of this factor during ontogeny.

## VII. Concluding remarks

CSF-1 belongs to those growth factors that are highly conserved in phylogeny, and as mentioned earlier human recombinant CSF-1 is fully active *in vivo* and *in vitro* in murine systems including the *op/op* mouse as well as in many other species such as rat or rabbit. This suggests that conclusions reached concerning the physiological role of CSF-1 using the *op/op* mouse have more general application including also man.

Artykuł otrzymano 25 marca 1991r.

Zakceptowano do druku 4 kwietnia 1991r.

Acknowledgements. Studies reported in this review were partly supported by a grant from Polish Academy of Sciences. Author is grateful to Drs. Elżbieta Urbanowska and Małgorzata Szperl for help in maintaining the colony of *op/op* mice, and for collaboration in experiments involving recombinant human CSF-1. Author thanks Dr. Elżbieta Bartnikowska for assistance in studies of lipid metabolism in *op/op* mice. Expert technical and editorial assistance of Halina Szewczyk and Grzegorz Dźwigala is greatly appreciated.

## References

- Stanley E. R., Guilbert L. J., Tushinski R. J., Bartelmez S. H. (1983), *J. Cell. Biochem.*, **21**, 151-159.
- Metcalf D. (1984), *Clonal culture of hemopoietic cells: techniques and applications*. Elsevier, Amsterdam.
- Stanley E. R., Heard P. (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4305-4312.
- Stanley E. R. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2969-2973.
- Kawasaki E. S., Ladner M. B., Wang A. M., VanArsdell J., Warren K. H., Coyne M. Y., Schweickart

- V. L., Lee M.-T., Wilson K. J., Boosman L. A., Stanley E. R., Ralph P., Mark D. F. (1985) *Science*, **230**, 291-296.
- Rajavashisth T. B., Eng R., Shadduck R. K., Waheed A., BeuAvram C. M., Shirely J. E., Lusic A. J. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1157-1161.
- Ralph P., Sampson-Johannes A. (1990), *Hematopoietic Growth Factors in Transfusion Medicine*, A.R. Liss, New York, in press.
- Rettenmier C. W., Roussel M. F., Sherr C. J. (1988), *J. Cell Sci Suppl.* **9**, 27-44.
- Wiktor-Jędrzejczak W., Bartocci A., Ferrante A. W. Jr, Ahmed-Ansari A., Sell K. W., Pollard J. W., Stanley E. R. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4828-4832.
- Baccarini M., Stanley E. R. (1990) Habenicht A. (red.), *Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines*, Springer, Berlin, 188-200.
- Gisselbrecht S., Sola B., Fichelson S., Bordere-anx D., Tambourin P., Matei M.-G., Simon D., Guenet J.-L. (1989), *Blood*, **73**, 1742-1746.
- Felix R., Cecchini M. G., Hafstetter W., Elford P. R., Stutzer A., Fleisch H. (1990), *J. Bone Min. Res.*, **5**, 781-789.
- Davison M. T., Roderick T. H. (1985), *Mouse News Lett.*, **73**, 7-8.
- Yoshida H., Hayashi S.-I., Kunisada T., Ogawa M., Nishikawa S., Okamura H., Suda T., Schultz L. D., Nishikawa S.-I. (1990), *Nature*, **345**, 442-444.
- Hampe A., Gobet M., Sherr C. J., Galibert F. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 85-89.
- Sherr C. J., Rettenmier C. W. (1986), *Cancer Surv.*, **5**, 221-232.
- Yeung Y. G., Jubinsky P. T., Sengupta A., Yeung D. C. Y., Stanley E. R. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1268-1271.
- Marks S. J. Jr, Lane P. W. (1976), *J. Hered.*, **67**, 11-18.
- Wiktor-Jędrzejczak W., Ahmed A., Szczylik C., Skelly R. R. (1982), *J. Exp. Med.*, **156**, 1516-1527.
- Wiktor-Jędrzejczak W., Urbanowska E., Aukerman S. L., Stanley E. R., Ralph P., Ansari A. A., Sell K. W., Szperl M. (1990), *Blood*, **76**, 171A.
- Felix R., Cecchini M. G., Fleisch H. (1990), *Endocrinology*, **127**, 2592-2594.
- Kodama H., Yamasaki A., Nose M., Niida S., Ohgame Y., Abe M., Kumegawa M., Suda T. (1991), *J. Exp. Med.*, **173**, 269-272.
- Vandewijngaert F., Tas M. C., VanderMeer J. W. M., Burger E. H. (1987), *Bone Miner.*, **3**, 97-110.
- Hattersley G., Dorey E., Horton M. A., Chambers T. J. (1988), *J. Cell Physiol.*, **137**, 199-203.
- MacDonald B. R., Mundy G. R., Clark S., Wang E. A., Kuchl T. J., Stanley E. R., Roodman G. D. (1986), *J. Bone Mineral Res.*, **1**, 227-233.
- Pollard J. W., Bartocci A., Arceci R., Orlofsky A., Ladner M. B., Stanley E. R. (1987), *Nature (Lond.)*, **330**, 484-486.
- Bartocci A., Pollard J. W., Stanley E. R. (1986), *J. Exp. Med.*, **164**, 956-961.
- Garnick M. B., Stoudemire J. B. (1990), *Int. J. Cell Cloning*, **8**, 356-373.
- Horiguchi J., Warren M. K., Kufe D. (1987), *Blood*, **69**, 1259-1261.
- Rambaldi A., Young D. C., Griffin J. D. (1987), *Blood*, **69**, 1409-1413.

## Od redakcji

Artykuł W. Wiktora-Jędrzejczaka jest drugim mini-review publikowanym w „Postęпах Biochemii” w języku angielskim. Oba artykuły przedstawiają wyniki prac prowadzonych w Polsce, które mogą być interesujące dla czytelników za granicą.

# Niedobór mięśniowej AMP-deaminazy

## Myoadenylate Deaminase deficiency

KRYSTIAN KALETHA<sup>1</sup>

GRZEGORZ NOWAK<sup>2</sup>

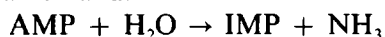
KRYSTIAN ADRYCH<sup>3</sup>

WIESŁAW MAKAREWICZ<sup>4</sup>

Praca dedykowana pamięci Profesora Włodzimierza Mozołowskiego (1895-1975)

AMP-deaminaza (AMP-aminohydrolaza; EC 3.5.4.6) jest enzymem cytoplazmatycznym, występującym powszechnie w tkankach zwierzęcych. W mięśni szkieletowym aktywność enzymu jest szczególnie wysoka: jeden, dwa rzędy wielkości wyższa aniżeli w pozostałych tkankach [1].

AMP-deaminaza katalizuje reakcję nieodwracalnej, hydrolitycznej deaminacji kwasu adenylowego (AMP) do kwasu inozynowego (IMP) z uwolnieniem cząsteczki amoniaku:



Badania histochemiczne wykazały, że enzym ten jest ściśle związany z układem kurczliwym komórki mięśniowej, gdzie wiąże się z miozyną w proporcji dwa mole enzymu na jeden mol miozyny [2]. Dowodów na bezpośredni udział AMP-deaminazy w skurczu mięśniowym nie uzyskano. Wykazano natomiast istnienie proporcjonalnej współzależności pomiędzy natężeniem pracy mięśniowej a ilością uwolnionego przez pracujący mięsień amoniaku [3, 4].

W roku 1977 Fishbein i współautorzy z laboratorium Biochemicznego Instytutu Patologii Sił Zbrojnych Stanów Zjednoczonych opracowali prostą i efektywną metodę histochemiczną pozwalającą stwierdzić aktywność AMP-deaminazy w mięśniowym materiale biopsyjnym [5]. Zastosowanie tej metody do badań rutynowych nieoczekiwanie ujawniło przypadki całkowitego braku aktywności enzymatycznej. Wśród 250 przeprowadzonych przez grupę Fishbeina biopsji, pięć wykazywało aktywność AMP-deaminazy na poziomie poniżej 1% normy [6]. W preparatach biopsyjnych osobników dotkniętych defektem nie stwierdzano żadnych mikroskopowo uchwytanych zmian morfologicznych. Odchyień od normy nie wykazywały również aktywności dwu innych enzymów cytoplazmatycznych: deaminazy, ade-

nozyny i kinazy fosfokreatynowej. Prowadzone późniejsze badania [7] doprowadziły do identyfikacji następujących 21 przypadków braku mięśniowej AMP-deaminazy.

### Tabela 1

Obraz kliniczny niedoboru mięśniowej AMP-deaminazy (wg. 47-zmodyfikowana)

- |   |
|---|
| 1) Okres ujawnienia się symptomów klinicznych schorzenia: <ul style="list-style-type: none"><li>a) okres dziecięcy (2-12 lat) (40%)</li><li>b) okres młodzieńczy (12-19 lat) (30%)</li><li>c) okres wczesnej dojrzałości (20-40 lat) (22%)</li></ul>  |
| 2) Objawy kliniczne: <ul style="list-style-type: none"><li>a) łatwa męczliwość powysiłkowa, kurcze i bóle mięśniowe (77%)</li><li>b) osłabienie spoczynkowe (27%)</li><li>c) hipotonia (8%)</li></ul>   |
| 3) Nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych: <ul style="list-style-type: none"><li>a) ujemny wynik barwienia histochemicznego na obecność AMP-deaminazy (100%)</li><li>b) wyraźnie obniżona aktywność AMP-deaminazy w badaniu bezpośrednim (poniżej 5% aktywności prawidłowej)</li><li>c) ujemny test wysiłkowy (brak powysiłkowego wzrostu stężenia <math>\text{NH}_3</math> w surowicy krwi) (100%)</li><li>d) podwyższony poziom kinazy kreatynowej w surowicy (56%)</li><li>e) miopatyczny typ EMG (42%)</li><li>f) nieprawidłowości w obrazie morfologicznym biopsji mięśniowych (53%)</li></ul> |

Tabela 1 zestawia charakterystykę wiekową oraz najbardziej typowe objawy kliniczne tej enzymopatii. Jak to wynika z zestawienia, choroba ujawnia się najczęściej w okresie wczesnomłodzieńczym, a osobnicy dotknięci defektem uskarżają się przede wszystkim na łatwą męczliwość, oraz powysiłkowe bóle i skurcze mięśniowe. Połowie przypadków towarzyszy umiarkowany wzrost poziomu kinazy fosfokreatynowej w surowicy krwi. Nie obserwowano natomiast powysiłkowego wzrostu stężenia amoniaku we krwi - efektu obserwowanego u osób zdrowych (ujemny test niedokrwienny).

Badania przeprowadzone w ośrodkach niezależnych [8-18] doprowadziły do ujawnienia kolejnych

<sup>1</sup> Doc. dr hab. med., <sup>2</sup> Dr med., <sup>4</sup> Prof. dr hab. med., Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk.

<sup>3</sup> Lek. med., Klinika Gastroenterologii, Akademia Medyczna, 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7.



przypadków niedoboru mięśniowej AMP-deaminazy. Analiza ich pozwoliła wyciągnąć bardziej precyzyjne wnioski, jeśli idzie o obraz kliniczny, etiologię oraz patogenezę schorzenia. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na to, że niedobór enzymu występować może w dwu postaciach: pierwotnej i wtórnej [7, 19, 20]. Postać pierwotna niedoboru AMP-deaminazy ma niewątpliwie genetyczne podłoże, a jego przyczyną jest całkowity brak izozymu mięśniowego. Defekt dziedziczy się w sposób autosomalny, recesywny. Brak enzymatycznego białka ma charakter wybiórczy i dotyczy jedynie mięśnia szkieletowego. W pozostałych tkankach i narządach osobników dotkniętych enzymopatią, AMP-deaminaza jest obecna, a poziom jej aktywności nie odbiega od normy [21]. Postać pierwotną, homozygotyczną niedoboru mięśniowej AMP-deaminazy spotyka się stosunkowo często, bo u 1-2% osobników populacji ogólnej. Pozwala to zaliczyć omawiane schorzenie do rzędu najczęstszych enzymopatii mięśnia szkieletowego. W postaci pierwotnej enzymopatii mierzona aktywność AMP-deaminazy wynosi mniej niż 5% wartości prawidłowej. Znajdowana w materiale biopsyjnym aktywność resztkowa wynika z obecności tkankowego izoenzymu płodowego, oraz ewentualnie, z zanieczyszczenia materiału krwinkami [22, 23]. Postać heterozygotyczna enzymopatii jest bezobjawowa i przez to wykrywana jest przypadkowo - podczas badań biopsyjnych pacjentów ze schorzeniami układu nerwowo-mięśniowego. Ocenia się, że ta postać defektu występuje u około 10% osobników populacji ogólnej. Aktywność AMP-deaminazy u heterozygot zwykle nie przekracza 40% wartości prawidłowej [19]. Postać wtórna niedoboru mięśniowej AMP-deaminazy dotyczy przypadków, w których obniżenie zawartości enzymu jest skutkiem uszkodzenia tkanki mięśniowej w przebiegu rozmaitych schorzeń układu nerwowo-mięśniowego (np. różnego typu dystrofii lub stanów zapalnych mięśni). W postaci wtórnej zmniejszonej aktywności AMP-deaminazy towarzyszy obniżona aktywność innych enzymów mięśniowych, jak kinaza adenylanowa czy kinaza kreatynowa [20].

AMP-deaminaza mięśni szkieletowych człowieka jest enzymem o dość dobrze poznanych właściwościach fizyko-chemicznych i regulacyjnych [24-26]. Jest to enzym regulatorowy, którego aktywność modulowana jest na drodze rozmaitych oddziaływań allosterycznych. Głównymi efektorami mięśniowej AMP-deaminazy są jony jednowartościowe: potas i sód (aktywatory) oraz ortofosforan (inhibitor). Wyraźne efekty regulacyjne wywierają również nukleotydy, takie jak ADP czy GTP [24, 25]. AMP-deaminaza mięśnia szkieletowego człowieka ma masę cząsteczkową około 290 kDa i jest zbudowana z czterech identycznych podjednostek o masie około 70 kDa [26].

AMP-deaminaza w tkankach ssaków występuje w postaci wielorakich form molekularnych. Badania

autorów japońskich [27] wykazały obecność trzech immunologicznie różnych izoenzymów AMP-deaminazy w tkankach ludzkich. W postaci homogennej występują one w wątrobie (izoenzym L), mięśniu szkieletowym (izoenzym M) i w erytrocytach (izoenzym E). Izoenzym erytrocytarny wykazuje niejednorodne właściwości chromatograficzne i w związku z tym wyróżnić można dwie jego odmiany: E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub>. Odmienności chromatograficzne i kinetyczne pozwoliły wyróżnić również dwie odmiany izoenzymu mięśniowego [28]. Obecność ich wydaje się mieć związek z typem histologiczno-metabolicznym włókna mięśniowego [29]. Szybko kurczące się włókna mięśniowe białe, o glikolitycznym profilu przemian (*fast twitch glycolytic fibers, type II b*) zawierają głównie odmianę B izoenzymu mięśniowego [28]. Aktywności AMP-deaminazy w mięśniach zawierających głównie włókna tego typu jest dwu-trzykrotnie wyższa, aniżeli w mięśniach zawierających przede wszystkim wolno kurczące się włókna czerwone, o tlenowym profilu przemian (*slow twitch oxidative fibers, type I*) [30].

W trakcie rozwoju ontogenetycznego aktywność mięśniowej AMP-deaminazy wzrasta [31], a procesowi temu towarzyszy funkcjonalne różnicowanie się enzymu [32, 33]. Badania grupy H o l m e s ' a w Duke University Medical Center wykazały obecność trzech rozwojowych form AMP-deaminazy (embrionalna, okołoporodowa i dojrzała) w dojrzewającym mięśniu szkieletowym szczura [34]. Formom tym odpowiadają trzy różne transkrypty będące produktem ekspresji dwu genów kodujących AMP-deaminazę [35]. Forma embrionalna enzymu pojawia się we wczesnych etapach ontogenezy i jest ona produktem translacji transkryptu produkowanego przez gen *ampd2*. W tkankach pozamięśniowych, ekspresja tego genu dokonuje się nieprzerwanie przez cały okres rozwoju osobniczego szczura. W mięśniu szkieletowym natomiast, zanika ona w okresie okołoporodowym. W okresie tym ujawnia się ekspresja genu *ampd1* - genu specyficznego dla mięśnia szkieletowego. Wytworzony przez ten gen transkrypt pierwotny stanowi materiał wyjściowy dla syntezy okołoporodowej (*perinatal*) i dojrzałej (*adult*) formy AMP-deaminazy. Formy te wytwarzane są z transkryptu pierwotnego w następstwie modyfikacji posttranskrypcyjnej wykorzystującej mechanizmy alternatywnego cięcia (*alternative splicing*) [35, 36].

Wiele wskazuje na to, że podobny schemat różnicowania się AMP-deaminazy ma miejsce również w ontogenezie człowieka. Obecność kinetycznie i chromatograficznie odmiennych form rozwojowych AMP-deaminazy w mięśniu szkieletowym człowieka [37-38], istnienie immunologicznego podobieństwa między izoenzymami ludzkimi i szczurzymi [27], a także wysoki stopień homologii prezentowany przez komplementarne DNA (cDNA) szczurzego i ludzkiego genu "mięśniowego" [36], za podobieństwem takim wyraźnie przemawiają.

Reakcja katalizowana przez AMP-deaminazę, wraz z dwiema innymi, tzn. reakcją katalizowaną przez syntetazę adenylbursztynianową (EC 6.3.4.4) oraz reakcją katalizowaną przez liazę adenylbursztynianową (EC 4.3.2.2), stanowi element składowy tzw. cyklu nukleotydów purynowych [39] (Ryc.1). Obecnie istnieje zgodność co do tego, iż główne znaczenie metaboliczne tego cyklu polega na utrzymaniu właściwego zasobu tkankowej puli nukleotydów purynowych, utrzymaniu prawidłowej wartości tzw. ładunku energetycznego adenylanów (*adenylate energy charge*), a także na spełnianej przezeń funkcji anaplerotycznej.

Ładunek energetyczny adenylanów (Ł.E.A.), wyrażający się wzorem:

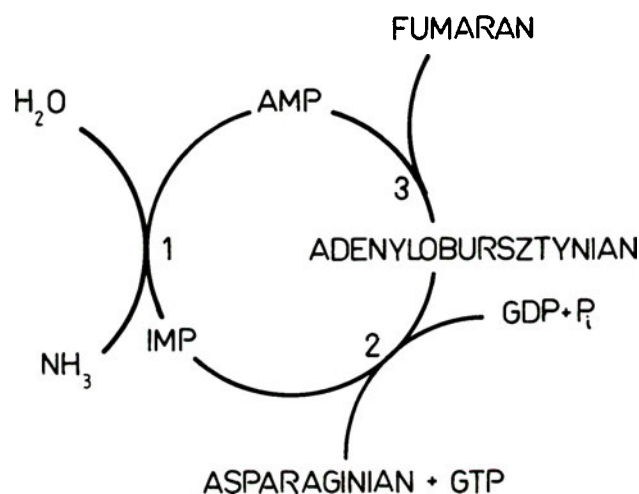
$$\text{Ł.E.A.} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2 [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

odzwierciedla najogólniej zdolność komórki do prowadzenia ATP - zależnych procesów anabolicznych. Ujęte wzorem wzajemne stosunki stężeń nukleotydów adeninowych regulowane są bezpośrednio równowagą reakcji katalizowanej przez kinazę adenylanową (miokinazę):



Położenie stanu równowagi powyższej reakcji w sposób istotny zależy od aktywności AMP-deaminazy. Zachodząca w wyniku działania tego enzymu deaminacja kwasu adenylowego (AMP) przesuwająca równowagę reakcji miokinazowej w kierunku syntezy ATP, a to przeciwdziała zbyt drastycznemu spadkowi wartości ładunku energetycznego adenylanów komórki. Działanie takiego mechanizmu wyrównawczego jest szczególnie ważne wtedy, kiedy zapotrzebowanie komórki na energię przewyższa aktualny jej dopływ. Sytuacja taka ma miejsce podczas intensywnej pracy mięśniowej [41]. Przemiany wyznaczone cyklem nukleotydów purynowych wykazują różną

Ryc. 1. Cykl nukleotydów purynowych: 1. Deaminaza AMP, 2. Syntetaza adenylbursztynianowa, 3. Liza adenylbursztynianowa.



intensywność w zależności od typu histologicznego, jak i od stanu metabolicznego mięśnia. Szczególnie żywe funkcjonowanie cyklu nukleotydów purynowych stwierdzono w pracujących mięśniach białych (typ II b), wykazujących dużą aktywność AMP-deaminazy. Ustalono ponadto, że gałąź deaminująca cyklu (tj. reakcja katalizowana przez AMP-deaminazę) funkcjonuje przede wszystkim w czasie skurczu mięśniowego; gałąź reaminująca natomiast (Ryc.1) uaktywnia się przede wszystkim w fazie poskurczowej [43].

Tabela 2

Zmiany zawartości adenylanów w biopsjach mięśni szkieletowych osobników zdrowych oraz z niedoborem mięśniowej AMP-deaminazy (MDD) podczas intensywnego wysiłku mięśniowego (wg. 40).

Parametr	Osobnicy zdrowi	Pacjenci z MDD
spoczynek		
ATP	148.7 ± 12.5	126.8 ± 16.7
ADP	20.9 ± 5.5	20.9 ± 2.4
AMP	0.46 ± 0.13	0.89
IMP	0.32 ± 0.19	0.06 ± 0.01
Ł.E.A.	0.93 ± 0.2	0.93 ± 0.01
wysiłek		
ATP	107.6 ± 15.0	117.7 ± 18.1
ADP	21.9 ± 5.2	24.6 ± 2.3
AMP	0.55 ± 0.17	1.09
IMP	52.4 ± 14.2	4.2 ± 1.5
Ł.E.A.	0.90 ± 0.02	0.90 ± 0.01

Wartości zostały przedstawione jako średnie (±SD) wyrażone w nmolach w przeliczeniu na  $\mu$ mole całkowitej kreatyny, której zawartość nie zmienia się znacząco podczas wysiłku mięśniowego [44].

U osobników zdrowych, intensywny wysiłek mięśniowy wiąże się z około 50 procentowym spadkiem zawartości fosfokreatyny [44] i około 35 procentowym spadkiem zawartości ATP (Tab.2). Temu ostatniemu odpowiada równoległy, prawie stochiometryczny wzrost zawartości tkankowego IMP [44]. Jest on następstwem katalitycznego działania AMP-deaminazy - enzymu, który w skurczowej degradacji nukleotydów adeninowych mięśnia szkieletowego odgrywa rolę pierwszorzędą. W okresie spoczynkowym, w następstwie działania enzymów gałęzi aminującej cyklu nukleotydów purynowych, wartości mięśniowego ATP i IMP powracają do stężeń wyjściowych, znajdujących w okresie przedskurczowym.

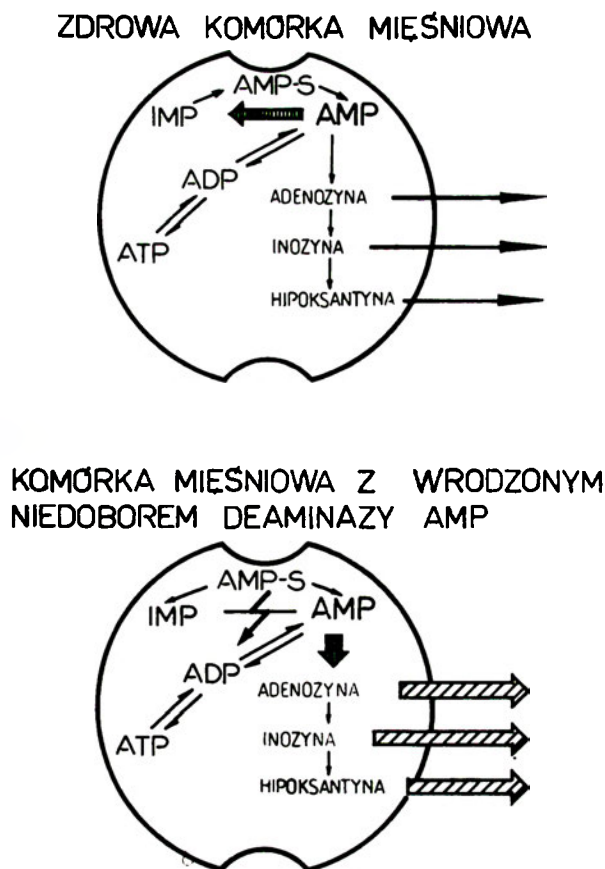
Osobnicy z niedoborem mięśniowej AMP-deaminazy mogą jedynie wykonać około 30 procent pracy mięśniowej, jaką wykonują osobnicy zdrowi. Wysiłkowi temu towarzyszy znaczny, około 70 procentowy spadek zawartości mięśniowej fosfokreatyny [44]. Spadek zawartości tkankowego ATP u osób z niedoborem mięśniowej AMP-deaminazy jest stosunkowo

niewielki, bo tylko 6 procentowy. Mimo to, w przeliczeniu na jednostkę wykonanej pracy, okołowysiłkowy spadek zawartości tkankowego fosfagenu (ATP plus fosfokreatyna) u osobników z niedoborem mięśniowej AMP-deaminazy jest prawie pięciokrotnie wyższy, aniżeli u osób zdrowych [44]. Spadkowi zawartości mięśniowego fosfagenu nie towarzyszy przy tym, normalnie obserwowany, przyrost stężenia tkankowego IMP. Zamiast tego obserwuje się natomiast wyraźny wzrost stężeń łatwo dyfundujących przez błonę komórkową miocytu nukleozydów: przede wszystkim adenozyiny, ale także inozyny i hipoksantyny. Przenikanie tych związków do krwioobrotu prowadzi w następstwie do zubożenia komórkowej puli nukleotydów purynowych. Z powyższego wynika, że w mięśni wykazującym niedobór specyficznej AMP-deaminazy, skurczowa degradacja nukleotydów adeninowych przebiega nie przez deaminację, ale przez defosforylację kwasu adenylogowego (AMP), tak jak to ma miejsce w mięśni sercowym. Zasadnicze różnice metabolizmu nukleotydów purynowych w pracującym mięśni szkieletowym osobników zdrowych oraz osobników dotkniętych niedoborem mięśniowej AMP-deaminazy ilustruje rycina 2.

Artykuł otrzymano 6 grudnia 1990 r.

Zaakceptowano do druku 18 stycznia 1991 r.

Ryc. 2. Implikacje metaboliczne niedoboru AMP-deaminazy w komórce mięśniowej (wg. 47).



## Piśmiennictwo

1. Purzycka J., (1962), *Acta Biochim. Polon.*, **9**, 83-93.
2. Ashby B., Frieden C., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1869-1872.
3. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewiński W., (1972), *Biochem. Z.*, **188**, 15-23.
4. Meyer R. A., Terjung R. L., (1980), *Am. J. Physiol.*, **237**, C111-C118.
5. Fishbein W. N., Armbrustmacher V. W., Griffin J. L., (1977), *Am. J. Pathol.*, **86**, 79a-80a.
6. Fishbein W. N., Armbrustmacher V. W., Griffin J. L., (1978), *Science*, **200**, 545-548.
7. Fishbein W. N., (1986), w *Myology*, (red. Engel A. G., Bauken B. Q.), 1745-1762, Mc Graw Hill — Book Company.
8. Shumate J. B., Katnik R., Ruiz M., Kaiser K., Frieden C., Brooke M. H., Carroll J. E., (1979), *Muscle and Nerve*, **2**, 213-216.
9. Shumate J. B., Kaiser K. K., Carroll J. E., Brooke M. H., (1980), *J. Pediatrics*, **96**, 885-887.
10. Di Mauro S., Miranda A. F., Hays A. P., Franck W. A., Hoffman G. S., Schoenfeldt R. S., Singh N., (1980), *J. Neurol. Sci.*, **47**, 191-202.
11. Kar N. C., Pearson C. M., (1981), *Arch. Neurol.*, **38**, 279-281.
12. Sabina R. L., Swain J. L., Patten B. M., Ashizawa T., O'Brien W. E., Holmes E. W., (1980), *J. Clin. Invest.*, **66**, 1419-1423.
13. Mercalis R., Mortin J. J., Dehane I., de Barsey Th., Van den Berghe G., (1981), *J. Neurol.*, **225**, 157-166.
14. Scholte H. R., Bush H. F. M., Luyt-Houven I. E. M., (1981), *J. Inher. Dis. Metab.*, **4**, 169-170.
15. Kelemen J., Rice D. R., Bradley W. G., Munsat T. L., Di Mauro S., Hogan E. L., (1982), *Neurology*, **32**, 857-863.
16. Nagao H., Habara S., Morimoto T., Sano N., Takahashi M., Kida K., Matsuda H., (1986), *Neuropediatrics*, **17**, 193-198.
17. Goebel H. H., Bardosi A., Courad B., Kuhleudahl H. D., Di Mauro S., Rumpf K. W., (1986), *Klin. Wochenschr.*, **64**, 342-347.
18. Mercelis R., Martin J. J., de Barsey Th., Van den Berghe G., (1987), *J. Neurol.*, **234**, 385-389.
19. Fishbein W. N., Armbrustmacher V. W., Griffin J. L., Davis J. I., Foster W. D., (1984), *Ann. Neurol.*, **15**, 271-277.
20. Fishbein W. N., (1986), *Biochem. Med.*, **33**, 158-169.
21. Fishbein W. N., Davis J. I., (1982), *Fed. Proc.*, **41**, 902.
22. Fishbein W. N., Davis J. I., Foellmer J. W., (1983), *J. Exptl. Pathol.*, **1**, 7-25.
23. Kaletha K., Nowak G., (1990), *Clin. Chim. Acta*, **190**, 147-156.
24. Makarewicz W., Stankiewicz A., (1974), *Biochem. Med.*, **10**, 180-197.
25. Kaletha K., Stankiewicz A., Makarewicz W., Żydowo M., (1976), *Int. J. Biochem.*, **7**, 67-71.
26. Stankiewicz A., (1981), *Int. J. Biochem.*, **13**, 1177-1183.
27. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T., Asano T., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **714**, 298-306.
28. Raggi A., Bergamini C., Ronca G., (1975), *FEBS-Letters*, **58**, 19-23.
29. Peter J. B., Barnard R. J., Edgerton V. R., Gillespie C. A., Stemple K. E., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2627-2633.
30. Meyer R. A., Gilloteaux J., Terjung R. I., (1980), *Experientia*, **36**, 676-677.
31. Kendrick-Jones J., Perry S. V., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 207-214.
32. Kaletha K., Żydowo M., (1971), *Int. J. Biochem.*, **2**, 20-26.
33. Sammons D., Chilson O. P., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 561-570.
34. Marquetant R., Desai N. M., Sabina R. L., Holmes E. W., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2345-2349.
35. Sabina R. L., Morisaki T., Clarke P., Eddy R., Shows T. B., Morton C., Holmes E. W., (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 9423-9433.
36. Morisaki T., Sabina R. L., Holmes E. W., (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 11482-11486.

37. Kaletha K., Spychała J., Nowak G., (1987), *Experientia*, **43**, 440-443.
38. Kaletha K., Nowak G., (1988), *Biochem. J.*, **249**, 255-261.
39. Makarewicz W., (1979), *Post. Biochem.*, **25**, 169-195.
40. Van Waarde A., (1988), *Biol. Rev.*, **63**, 259-298.
41. Lowenstein J. M., Goodman M. N., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 2308-2312.
42. Meyer R. A., Dudley G. A., Terjung R. L., (1980), *J. Appl. Physiol.*, **49**, 1037-1041.
43. Meyer R. A., Terjung R. L., (1980), *Am. J. Physiol.*, **239**, C32-C38.
44. Sabina R. L., Swain J. L., Olanow C. W., Bradley W. G., Fishbein W. N., Di Mauro S., Holmes E. W., (1984), *J. Clin. Invest.*, **73**, 720-730.
45. Sahlin K., Broberg S., (1990), *Int. J. Sports Med.*, **11**, S62-S67.
46. Weicker H., Hageloch W., Luo J., Müller D., Werle E., Sehling K. M., (1990), *Int. J. Sports Med.*, **11**, S68-S77.
47. Swain J. L., Sabina R. L., Holmes E. W., (1985), w *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (red. Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S., Brown M. S.), str. 1184-1191, Mc Graw-Hill Book Company.

## Struktura i ekspresja genów należących do rodziny genów szoku termicznego *hsp70*

## Structure and expression of genes of the heat-shock gene family *hsp 70*

ZDZISŁAW KRAWCZYK<sup>1</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Geny *hsp70*
  - II-1. Zróżnicowana ekspresja genów *hsp70*
  - II-2. Regulacja ekspresji genów *hsp70*
    - II-2-1. Udział sekwencji regulacyjnej HSE i czynnika transkrypcji HSF w indukcji transkrypcji genów szoku termicznego
    - II-2-2. Inne czynniki regulujące ekspresję genów *hsp70*
- III. Geny *hsc70*
  - III-1. Zróżnicowana ekspresja genów *hsc70*
- IV. Kompleksy białek HSC70 i HSP70 z innymi białkami komórkowymi
- V. Geny rodziny *hsp70* ulegające ekspresji w czasie spermatogenezy
- VI. Geny rodziny *hsp70* kodujące białka bakteryjne, mitochondrialne i chloroplastyczne
- VII. Funkcje białek kodowanych przez geny rodziny *hsp70*

### Contents:

- I. Introduction
- II. *Hsp70* genes
  - II-1. Differential expression of the *hsp70* genes
  - II-2. Regulation of the expression of the *hsp70* genes
    - II-2-1. Involvement of the HSE regulatory sequence and the HSF transcription factor in the induction of the heat shock gene expression
    - II-2-2. Other elements involved in the regulation of the *hsp70* genes
- III. *Hsc70* genes
  - III-1. Differential expression of the *hsc70* genes
- IV. Complexes of HSC70 and HSP70 with other cellular proteins
- V. *Hsp70*-related genes specific for spermatogenesis

- VI. Bacterial, mitochondrial and chloroplast proteins coded by genes from the *hsp70* gene family
- VII. Function of proteins coded by the *hsp70* gene family

### I. Wstęp

W odpowiedzi na różnorodne bodźce środowiskowe zarówno chemiczne jak fizyczne w komórkach wszystkich organizmów aktywowane są geny stresu, do których należą geny szoku termicznego [1-3]. W prezentowanej pracy omówiono właściwości rodziny genów, której głównym, najlepiej zbadanym pod względem struktury i funkcji jest gen szoku termicznego oznaczany *hsp70*.

Cechami klasyfikującymi dany gen do rodziny *hsp70* są: a. znaczące podobieństwo sekwencji nukleotydowej w regionie kodującym białko do sekwencji genu referencyjnego, którym najczęściej bywa gen szoku cieplnego *hsp70 D. melanogaster* [4]; b. masa cząsteczkowa kodowanego białka wynosząca około 70 kDa. Geny o wymienionych cechach wykryto we wszystkich badanych dotychczas organizmach zarówno eukariotycznych jak i prokariotycznych.

Nazewnictwo genów zaliczanych do rodziny *hsp70* nie jest ustalone, aczkolwiek najczęściej (głównie w zastostowaniu do wyższych eukariontów) spotyka się skrótowe nazwy zwyczajowe. Uwzględniając typ ekspresji i (lub) lokalizację wewnątrzkomórkową białka można w rodzinie *hsp70* eukariontów wyróżnić kilka klas genów: a. geny *hsp70* (*heat shock genes*) silnie aktywowane w warunkach hipertermii; b. geny *hsc70* (*heat shock cognate genes*), transkrybowane konstytutywnie w temperaturze fizjologicznej i nie ulegające aktywacji pod wpływem szoku termicznego; c. geny *grp78* (*glucose regulated genes*) kodujące

<sup>1</sup> Dr n. przyrodn., Instytut Onkologii, Zakład Biologii Nowotworów, 44-100 Gliwice.

białko siateczki śródplazmatycznej i aktywowane w warunkach niedoboru glukozy (geny *grp78* omówiono w artykule przeglądowym: Z. Krawczyk (1990) *Post. Biochem.*, 37, (2), 70-75; d. geny kodujące białka mitochondrialne; e. geny transkrybowane w komórkach spermatogenicznych. Ponieważ niektóre geny mogą posiadać właściwości przypisywane genom różnych klas podział ma jedynie charakter orientacyjny. Do rodziny *hsp70* zalicza się także bakteryjny gen *DnaK* i gen *riketsji* kodujące białka pokrewne z *hsp70* eukariontów.

W przypadku drożdży *S. cerevisiae* 8 poznanych genów z rodziny *hsp70* zaliczono do czterech klas (różnych od wymienionych wyżej) oznaczonych *SSA*, *SSB*, *SSC* i *SSD*, a podstawą klasyfikacji jest oprócz wzoru ekspresji głównie wpływ mutacji określonego genu na fenotyp [5].

W genomie człowieka [6] i szczura [7, 8] występują liczne regiony, w których znajdują się sekwencje w znacznym stopniu podobne do genów z rodziny *hsp70*. Wiele z tych sekwencji to zapewne pseudogeny, niektóre jednak mogą być niezidentyfikowanymi dotychczas funkcjonalnymi genami.

## II. Geny *hsp70*

W danym organizmie klasa *hsp70* może być reprezentowana przez kilka genów. Mogą to być zarówno geny znacznie różniące się strukturą pierwszorzędową (np. geny *hsp70A* [9] i *hsp70B* [10] człowieka) jak i kopie, różniące się między sobą głównie sekwencją części niekodujących (np. geny *hsp70* myszy [11]).

Spośród genów aktywowanych przez czynniki środowiskowe, niektóre geny *hsp70* (np. gen *hsp70A* człowieka) są transkrybowane także w prawidłowych warunkach fizjologicznych aczkolwiek z wydajnością znacznie mniejszą niż w warunkach szoku termicznego. Spośród genów należących do rodziny *hsp70* *S. cerevisiae* silnie aktywowane w warunkach hipertermii są geny *SSA3* i *SSA4*. Geny *hsp70* poza nielicznymi wyjątkami nie mają intronów.

### II-1. Zróżnicowana ekspresja genów *hsp70*

Szok termiczny nie jest jedynym czynnikiem indukującym ekspresję genów *hsp70*. W temperaturze fizjologicznej geny te aktywowane są przez dziesiątki związków chemicznych (w tym o działaniu farmakologicznym) [12, 13], przez stan anoksji [14], ischemię [15], promieniowanie UV [16], zmianę pH [17, 18], zmiany warunków oświetlenia [19], w wyniku infekcji wirusowej [20-23], oraz w wyniku mechanicznego uszkodzenia tkanek [24].

Niekiedy geny *hsp70* zostają przejściowo uaktywnione przez czynniki endogenne. Geny *hsp70A* i *hsp70B* *X. laevis* są silnie aktywowane w począt-

kowych stadiach oogenezy [25]. W późniejszych stadiach sporulacji *S. cerevisiae* aktywowany jest gen *SSA3* [5]. Ekspresję genu *hsp70* obserwowano *in vivo* w erytroidalnych, polichromatycznych komórkach kur [26]. Gen *hsp70A* jest aktywowany *in vitro* w komórkach ludzkiej białaczki erytroblastycznej podczas różnicowania indukowanego heminą [27]. Zróżnicowaną ekspresję genu *hsp70A* (*hsx70*) zależną od cyklu komórkowego wykazano w komórkach *HeLa* [28-30], komórkach owodni [31], i w limfocytach obwodowych człowieka [32, 33].

Z kolei szok termiczny nie indukuje transkrypcji genów *hsp70* w oocytach *X. laevis* [25], muszki owocowej [34] i myszy [35-36]; także w spermatocytach muszki owocowej [37] i szczura [Krawczyk, dane niepublikowane]. Zahamowanie indukowanej termicznie ekspresji genów *hsp70* obserwowano w komórkach wczesnych zarodków myszy i królika [38, 39] *X. laevis* i jeźowców [39, 40] oraz *D. melanogaster* [34] przed osiągnięciem przez zarodek stadium blastocysty lub stadium ekwiwalentnego.

Podobnie szok termiczny nie indukuje ekspresji genów *hsp70* w erytroblastach [26], w komórkach niektórych linii białaczki erytroidalnej [41, 42] szpiczaków [43] i raka zarodkowego [44] myszy. Obniżenie stopnia ekspresji genu *hsp70* pod wpływem szoku termicznego obserwowano w mózgu szczura w okresie 3 tygodni od urodzenia [45].

### II-2. Regulacja ekspresji genów *hsp70*

Warunkiem aktywacji transkrypcji genów *hsp70* pod wpływem szoku termicznego jest powstanie funkcjonalnego kompleksu między czynnikiem białkowym HSF (*heat shock factor*) i regionem promotora zawierającym sekwencje regulacyjne HSE (*heat shock element*) [46, 47]. Ponieważ oddziaływanie między HSF i HSE warunkują także indukcję genów *hsp70* w komórkach traktowanych 2,4-dwunitrofenolem, salicylanem sodu [48], analogami aminokwasów, siarczanem kadmu [49] oraz w różnicujących się pod wpływem heminy komórkach białaczki erytroidalnej [27]



## praca - employment

American, filtration company is looking for a chemical engineer, preferably with pharmaceutical experience and good knowledge of English language, who would be interested in selling and promotion activities.

Please contact:

Padna Marketing Consulting Warszawa, Puławska 107d/21  
tel: 44 09 02 Mrs. Ewa AMBROZIAK

można sądzić, że jest to podstawowy mechanizm aktywacji transkrypcji tych genów.

Zróznicowanie kinetyki i stopnia ekspresji genów *hsp70* przez czynniki wymienione w rozdziale II-1 wskazuje na wielostopniowość procesu aktywacji przy czym powstanie kompleksu HSE-HSF uważane jest za końcowy etap tego procesu.

### II-2.1. Udział sekwencji regulacyjnej HSE i czynnika transkrypcji HSF w indukcji transkrypcji genów szoku termicznego.

W pełni funkcjonalna struktura HSE składa się z co najmniej trzech przemiennie występujących pentanukleotydów [nGAAn] i [nTTCn] [50-52]. Wyróżnikiem struktury HSE jest palindromowa sekwencja zgodności CnnGAAnnTTCnnC wykryta przez Pelhama [53].

W regionie DNA poprzedzającym jednostkę transkrypcji genów szoku termicznego występują na ogół liczne sekwencje o dużym stopniu podobieństwa do sekwencji Pelhama, jednak tylko niektóre z nich funkcjonują jako HSE. Zarówno rozmieszczenie sekwencji HSE względem siebie jak i ich odległość od miejsca inicjacji transkrypcji są odmienne w różnych genach *hsp70*. Wydajna transkrypcja genów *hsp70 in vivo* wymaga kooperacji co najmniej dwóch sekwencji HSE [10, 54, 55]. Sekwencje HSE funkcjonują *in vitro* w znacznym stopniu niezależnie od odległości i orientacji względem miejsca inicjacji transkrypcji [56-60] wykazując tym właściwości sekwencji wzmacniającej transkrypcję (*enhancer sequence*).

Homogenne preparaty czynnika HSF z komórek *D. melanogaster* i *S. cerevisiae* otrzymano dzięki zastosowaniu chromatografii powinowactwa, w której aktywnym złożem była sefaroza z przyłączonymi kowalencyjnie oligonukleotydami zawierającymi sekwencję Pelhama [61-63].

Na podstawie sekwencji nukleotydowej genu *HSF* drożdży [64, 65] ustalono, że masa cząsteczkowa białka wynosi około 93 kDa. W cząsteczce HSF nie ma cysteiny, jest ona natomiast bogata w asparaginę, serynę i treoninę; łącznie reszty te stanowią 32% składu aminokwasowego. W cząsteczce HSF nie występują struktury typu "zinc finger" i "leucine zipper". Domena HSF oddziałująca z HSE znajduje się w centralnej części cząsteczki [66]. Mutacje w genie *HSF* drożdży są letalne [64, 65], zatem czynnik HSF jest białkiem niezbędnym dla wzrostu komórek również w temperaturze fizjologicznej.

Aktywacja transkrypcji genów *hsp70* pod wpływem szoku termicznego zachodzi także w obecności cykloheksimidu, co wskazuje, że czynnik HSF jest obecny (w formie nieaktywnej) w komórkach w prawidłowych warunkach fizjologicznych [12, 48, 67]. Aktywacja czynnika HSF jest procesem wielostopniowym, w czasie którego następuje prawdopodobnie

kilka potranslacyjnych modyfikacji cząsteczki. Pełną aktywność, co w komórkach wyższych eukariontów objawia się równoczesną zdolnością do tworzenia kompleksu z HSE i aktywacją transkrypcji genów *hsp* uzyskuje cząsteczka HSF w wyniku ufosforylowania [67].

Także w komórkach drożdży poddanych szokowi termicznemu czynnik HSF ulega fosforylacji [68], jednak przeciwnie niż w komórkach wyższych eukariontów również niefosforylowana forma HSF tworzy *in vitro* stabilne kompleksy z sekwencjami HSE [68, 69]. Odzwierciedla to prawdopodobnie udział czynnika HSF w utrzymywaniu aktywności niektórych genów *hsp70* drożdży w temperaturze fizjologicznej.

Aktywną formą czynnika HSF jest struktura oligomeryczna (*trimer*), [52, 66]. Oddziaływaniom między HSF i HSE w czasie aktywacji genu *hsp70 Drosophila* towarzyszą znaczne zmiany konformacyjne w regionie promotora [70]; między innymi ulega lokalnemu odkształceniu oś helisy DNA (*bending*) w regionie kompleksu [71].

W komórkach *D. melanogaster* w temperaturze fizjologicznej zachodzi ciągła inicjacja transkrypcji genu *hsp70*; transkrypt osiąga jednak długość około 25 nukleotydów. Wydaje się zatem, że czynnik HSF może aktywować transkrypcję genu *hsp70*, uniemożliwiając przedwczesną terminację [72].

### II-2.3. Inne czynniki regulujące ekspresję genów *hsp70*

Oprócz sekwencji HSE i czynnika HSF w regulacji ekspresji genów *hsp70* mogą brać udział także inne elementy *cis* i *trans*. Mimo ustalenia sekwencji promotora wielu genów *hsp70* jedynie mechanizmy regulujące ekspresję genu *hsp70A* człowieka i genu *SSA* i *S. cerevisiae* w warunkach innych niż szok termiczny są stosunkowo dobrze poznane.

Ekspresję genu *hsp70A* człowieka w temperaturze fizjologicznej warunkuje sekwencja CCAAT (-68) [73] natomiast w regulacji ekspresji genu pod wpływem czynników zawartych w surowicy bierze udział sekwencja SRE (-100) (*serum response element*; [74]). Sekwencje CCAAT i SRE częściowo się pokrywają, sądzi się zatem, że współzawodnictwo między różnymi czynnikami o miejsce wiązania jest jednym z elementów regulujących ekspresję genu [73].

Elementem *cis* odpowiedzialnym za indukcję ekspresji genu *hsp70A* człowieka przez białko E1A adenowirusa jest region zawierający sekwencję TATAA (-28) [75]. Białko E1A nie wiąże się jednak z wymienioną sekwencją, lecz oddziałuje z bliżej nieokreślonymi czynnikami inicjacji [76]. W regulacji ekspresji genu *hsp70A* człowieka ma prawdopodobnie udział także czynnik inicjacji Sp1 [77, 78].

Odmienne niż w przypadku genu *hsp70A* człowieka w utrzymaniu ekspresji genu *SSA1* w temperaturze fizjologicznej bierze udział jedna z kilku sekwencji

HSE [55]. Ponadto, w regionie promotora tego genu znajduje się wiążąca represor sekwencja regulacyjna URS (*upstream repression sequence*), częściowo pokrywająca się z wymienioną sekwencją HSE [55].

Nie są znane mechanizmy aktywacji lub represji genów *hsp70* w czasie oogenezy, spermatogenezy i różnicowania. W komórkach raka zarodkowego, w których gen *hsp70* jest nieaktywny wykryto znaczne stężenie czynnika HSF wydaje się więc, że represja genu spowodowana jest bądź zmianą struktury chromatyny w regionie promotora, bądź nie funkcjonuje układ aktywacji czynnika HSF [79].

### III. Geny *hsc70*

Geny *hsc70* charakteryzuje stała ekspresja w temperaturze fizjologicznej i, na ogół, nieznaczna aktywacja transkrypcji pod wpływem szoku termicznego. Geny o wymienionych właściwościach wykryto początkowo w genomie *D. melanogaster* [80] i *S. cerevisiae* [81]. W genomie *Drosophila* znajdują się co najmniej 4 geny *hsc70* [82], natomiast u ssaków geny *hsc70* są prawdopodobnie genami unikalnymi. Białko HSC70 ma aktywność ATPazy i w prawidłowych warunkach fizjologicznych znajduje się w cytoplazmie.

Podobieństwo sekwencji nukleotydów między genami *hsc70* myszy [83], szczura [7] i człowieka [84] wynosi powyżej 90%. Niezwykłą właściwością tych genów jest obecność w trzech spośród ośmiu intronów podobnej (82% podobieństwa) 90-cio nukleotydowej sekwencji [85]. Zachowana w czasie ewolucji tak długa powtarzająca się sekwencja w intronach może mieć znaczenie funkcjonalne.

W promotorach genów *hsc70* człowieka i szczura znajdują się dwa bloki HSE, przy czym każdy z nich składa się z zachodzących na siebie dwóch sekwencji P e l h a m a. Mimo to, geny *hsc70* są jedynie nieznacznie aktywowane przez szok termiczny. Silną indukcję genu *hsc70* spowodowaną wzrostem temperatury obserwowano dotychczas jedynie w komórkach raka zarodkowego myszy linii F9 [35, 86]. Czynniki regulujące ekspresję genów *hsc70* nie zostały jeszcze zdefiniowane.

#### III-1. Zróżnicowana ekspresja genów *hsc70*

Stężenie HSC70 w tkankach dorosłych zwierząt jest zróżnicowane. W narządach myszy i szczura największe stężenie mRNA lub białka HSC70 występuje w mózgu i nerkach i korze nadnerczy [83, 87, 88]. Białko HSC70 wykryto w komórkach spermatogonicznych [89] i w oocytach myszy [36] natomiast nie znaleziono go w zapłodnionym jajku [90]. W trakcie rozwoju zarodkowego myszy geny *hsc70* są przejściowo silnie aktywowane w dwukomórkowym zarodku [90, 91]. Znaczne ilości HSC70, wykryto w komórkach raka zarodkowego myszy [83].

Wzrost ekspresji genu *hsc70* obserwowano w fazie replikacji DNA w fibroblastach szczura stymulowa-

nych surowicą [7], w wątrobie regenerującej szczura [92, 93] oraz w komórkach chłoniaka szczura stymulowanych prolaktyną [88]. Hormon ten indukuje ekspresję genu *hsc70* także w wątrobie szczurów, którym usunięto przysadkę.

W jajowodach i komórkach wczesnych zarodków *D. melanogaster* silnie aktywowane są dwa z 4 genów *hsc70* (gen *hsc70* i gen *hsc72*), przy czym stężenie białka HSC70 osiąga poziom przewyższający stężenie aktywny. Białka kodowane przez pozostałe geny *hsc70* (*Hsc1* i *Hsc2*) występują w nieznacznych ilościach i wykrywane są głównie w komórkach dorosłych owadów [82].

### IV. Kompleksy białek HSC70 i HSP70 z innymi białkami komórkowymi

W komórkach, które uległy transformacji genem *p53* białko kodowane przez wymieniony onkogen (anty-onkogen?) [94] tworzy kompleksy z białkami HSC70 [95-97]. Ponieważ właściwości transformujące mają jedynie zmutowane cząsteczki białka *p53* wydaje się, że właśnie one wiążą się z HSC70 [94, 98, 99]. Powstawanie kompleksu nie zależy od określonej sekwencji aminokwasów w cząsteczce *p53*, istotna jest konformacja cząsteczki [99]. W kompleksie znajduje się także niezidentyfikowane białko o masie cząsteczkowej około 110 kDa związane bezpośrednio z HSC70 [100]. Konsekwencją powstania kompleksu jest znaczne wydłużenie czasu półtrwania cząsteczek *p53*, co prowadzi do znacznego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia tego białka [98]. Ponieważ także bakteryjne białko DnaK tworzy kompleks z białkiem *p53* [100], wydaje się, że powinowactwo do niektórych białek komórkowych (w tym do *p53*) jest istotną właściwością rodziny HSP70.

Zmutowane cząsteczki białka *p53* tworzą kompleksy również z białkiem HSP70 jeśli jest ono syntetyzowane w temperaturze fizjologicznej [96, 99]. HSP70 jest także jednym z kilku poznanych białek, które tworzą kompleks z antygenem T wirusa SV-40 [101] i podobnie jak w przypadku *p53* trwalszy kompleks powstaje ze zmutowanymi cząsteczkami antygeny. Domena antygeny T wiążąca HSP73 znajduje się w końcu N cząsteczki T; interesujące, że ta sama domena odpowiedzialna jest za wiązanie się antygeny z białkiem kodowanym przez gen retinoblastomy. Wykryto powstawanie kompleksów HSP70 także z innymi białkami transformującymi: z antygenem T wirusa polyoma [102], z białkiem kodowanym przez gen E1A adenowirusa [103] oraz z produktem onkogenu *v-rel* (cyt. za [101]).

HSP70, HSC70 lub białka pokrewne są prawdopodobnie jednym ze składników kompleksów jakie tworzą w cytozolu receptory progesteronu [104] i glukokortykoidów [105].

## V. Geny rodziny *hsp70* transkrybowane w czasie spermatogenezy

Dotychczas opisano trzy geny (*hst70* [106, 107], *hsp70.2* [108] i *hsc70t* [109]) należące do rodziny *hsp70*, które ulegają ekspresji swoistej tkankowo. Gen *hst70* (*heat shock testis-specific*) szczura i gen *hsp70.2* myszy są genami homologicznymi; podobieństwo sekwencji nukleotydów zarówno w regionie kodującym białko jak i w regionie promotora obu genów przekracza 95%. Transkrypcja genu *hst70* aktywowana jest w spermatocytach znajdujących się w stadium późnego pachytenu [110]. Wymienione geny nie mają intronów i kodują białko o masie cząsteczkowej około 69.5 kDa i sekwencji aminokwasów podobnej odpowiednio w 62%, 82% i 85% do białek GRP78, HSP70 i HSC70 myszy i szczura.

Gen *hst70* nie jest aktywowany ani w warunkach hipertermii ani w komórkach somatycznych pobudzonych do proliferacji [93, 106]. Mechanizm regulacji ekspresji genów *hst70* i *hsp70.2* nie jest znany. Wśród wielu sekwencji o potencjalnych właściwościach regulacyjnych występujących w regionie promotora znajduje się (co jest właściwością niespotykaną w innych genach rodziny *hsp70*) sekwencja podobna do ERE (*estrogen responsive element*).

Gen *hsc70t* ulega aktywacji w spermatydach wczesnych myszy [109], produkt translacji natomiast wykrywany jest dopiero w spermatydach późnych [Fujiimoto, informacja ustna]. Transkrypty hybrydujące swoiście z wyżej wymienionymi genami wykryto także w jądrach innych gryzoni oraz w jądrach człowieka [111; Kravczyk, dane niepublikowane; Fujiimoto, informacja ustna]. W komórkach spermatogenicznych i plemnikach wykryto kilka białek pokrewnych z białkami rodziny HSP70 jednak ich pochodzenie nie jest wyjaśnione [89].

## VI. Geny rodziny *hsp70* kodujące białka bakteryjne mitochondrialne i chloroplastyczne

Genom *E. coli* zawiera jeden gen (*dnaK*) należący do rodziny *hsp70*. Gen transkrybowany jest w optymalnej temperaturze wzrostu bakterii i ulega silnej aktywacji pod wpływem szoku termicznego [112]. Transkrypcja genu *dnaK* jest aktywowana także przez wiele innych czynników np. etanol, niedobór związków węgla w pożywce czy pojawienie się w komórce nieprawidłowych białek [112, 114]. Białko DnaK wykazuje około 55% podobieństwa sekwencji aminokwasów do białka HSP70 *D. melanogaster* [113].

Geny szoku termicznego *E. coli*, a w tym także gen *dnaK* (razem około 20 genów), tworzą jednostkę funkcjonalną - regulon - kontrolowaną przez gen *rpoH* kodujący swoistą podjednostkę polimerazy RNA ( $\sigma^{32}$ ) [115]. Polimeraza RNA z podjednostką  $\sigma^{32}$

rozpoznaje wyłącznie promotory genów szoku cieplnego [116]. Białko DnaK jest negatywnym czynnikiem regulującym transkrypcję i hamuje swoiście ekspresję genów szoku termicznego *E. coli* prawdopodobnie poprzez modyfikację czynnika  $\sigma^{32}$  [117]. DnaK podobnie jak inne białka rodziny HSP70 wykazuje aktywność ATPazy [118]. Białko o znacznym stopniu podobieństwa sekwencji aminokwasów do białka DnaK syntetyzowane jest po wpływie szoku termicznego także w komórkach riketsji [119].

W genomie wiciowca *T. cruzi* [120] i *S. cerevisiae* [121] wykryto geny jądrowe należące do rodziny *hsp70* i kodujące białka mitochondrialne (odpowiednio *mtp70* i *SSC1p*). Spośród poznanych dotychczas białek należących do rodziny HSP70 najsilniejsze podobieństwo sekwencji aminokwasów do obu białek mitochondrialnych wykazuje białko DnaK.

Geny kodujące *mtp70* i *SSC1p* nie mają intronów. W regionie DNA poprzedzającym jednostkę transkrypcji genu *SSC1* znajdują się 3 sekwencje HSE i prawdopodobnie one powodują, że gen jest aktywowany przez szok termiczny. Gen *mtp70* odmiennie niż gen *SSC1* ulega w tych warunkach represji. Struktura regionu promotora genu *mtp70* nie jest poznana. Białka *mtp70* i *SSC1p* są podobnie jak białko GRP78 syntetyzowane w postaci cząsteczki prekursorowej, z której po translokacji białka do mitochondrium odszczepiony zostaje z końca N peptyd sygnałowy o długości około 30 aminokwasów.

Białko należące do rodziny *hsp70* wykryto także w chloroplastach *V. sinensis* [122]. Białko to jest kodowane przez DNA chloroplastów.

## VII. Funkcje białek kodowanych przez geny należące do rodziny HSP70

Funkcje białek należących do rodziny HSP70 są poznane w nieznacznym stopniu. O procesach komórkowych, w których mogą brać udział wnioskuje się na podstawie lokalizacji wewnątrzkomórkowej określonego białka oraz na podstawie właściwości kompleksów jakie tworzy ono z innymi makrocząsteczkami.

Najpełniej poznano niektóre funkcje białka DnaK *E. coli*, białek SSA1 i SSA2 *S. cerevisiae* oraz białka HSC70 ssaków. Przykłady dokumentujące kilka z wymienionych niżej funkcji omówiono w artykule B. Lipińskiej (1990) *Post. Biochem.* 36, 32-42.

Dobrze udokumentowana jest rola białka DnaK w replikacji faga lambda. W ostatniej fazie powstawania kompleksu inicjacyjnego białko DnaK powoduje jego rearanżację umożliwiając helikazie rozwijanie helisy DNA [123]. Mniej jasna jest rola białka DnaK w niezainfekowanych komórkach *E. coli*. Przypuszcza się, że może ono być elementem systemu proteolitycznego eliminującego białka o nieprawidłowej strukturze. Związek z replikacją DNA wydaje się mieć



białko HSP70A (HSX70) człowieka [28]. Ponieważ zwiększoną aktywność tego genu wykrywano także w innych fazach cyklu komórkowego [29-33] uzyskanie zgodnych wyników wymaga dalszych badań.

Dobrze udokumentowany jest udział białka HSC70 ssaków w transporcie substancji białkowych w cytoplazmie. W procesie zależnym od aktywności AT-Pazowej HSC70 zostają oddysocjowane z powierzchni pęcherzyków transportujących cząsteczki białka klatryny, co umożliwia kontakt między błonami pęcherzyka i docelowej struktury [124, 125].

Białko HSC70 (i prawdopodobnie także HSP70A) wykazują podobnie jak GRP78 (patrz Z. Krawczyk (1991) *Post. Biochem*, 37, (2), (70-75) wiele cech wskazujących na postulowaną przez P e l h a m a [126] ich funkcję "opiekuńczą" (*chaperon proteins*, [127]) polegającą na umożliwieniu polipeptydom przyjęcie bądź odzyskanie natywnej struktury, indukowanie przejściowych zmian konformacji polipeptydów oraz ochronę białka przed tworzeniem nieswoistych agregatów.

HSC70 tworzy słabe kompleksy z nowo powstającymi polipeptydami do momentu osiągnięcia przez syntetyzowane cząsteczki prawidłowej wielkości i konformacji [128]. Stabilne kompleksy tworzy HSC70 z polipeptydami o nieprawidłowej strukturze powstałej w wyniku wbudowania w łańcuch polipeptydowy analogów aminokwasów [128].

W komórkach *S. cerevisiae* białka SSA1 i SSA2 [129-131] a u ssaków prawdopodobnie białko HSC70 [132] uczestniczą (łącznie z innymi czynnikami cytozolu) w procesie translokacji polipeptydów z cytoplazmy do wnętrza siateczki śródplazmatycznej i do mitochondrium. Rola wymienionych białek w tym procesie polega przypuszczalnie na rozfałdowywaniu łańcucha polipeptydowego.

HSC70 lub białko pokrewne bierze także prawdopodobnie udział w procesie usuwania receptorów transferyny z powierzchni retikulocytów w czasie ostatniej fazy dojrzewania tych komórek [133].

Wydaje się, że jedną z funkcji białka HSP70 jest ochrona prorybosomów przed destruktywnym działaniem podwyższonej temperatury. Białko HSP70 syntetyzowane w odpowiedzi na szok termiczny oraz w komórkach zainfekowanych adenowirusem wędruje do jądra komórkowego wykazując tendencję do gromadzenia się w jąderku w strefie zawierającej komponentę granularną [103, 134-136]. Przywrócenie prawidłowych warunków fizjologicznych powoduje przemieszczenie się białka HSP70 z jądra do cytoplazmy przy czym ATP znacznie zwiększa szybkość odzyskiwania prawidłowej morfologii jąderka. Domena odpowiedzialna za właściwość wiązania się białka HSP70 z jąderkami znajduje się w części C-końcowej cząsteczki natomiast domena wiążąca ATP znajduje się w tej części cząsteczki, w której najsilniej zachowane jest podobieństwo struktury pierwszorzędowej

między białkami rodziny HSP70. Brak domeny wiążącej ATP nie zmienia właściwości cząsteczki HSP70 wiązania się z jąderkiem [135].

Białkom mtp70 i SSC1p przypisuje się funkcję utrzymywania prawidłowej konformacji innych białek mitochondrialnych [120, 121]. Podobieństwo sekwencji aminokwasów mtp70 i SSC1p do białka DnaK powoduje, że przypisuje się im rolę w replikacji mitochondrialnego DNA [120].

Udział białek z rodziny HSP70 w nabywaniu przez komórki termooporności jest ciągle przedmiotem kontrowersji [137]. Silną, pozytywną przesłanką jest zmniejszona przeżywalność w warunkach szoku termicznego fibroblastów, do których wprowadzono przez mikroinjekcję przeciwciała anti-HSP70 [138]. Istnieją jednak obserwacje wskazujące, że ani zwiększona ekspresja genów *hsp70* nie powoduje wzrostu termooporności, ani zahamowanie ekspresji tych genów nie zapobiega powstaniu termotolerancji (przykłady w pracy [137]; także [139]).

Aktywacja ekspresji genów z rodziny *hsp70* w procesie różnicowania (Rozdz. II-1), w określonych cyklach życiowych niektórych pasożytów [140-142], tworzenie przez białka HSC70 i HSP70 kompleksów z białkami transformującymi czy receptorami hormonów (Rozdz. IV) mogą odzwierciedlać udział białek rodziny HSP70 w regulacji swoistych procesów komórkowych. Problemy te wymagają jednak dalszych badań.

Ostatnio wykazano, że jeden z głównych antygenów *M. tuberculosis* i *M. laeprae* [143], a także u pasożytów *B. paharbi* i *B. malayi* [144] jest białkiem należącym do rodziny HSP70. Ze względu na znaczne międzygatunkowe podobieństwo strukturalne białek z grupy HSP70 istnieje możliwość występowania immunosupresji w przypadkach gdy antygen bakteryjny nie zostanie rozpoznany jako obca struktura. Istnieje także możliwość przeciwna, a mianowicie wystąpienie reakcji immunologicznej skierowanej na białka z grupy HSP70 prezentowane na powierzchni komórek gospodarza.

Opisano udział białka HSP70 (lub pokrewnego) w prezentacji antygeny (cytochrom c gołębia) przy współudziale antygenów powierzchniowych Ia [145]. W procesie prezentacji HSP70 tworzy kompleks z polipeptydem powstałym w wyniku proteolizy antygeny natomiast nie wiąże się z antygenem natywnym. Przeciwciała anti-HSP70 blokuje oddziaływanie komórek prezentujących antygen z limfocytami T. Jako nieprzypadkową uważa się lokalizację genu *hsp70A* człowieka [146] i genu *hsp70* szczura [147] w regionie kompleksu genów *MHC* kodujących antygeny zgodności tkankowej.

Doniesienia o wykrywaniu białek rodziny HSP70 (o których sądzono, że znajdują się wyłącznie w cytoplazmie) na powierzchni komórek pobudza do poszukiwań roli tych białek w oddziaływaniach międzykomórkowych, a pozytywne wyniki badań mogą mieć

w przyszłości znaczenie diagnostyczne. Badania nad rolą białek z grupy HSP70 w odpowiedzi immunologicznej i powstawaniem chorób autoimmunoagresywnych znajdują się jednak we wstępnej fazie badań [148].

Artykuł otrzymano 10 kwietnia 1990r.  
Zaakceptowano do druku 29 października 1990r.

## Piśmiennictwo

1. Lindquist S., (1986), *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 115-1191.
2. Lindquist S., Craig E.A., (1988), *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631-677.
3. Skowryra D., Żylicz M., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 259-276.
4. Ingolia T.D., Craig E.A., McCarthy B.J., (1980), *Cell*, **21**, 669-679.
5. Werner-Washburne M., Becker J., Kosic-Smithers J., Craig E., (1989), *J. Bacteriol.*, **171**, 2680-2688.
6. Mues G.I., Munn T.Z., Raese J.D., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 874-877.
7. Sorger P.K., Pelham H.R.B., (1987a), *EMBO J.*, **6**, 993-998.
8. Wiśniewski J., Krawczyk Z., (1988), *Mol. Biol. Rep.*, **13**, 21-28.
9. Hunt C., Morimoto R.I., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 6455-6459.
10. Schiller P., Amin J., Ananthan J., Brown M.E., Scott W.A., Voellmy R., (1988), *J. Mol. Biol.*, **203**, 97-105.
11. Lowe D.G., Moran L.A., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 2102-2112.
12. Ashburner M., Bonner J.J., (1979), *Cell*, **17**, 241-254.
13. Lanks K.W., (1986), *Exp. Cell Res.*, **165**, 1-10.
14. Sciandra J.J., Subjeck J.R., Hughes C.S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4843-4847.
15. Vass K., Welch W.I., Nowak T.S., (1988), *Acta Neuropathol.*, **77**, 128-135.
16. Brunet S., Giacomoni P.U., (1989), *Mutation Res.*, **219**, 217-224.
17. Whelan S.A., Hightower L.E., (1985), *J. Cell. Physiol.*, **125**, 251-258.
18. Nishimura R., Dwyer B.E., Cole R., De Vellis J., Picard K., (1989), *Exp. Cell Res.*, **180**, 276-280.
19. Gromoff E. D., Treier U., Beck C. F., (1989), *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3911-3918.
20. Nevins J., (1982), *Cell*, **29**, 913-919.
21. Collins P.L., Hightower L.E., (1982), *J. Virol.*, **44**, 703-707.
22. Khandijan E.W., Turler H., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1-8.
23. LaThangue N.B., Shriver K., Dawson C., Chan W.L., (1984), *EMBO J.*, **3**, 267-277.
24. Brown I.R., Rush S., Ivy G.O., (1989), *Neuron*, **2**, 1559-1564.
25. Horrell A., Shuttleworth J., Colman A., (1987), *Genes Develop.*, **1**, 433-444.
26. Banerji S.S., Laing K., Morimoto R.I., (1987), *Genes Develop.*, **1**, 946-953.
27. Theodorakis N.G., Zand D.J., Kotzbauer P.T., Williams G.T., Morimoto, (1989), *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3166-3173.
28. Milarski K.L., Welch W.J., Morimoto R.I., (1989), *J. Cell Biol.*, **108**, 413-423.
29. Kao H.-T., Capasso O., Heintz N., Nevins J.R., (1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 628-633.
30. Ohno K., Fukuhima M., Fujiwara M., Narumiya S., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 19764-19770.
31. Celis J.E., Lauridsen J.B., Basse B., (1988), *Exp. Cell Res.*, **177**, 176-185.
32. Kaczmarek L., Calabretta B., Kao H.-T., Heintz N., Nevins J., Baserga R., (1987), *J. Cell Biol.*, **104**, 183-187.
33. Ferris D.K., Harrel-Bellan A., Morimoto R.I., Welch W.J., Farrar W.L., (1988), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**, 3850-3854.
34. Zimmerman J.L., Petri W., Meselson M., (1983), *Cell*, **32**, 1161-1170.
35. Bensaude O., Morange M., (1983), *EMBO J.*, **2**, 173-177.
36. Curci A., Bevilacqua A., Mangia F., (1987), *Dev. Biol.*, **123**, 154-160.
37. Bonner J.J., Parks C., Parker-Thornburg J., Mortin M.A., Pelham H.R.B., (1984), *Cell*, **37**, 979-991.
38. Heikkila J.J., Miller J.G.O., Schultz G.A., Kloc M., Browder L.W., w *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress.* (1985) (red. Atkinson B.G., Walden D.B.) str. 135-158, Academic Press, Orlando.
39. Bienz M. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3138-3142.
40. Giudice G., (1989), *Develop. Growth Differ.*, **31**, 103-106.
41. Hensold J.O., Housman D.E., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2219-2223.
42. Aujame L., (1988), *Biochem. Cell Biol.*, **66**, 691-701.
43. Aujame L., (1986), *Can. J. Genet. Cytol.*, **28**, 1064-1075.
44. Mezger V., Bensaude O., Morange M., (1987), *Dev. Biol.*, **124**, 544-550.
45. White F.P., Currie R.W., (1982) w *Heat-shock: From bacteria to men.* (red. Schlesinger M.J., Ashburner M., Tissieres A.), str. 379-386, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
46. Bienz M., Pelham H.R.B., (1987), *Adv. Genet.*, **24**, 31-72.
47. Tanguay R.M., (1988), *Biochem. Cell Biol.*, **66**, 584-593.
48. Zimarino V., Wu C., (1987), *Nature (Lond.)*, **327**, 727-730.
49. Mosser D.D., Theodorakis N.G., Morimoto R.I., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4736-4744.
50. Amin J., Ananthan J., Voellmy R., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3761-3769.
51. Xiao H., Lis J.T., (1988), *Science*, **239**, 1139-1142.
52. Perisic O., Xiao H., Lis J.T., (1989), *Cell*, **59**, 797-806.
53. Pelham H.R.B. (1982), *Cell*, **30**, 517-528.
54. Dudler R., Travers A., (1984), *Cell*, **38**, 391-398.
55. Park H.-O., Craig E.H., (1989), *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2025-2033.
56. Riddihough G., Pelham H.R.B., (1986), *EMBO J.*, **5**, 1653-1658.
57. Kay R.J., Boissy R.J., Russnak R.H., Candido E., (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3134-3143.
58. Bienz M., Pelham H.R.B., (1986), *Cell*, **45**, 753-760.
59. Slater M.R., Craig E.A., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1906-1916.
60. Amin J., Mestrlil R., Schiller P., Dreano M., Voellmy R., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1055-1062.
61. Wu C., Wilson S., Walker B., David I., Paisley T., Zimarino V., Ueda H., (1987), *Science*, **238**, 1247-1253.
62. Wiederrecht G., Shuey D.J., Kibbe W.A., Parker C.S., (1987), *Cell*, **48**, 507-515.
63. Sorger P.K., Pelham H.R.B., (1987b), *EMBO J.*, **6**, 3035-3041.
64. Wiederrecht G., Seto D., Parker C.S., (1988), *Cell*, **54**, 841-853.
65. Sorger P.K., Pelham H.R.B., (1988), *Cell*, **54**, 855-864.
66. Sorger P.K., Nelson H.C.M., (1989), *Cell*, **59**, 807-813.
67. Larson J.S., Schuetz T.J., Kingston R.E., (1988), *Nature (Lond.)*, **335**, 372-375.
68. Sorger P.K., Lewis M.J., Pelham H.R.B., (1987), *Nature (Lond.)*, **329**, 81-84.
69. Zimarino V., Tsai C., Wu C., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 52-59.
70. Shuey D.J., Parker C.S., (1986a), *J. Biol. Chem.*, **261**, 7934-7940.
71. Shuey D.J., Parker C.S., (1986b), *Nature (Lond.)*, **323**, 459-461.
72. Rougvie A.E., Lis J.T., (1988), *Cell*, **54**, 795-804.
73. Morgan W.D., Williams G.T., Morimoto R.I., Greene J., Kingston R.E., Tian R., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1129-1138.

74. Wu B., Williams G.T., Morimoto R.I., (1987b), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2203-2207.
75. Simon M.C., Fisch T.M., Benecke B.J., Nevins J.R., Heintz N., (1988), *Cell*, **52**, 723-729.
76. Taylor I.C.A., Kingston R.E., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 165-175.
77. Morgan W.D., (1989), *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 4099-4104.
78. Taylor I.C.A., Kingston R.E., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 176-183.
79. Mezger V., Bensaude O., Morange M., (1989), *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3888-3896.
80. Ingolia T.D., Craig E.A., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 525-529.
81. Ingolia T.D., Slater M.R., Craig E.A., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1388-1398.
82. Palter K.B., Watanabe M., Stinson L., Mahowald A.P., Craig E.A., (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1187-1203.
83. Giebel L.B., Dworniczak B.P., Bautz E.K.F., (1988), *Dev. Biol.*, **125**, 200-207.
84. Dworniczak B., Mirault M-E., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5181-5197.
85. Munn T.Z., Mues G.I., (1988), *Nature (Lond.)*, **332**, 28.
86. Kothary R., Perry M.D., Moran L.A., Rossant J., (1987), *Dev. Biol.*, **121**, 342-348.
87. O'Malley K., Mauron A., Barchas J.D., Kedes L., (1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3476-3483.
88. de Toledo S.M., Murphy L.J., Hatton T.H., Friesman H.G., (1987), *Mol. Endocrinol.*, **1**, 430-434.
89. Maekawa M., O'Brien D.A., Allen R.L., Eddy E.M., (1989), *Biol. Reprod.*, **40**, 843-852.
90. Hahnel A.C., Gifford D.J., Heikkila J.J., Schultz G.A., (1986), *Terat. Carc. Mutagen.*, **6**, 493-510.
91. Bensaude O., Babinet M., Morange M., Jacob F., (1983), *Nature (Lond.)*, **305**, 331-333.
92. Carr B.I., Huand T.H., Buzin C.H., Itakura K., (1986), *Canc. Res.*, **46**, 5106-5111.
93. Krawczyk Z., Wiśniewski J., Mackiewicz M., Biesiada E., Chorągwa M., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, **1009**, 237-243.
94. Lane D.P., Benchimols., (1990), *Genes Develop.*, **4**, 1-8.
95. Pinhasi-Kimhi O., Michalovitz D., Ben-Zeev A., Oren M., (1986), *Nature (Lond.)*, **320**, 182-185.
96. Sturzbecher H.-W., Chumakow P., Welch W.J., Jenkins J.R., (1987), *Oncogene*, **1**, 201-211.
97. Hinds P.W., Finlay C.A., Frey A.B., Levine A.J., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2863-2869.
98. Finlay C.A., Hinds P.W., Tan T.-H., Oren M., Levine A.J., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 531-539.
99. Sturzbecher H.-W., Addison C., Jenkins J.R., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3740-3747.
100. Clarke C.F., Cheng K., Frey A.B., Stein R., Hinds P.W., Levine A.J., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1206-1215.
101. Sawai E.T., Butel J.S., (1989), *J. Virol.*, **63**, 396-397.
102. Walter G., Carbone A., Welch W.J., (1987), *J. Virol.*, **61**, 405-410.
103. White E., Spector D., Welch W., (1988), *J. Virol.*, **62**, 4153-4166.
104. Kost S.L., Smith D.F., Sullivan W.P., Welch W.J., Toft D.O., (1989), *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3829-3838.
105. Sanchez E.R., Farber L.E., Henzel W.J., Pratt W.B., (1990), *Biochemistry*, **29**, 5145-5152.
106. Krawczyk Z., Wiśniewski J., Biesiada E., (1988), *Acta Biochim. Polon.*, **35**, 377-385.
107. Wiśniewski J., Kordula T., Krawczyk Z., (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, **1048**, 93-99.
108. Zakeri Z.F., Wolgemuth D.J., Hunt C.R., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2925-2932.
109. Matsumoto M., Fujimoto H., (1990), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **166**, 43-49.
110. Krawczyk Z., Mali P., Parvinen M., (1988), *J. Cell Biol.*, **107**, 1317-1323.
111. Zakeri Z.F., Wolgemuth D.J., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1791-1796.
112. Neidhardt F.C., VanBogelen J.G., Voughn V., (1984), *Annu. Rev. Genet.*, **18**, 295-329.
113. Bardwell J.C.A., Craig E.A., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 848-852.
114. VanBogelen R.A., Kelley P.M., Neidhardt F.C., (1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 36-42.
115. Grossman A.D., Erickson J.W., Gross C.A., (1984), *Cell*, **38**, 383-390.
116. Cowing D.W., Bardwell J.C.A., Craig E.A., Woolford C., Hendrix R.W., Gross C.A., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2679-2683.
117. Tilly K., McKittrick N., Żylicz M., Georgopoulos C., (1983), *Cell*, **34**, 641-646.
118. Żylicz M., LeBowitz J., McMacken R., Georgopoulos C., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6431-6435.
119. Dascher C.C., Poddar S.K., Maniloff J., (1990), *J. Bacteriol.*, **172**, 1823-1827.
120. Engman D.M., Kirchhoff L.V., Donelson J.E., (1989), *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5163-5168.
121. Craig E.A., Kramer J., Shilling J., Werner-Washburne M., Holmes S., Kosic-Smithers J., Nicolet C.M., (1989), *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3000-3008.
122. Krishansamy S., Mannan R.M., Krishnan M., Gnanam J.E., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 5104-5109.
123. Alfano C., McMacken R., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 10699-10708.
124. Ungewickell E., (1985), *EMBO J.*, **4**, 3385-3391.
125. Chappel T.G., Welch W.J., Schlossman D.M., Palter K.B., Schlesinger M.J., Rothman J.E., (1986), *Cell*, **45**, 3-13.
126. Pelham H.R.B., (1986), *Cell*, **46**, 959-961.
127. Ellis R.J., Hemmingsen S.M., (1989), *TIBS*, **14**, 339-342.
128. Beckmann R.P., Mizzen L.A., Welch W.J., (1990), *Science*, **248**, 850-854.
129. Deshaies R.J., Koch B.D., Werner-Washburne M., Craig E.A., (1988), *Nature (Lond.)*, **332**, 800-805.
130. Chirico W.J., Waters M.G., Blobel G., (1988), *Nature (Lond.)*, **332**, 805-810.
131. Murakami H., Pain D., Blobel G., (1988), *J. Cell Biol.*, **107**, 2051-2057.
132. Zimmerman R., Sagstetter M., Lewis M., Pelham H.R.B., (1988), *EMBO J.*, **7**, 2875-2880.
133. Davis J.Q., Danseraud D., Johnstone R.M., Bennett V., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 15368-15371.
134. Welch W.J., Feramisco J.R., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4501-4513.
135. Milarski K.L., Morimoto R.I., (1989), *J. Cell Biol.*, **109**, 1947-1962.
136. Lewis M.J., Pelham H.R.B., (1985), *EMBO J.*, **4**, 3137-3143.
137. Carper S.W., Duffy J.J., Gerner E.W., (1987), *Canc. Res.*, **47**, 5249-5255.
138. Riabowol K.T., Mizzen L.A., Welch W.J., (1988), *Science*, **242**, 433-436.
139. Aujame L., Firko H., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5486-5494.
140. Van der Ploeg L.H.T., Giannini S.H., Cantor C.R., (1985), *Science*, **228**, 1443-1446.
141. Lawrence F., Robert-Gero M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4414-4417.
142. Yuckenberg P.D., Poupin F., Mansour T.A., (1987), *Exp. Parasitol.*, **63**, 301-311.
143. Young D., Lathirga R., Hendrix R., Sweetser D., Young R.A., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4267-4270.
144. Selkirk M.E., Denham D.A., Partono F., Maizels R.M., (1989), *J. Immunol.*, **143**, 299-308.
145. Vanbuskirk A., Crump B.L., Margoliash E., Pierce S.K., (1989), *J. Exp. Med.*, **170**, 1799-1808.
146. Sargent C.A., Duhnam I., Trowsdale J., Campbell R.D., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1968-1972.
147. Wurst W., Benesch C., Drabent B., Rothermel E., Benecke B.J., Gunther E., (1989), *Immunogenetics*, **30**, 46-49.
148. Kaufmann S.H.E., (1990), *Immunol. Today*, **11**, 129-136.

# Struktura, regulacja ekspresji i funkcja białek siateczki śródplazmatycznej GRP78 i GRP95

## Structure, expression, regulation and function of the endoplasmic-reticulum GRP78 and GRP95 proteins

ZDZISŁAW KRAWCZYK<sup>1</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Czynniki indukujące ekspresję genów *grp*
- III. Zróżnicowanie warunków syntezy białek GRP i HSP
- IV. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białek GRP78 i GRP95
- V. Ogólna charakterystyka białek GRP
- VI. Sekwencje sygnałowe białek GRP
- VII. Struktura regionu promotora genów *grp78* i *grp95*
- VIII. Funkcje białek GRP

### Contents:

- I. Introduction
- II. Inducers of the *grp* genes expression
- III. Differential induction of the GRP and HSP proteins
- IV. Intracellular localization of the GRP78 and GRP95 proteins
- V. Biochemical and structural properties of the GRP proteins
- VI. Regulatory sequences of the GRP proteins
- VII. Promoter structure of the *grp78* and *grp95* genes
- VIII. Functions of the GRP proteins

## I. Wstęp

Białka omawiane w prezentowanej pracy wykryto jako dwa główne polipeptydy o masie cząsteczkowej około 78 kDa i 95 kDa pojawiające się w komórkach embrionalnych kury i w fibroblastach nerki szczura [1, 2] transformowanych *in vitro* wirusem mięsaka Rousa. Indukcja syntezy obu białek nie była jednak związana jak wstępnie sądzono z transformacją nowotworową, lecz wynikała ze zubożenia pożywki w glukozę na skutek szybkiego wzrostu transformowanych komórek [3,4]. Aby podkreślić zależność ekspresji od stężenia glukozy zaproponowano dla obu białek nazwy GRP78 i GRP95 (*glucose regulated proteins*) [4].

Białko GRP78 kodowane jest przez gen należący do wielogenowej rodziny genów szoku termicznego *hsp70* [Z. Krawczyk, (1991) *Post. Biochem.*, 37 (2), 62-69]. Białko GRP78 jest tożsame z białkiem BiP wiążącym się z ciężkim łańcuchem immunoglobulin (*immunoglobulin heavy chain binding protein*), [5-7]. Z kolei białko GRP95 jest pokrewne z białkami szoku termicznego z rodziny HSP90 [8].

## II. Czynniki indukujące ekspresję genów *grp*

Zwiększone stężenie białek GRP w komórkach rosnących w pożywce zubożonej w glukozę sugerowało, że jednym z sygnałów aktywujących ekspresję genów *grp* jest zahamowanie glikozylacji białek komórkowych. Istotnie, zahamowanie (działaniem swoich inhibitorów [9, 10] lub w wyniku mutacji [3, 11, 12]) tych etapów glikozylacji, które zachodzą w siateczce śródplazmatycznej powodowało *in vitro* zwiększoną syntezę białek GRP78 i GRP95.

Na poziom ekspresji genów *grp* nie wpływa jednak zahamowanie końcowych etapów glikozylacji, które zachodzą w aparacie Golgiego [10]. W warunkach, w których następuje akumulacja białek GRP notowano także spadek stopnia glikozylacji białek mierzony ilością włączanej [6-<sup>3</sup>H] fukozy [13].

Silnymi czynnikami aktywującymi ekspresję genów *grp* są antybiotyki jonomycyna i A23187, jonofory o silnym powinowactwie do jonów wapnia [14-16]. Jonofory o powinowactwie do jonów K<sup>+</sup> bądź jonofory o mało zróżnicowanym powinowactwie do kationów nie wpływają na stopień ekspresji genów *grp* [16, 17].

Wzrost stężenia białek GRP w komórkach traktowanych jonoforami podobnie jak w komórkach rosnących w nieobecności glukozy jest spowodowany aktywacją transkrypcji genów kodujących te białka [16-19]. Cechą odróżniającą indukcję syntezy GRP przez jonofory od indukcji spowodowanej brakiem glukozy jest zarówno zwiększona szybkość jak i kilkakrotnie wyższy stopień akumulacji obu białek.

Mechanizm aktywacji genów *grp* nie jest w pełni poznany, sądzi się, że jest to mechanizm wielostopniowy. Warunkiem aktywacji transkrypcji genów *grp* przez jonofor jest ciągła obecność związku w pożywce prowadząca do długotrwałego, znacznego obniżenia ilości jonów wapnia w siateczce śródplazmatycznej, [18, 20, 21]. Zmiana stężenia wapnia w cytoplazmie odgrywa w procesie aktywacji mało istotną rolę [20]. Aktywacja genów *grp* w komórkach rosnących *in vitro* w pożywce pozbawionej glukozy nie jest poprzedzona uwalnianiem jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej [20]. Ponieważ jonofory i inhibitory glikozylacji

<sup>1</sup>Dr n. przyrod., Instytut Onkologii, Zakład Biologii Nowotworów, 44-100 Gliwice

nie stymulują syntezy mRNA GRP w obecności cykloheksimidu — związku hamującego biosyntezę białek — sądzi się, że transkrypcja genów w *grp* w przeciwieństwie do genów szoku termicznego aktywowana jest przez białko(a) syntetyzowane *de novo* [22].

Indukcję syntezy białek GRP niezależnie od stężenia glukozy obserwowano w różnych typach komórek infekowanych wirusami SV5 i *Sendai* [23], wirusem *Newcastle* [24], w komórkach CEF transformowanych wirusem *RSV* [25] i w komórkach *HeLa* infekowanych wirusem *polyoma* [26]. W ostatnim przypadku wykazano, że translacja mRNA genu *grp78* nie jest w przeciwieństwie do większości mRNA gospodarza zablokowana i przebiega z wykorzystaniem mechanizmu niezależnego od metylacji końca 5' cząsteczki (*cap-independent translation*).

Silnie aktywuje geny *grp in vitro* β-merkaptioetanol (0.25%) [27, 28], a także obniżenie pH pożywki do wartości 5.8-5.9 [28], niedotlenienie komórek [29], szok hipertoniczny [30], oraz insulina [27]. Aktywację genu *grp78* wykryto w komórkach białaczki erytroidalnej (linia K562) pobudzonych do różnicowania heminą [31], w fibroblastach myszy stymulowanych surowicą [32] oraz w komórkach Sertoliego pod wpływem wysokich stężeń testosteronu [33]. *In vivo* znacznie zwiększoną ekspresję genu *grp78* obserwowano w wątrobie szczura w kilkanaście godzin po wywołaniu odpowiedzi "ostrej fazy" [34].

### III. Zróżnicowanie warunków indukcji syntezy białek GRP i HSP

Podobieństwo cech strukturalnych i funkcjonalnych białek szoku cieplnego HSP70 i HSP90 do białek GRP skłaniało do poszukiwania odpowiedzi na pytanie czy istnieje zależność między ekspresją białek obu klas. Obserwacje nagromadzone w trakcie wcześniejszych badań są trudne w ocenie a otrzymane wyniki wskazywały na odmienną mechanizmów aktywacji genów *grp* i *hsp*.

Zróżnicowana reakcja genów *hsp70* i *grp78* na czynniki środowiskowe znalazła potwierdzenie w systematycznych badaniach [35]. W zależności od czynnika w komórkach *HeLa* obserwowano trzy typy odpowiedzi: akumulację białka GRP78 bez zmiany stężenia białka HSP70 (np. inhibitory glikozylacji); akumulację obu białek (np. metale ciężkie i analogi aminokwasów); akumulację białka GRP78 z jednoczesnym obniżeniem stężenia białka HSP70 (np. jonofory wapniowe i 2-deoksyglukoza). Wzrost stężenia białek GRP78 i HSP70 był spowodowany aktywacją układu transkrypcyjnego danego genu natomiast obserwowana represja syntezy białka HSP70 zachodziła na etapie potranskrypcyjnym.

### IV. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białek GRP78 i GRP95

Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka GRP78 ustalona została w sposób nie budzący kontrowersji. Wyniki wszystkich badań, w których stosowano metodę immunofluorescencji z użyciem zarówno monoklonalnych jak i poliklonalnych przeciwciał anty-GRP78 wykazywały, że białko znajduje się wyłącznie w siateczce śródplazmatycznej [5, 36, 37].

Ustalenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka GRP95 nastęczało więcej trudności. Początkowo, stosując przeciwciała poliklonalne anty-GRP95, białko wykrywano na powierzchni błony plazmatycznej [38, 39], bądź w strukturach aparatu Golgiego [14].

Przekonywujących danych wskazujących, że podobnie jak w przypadku GRP78, jedyną strukturą subkomórkową zawierającą białko GRP95 jest siateczka śródplazmatyczna dostarczyły badania Kocha i współautorów [40]. Nie jest nadal jasne dlaczego początkowo lokalizowano białko GRP95 na powierzchni błony komórkowej. Prawdopodobnie cząsteczki białka GRP95 (lub białka pokrewnego) mogły być uwalniane z uszkodzonych komórek i tworzyć agregaty na powierzchni komórek sąsiadujących podobnie jak to spostrzeżono w przypadku swoistego dla komórek mięsaka myszy (Meth A) antygeny o właściwościach białka GRP95 [41]. Ponadto, w warunkach doświadczeń mógł nastąpić spadek wapnia w siateczce śródplazmatycznej powodując sekrecję cząsteczek GRP95 [42].

Ostatnio, w mitochondriach komórek *HeLa* i fibroblastów szczura, wykryto białko należące do rodziny HSP70 (białko nazwano GRP75), którego wewnątrzkomórkowe stężenie rośnie pod wpływem czynników aktywujących geny *grp78* i *grp95* [43].

### V. Ogólna charakterystyka białek GRP

Dotychczas poznano sekwencje nukleotydowe genów *grp78* szczura [5], chomika [44], kury [25], myszy [45] i człowieka [46], pełną sekwencję genów *grp95* kury [47] i myszy [48] oraz częściową sekwencję genu *grp95* chomika [8]. Geny *grp78* występują prawdopodobnie w genomie wszystkich kręgowców. Ostatnio geny kodujące białko GRP78 wykryto także w komórkach pierwotniaka *P. falciparum* [49, 50], nicienia *C. elegans* [51] i drożdży *S. cerevisiae* [45, 52].

Podobieństwo sekwencji aminokwasów między białkami GRP78 wymienionych wyżej kręgowców przekracza 95% a podobieństwo GRP78 ssaków do białek *S. cerevisiae* i *C. elegans* wynosi odpowiednio około 65% i 77%.

Stopień podobieństwa sekwencji aminokwasów białka GRP78 i HSP70 ssaków wynosi około 60%. Ponadto w cząsteczce GRP78 można wyróżnić kilka regionów hydrofobowych o podobieństwie sekwencji

aminokwasów z białkami HSP70 przekraczającym 80% [46]. Sekwencje GRP95 kury, chomika i myszy są w około 50% podobne zarówno do sekwencji HSP90 *S. cerevisiae* jak i białka HSP83 *D. melanogaster*.

Białka GRP78 i GRP95 syntetyzowane są konstytutywnie w komórkach rosnących w prawidłowych warunkach fizjologicznych zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Stężenie białek GRP w tkankach zwierząt jest zróżnicowane; znaczne ilości GRP95 (lub mRNA) wykryto w narządach wydzielniczych: wątrobie i śledzionie oraz w komórkach szpiczaka myszy [40, 48], natomiast niewielkie ilości znaleziono w mózgu i mięśniach [40]. Białko GRP78 występuje w znacznych ilościach w komórkach limfoidalnych linii B, głównie w komórkach plazmatycznych [5]. *In vitro*, w komórkach mysich transformowanych metylocholanrenem, bleomycyną, i promieniowaniem ultrafioletowym poziom białek GRP jest znacznie większy niż w komórkach macierzystych [53].

Białka GRP charakteryzują się znaczną zawartością kwasu asparaginowego, glutaminowego i lizyny [14, 15]. GRP78 jest cząsteczką silnie hydrofilową; właściwość ta zaznacza się szczególnie w C-końcowym fragmencie cząsteczki o długości około 150 aminokwasów [46]. Białko GRP78 ma podobnie jak inne białka z rodziny *hsp70* silne powinowactwo do ATP, wykazując równocześnie słabą aktywność ATPazy [54, 55].

Jedyną wykrytą formą modyfikacji białka GRP95 jest glikozylacja [3, 14, 15]. Białko GRP78 może występować w formie rybozylowanej [56, 57] przy czym liczba przyłączonych reszt ADP-rybozy zmniejsza się znacznie w czasie szoku cieplnego bądź w czasie wzrostu komórek w pożywce bez glukozy. Może być ono również fosforylowane, natomiast nie ulega glikozylacji [14, 15, 57].

Istnieją mocne przesłanki wskazujące, że w wyniku swoistej tkankowo proteolizy białka GRP78 powstaje czynnik SAP (ang. *steroidogenesis activator polipeptide*) biorący udział w odszczepianiu bocznego łańcucha cholesterolu w czasie przemiany tego związku w pregnenolen. SAP jest polipeptydem składającym się z 30 aminokwasów, których sekwencja jest identyczna z sekwencją ostatnich 30 aminokwasów końca karboksylowego cząsteczki GRP78 [58].

## VI. Sekwencje sygnałowe białek GRP

Dojrzała cząsteczka GRP78 powstaje w wyniku odszczepienia z końca N prekursorowej cząsteczki polipeptydu o długości 16-18 aminokwasów u wyższych eukariontów [5, 13, 46] i 42 aminokwasów u *S. cerevisiae* [45, 52] wykazującego cechy strukturalne peptydów sygnałowych [59]. Peptyd sygnałowy umożliwia cząsteczce preGRP78 przechodzenie z cytoplazmy do wnętrza siateczki śródplazmatycznej [5, 37]. Usunięcie sekwencji kodującej peptyd sygnałowy po-

woduje równomierne rozproszenie zmutowanego białka GRP78 na terenie cytoplazmy. Z kolei zastąpienie sekwencji kodującej peptyd sygnałowy początkowymi kodonami genu *hsp70 Drosophila* powoduje gromadzenie się produktu translacji w jądrze komórkowym. Podobne właściwości ma polipeptyd sygnałowy GRP78 *S. cerevisiae* [45, 52]. Prawdopodobnie także białko GRP95 jest syntetyzowane jako cząsteczka prekursorowa, z której już w trakcie translacji odszczepiany jest N końcowy fragment o długości 21 aminokwasów [48].

Białka GRP78 i GRP95 należą do tych białek siateczki śródplazmatycznej, które nie są wydzielane. Za zatrzymanie białka GRP78 w świetle kanalików siateczki odpowiada C-końcowy fragment cząsteczki o sekwencji Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL w kodzie jednoliterowym) obecny także w innych białkach nie ulegających sekrecji [60]. Usunięcie bądź zmiana pozycji sekwencji KDEL powoduje sekrecję zmodyfikowanych cząsteczek GRP78. Z kolei przyłączenie tetrapeptydu KDEL do końca C białka sekrecyjnego zatrzymuje zmieniony polipeptyd w siateczce śródplazmatycznej [60]. GRP78 swobodnie migruje w świetle kanalików siateczki a brak tetrapeptydu KDEL nie zmienia szybkości migracji [61]. C-końcowy tetrapeptyd białka GRP78 *S. cerevisiae* ma sekwencję HDEL i pełni identyczną funkcję jak w białkach GRP78 wyższych eukariontów [52, 45].

Umieszczenie białka GRP95 w siateczce śródplazmatycznej było przedmiotem kontrowersji [48, 62] wydaje się jednak, że podobnie jak białko GRP78 nie jest ono zakotwiczone w błonie siateczki.

Mechanizm zatrzymywania w siateczce śródplazmatycznej białka GRP78 i innych białek zawierających sygnałowy peptyd KDEL jest obszernie dyskutowany w pracach [63,64]. W procesie segregacji uczestniczy prawdopodobnie swoisty receptor umiejscowiony w strefie między siateczką śródplazmatyczną i aparatem Golgiego. Mechanizm segregacji może być zaburzony w wyniku spadku stężenia jonów wapnia w siateczce śródplazmatycznej; np. w komórkach traktowanych jonoforami wapniowymi obserwowano sekrecję białka GRP95 [42].

## VII. Struktura regionu promotora genów *grp78* i *grp95*

Geny *grp78* wyższych eukariontów zawierają introny a struktura zarówno jednostki transkrypcji jak i regionu promotora wykazują znaczne międzygatunkowe podobieństwo [37, 46]. W genie *grp78* szczura elementy regulacyjne promotora o podstawowym znaczeniu dla ekspresji konstytutywnej i indukowanej jonoforem znajdują się we fragmencie promotora zawartym między -208 a -104 nukleotydem [65]. Wewnątrz tego fragmentu zidentyfikowano region o długości około 50 nukleotydów wiążący białka (czynniki

transkrypcyjne?) obecne w ekstraktach jąder komórek *HeLa*. Prawdopodobnie kluczową rolę w funkcjonowaniu promotora genu *grp78* gra sekwencja palindromowa GCCGCTTC-GAATCGGC znajdująca się wewnątrz regionu oddziaływań z białkami [65]. Podobna sekwencja występuje w promotorach genów *grp78* u różnych organizmów [65].

Promotor genów *grp95* różni się znacznie strukturą od promotora genów *grp78* za wyjątkiem krótkiej sekwencji nukleotydów o znacznym stopniu podobieństwa do fragmentu (część GAATCGGC) wymienionego wyżej palindromu [66].

W promotorze genu *grp78* szczura wykryto sekwencje wzmacniające transkrypcję (ang. *enhancer sequences*) [67, 68]. Istotną cechą "enhancera" genów *grp78* jest zachowywanie aktywności w niezróżnicowanych komórkach raka zarodkowego myszy podczas gdy funkcjonowanie sekwencji wzmacniających wirusów (np. SV 40, MSV) ulega w tych komórkach represji [69]. Interesująca jest obecność w regionie promotora genu *grp78* sekwencji zgodności CTGGGAA [Z. Krawczyk, dane niepublikowane] występującej także w promotorach genów kodujących białka ostrej fazy i warunkującej aktywację tych genów przez interleukinę-6 [70]. Być może sekwencja ta pełni także funkcję regulującą ekspresję genu *grp78*.

W odróżnieniu od genów *grp78* wyższych eukariontów gen *grp78 S.cerevisiae* jest genem bezintronowym a w regionie promotora występuje funkcjonalna sekwencja regulacyjna HSE (*heat shock element*) charakterystyczny dla genów szoku termicznego [45, 52].

## VIII. Funkcje białek GRP

Funkcje GRP78 i GRP95 są jeszcze - podobnie jak funkcje innych białek z rodzin HSP70 i HSP90 - przedmiotem spekulacji. O funkcji białka GRP78 wnioskuje się głównie na podstawie właściwości kompleksów jakie tworzy ono z innymi białkami.

Białko GRP78 tworzy stabilne kompleksy z polipeptydami o nieprawidłowej strukturze przestrzennej spowodowanej bądź niepełną glikozylacją cząsteczek, zablokowaniem tworzenia się wiązań dwusiarczkowych lub zmianą długości polipeptydu [10, 71-73]. W przeciwieństwie do polipeptydów natywnych nieprawidłowe polipeptydy związane z cząsteczkami GRP78 nie ulegają sekrecji poza siateczkę.

W komórkach pre-B oraz w komórkach szpiczaków wywodzących się z komórek pre-B w których syntetyzowany jest wyłącznie ciężki łańcuch immunoglobulin (łańcuch H) GRP78/BiP tworzy z tym polipeptydem trwały kompleks [7]. Podobnie GRP78 tworzy trwały kompleks z lekkim łańcuchem *kappa* immunoglobulin w komórkach szpiczaka myszy (linia NS-1), w których łańcuch ten jest syntetyzowany konstytutywnie natomiast zablokowana jest synteza łańcucha

H [74]. W obu wymienionych przypadkach polipeptydy nie ulegają sekrecji.

W tworzeniu kompleksów z białkami o nieprawidłowej konformacji uczestniczy niezmodyfikowana cząsteczka GRP78, natomiast w prawidłowych warunkach fizjologicznych znaczna frakcja cząsteczek GRP78 jest modyfikowana równocześnie przez fosforylację i przyłączenie ADP-rybozy [57]. Spadek endogennego stężenia GRP78 wywołany ekspresją wektora kodującego antysensowny RNA komplementarny do mRNA GRP78 powoduje sekrecję nie w pełni glikozylowanych polipeptydów [75].

Powstawanie trwałych kompleksów GRP78 z polipeptydami o nieprawidłowej konformacji interpretowane jest jako pośredni dowód na to, że białko to stanowi element systemu regulującego sekrecję białek komórkowych bądź (i) element systemu usuwania z kanalików siateczki śródplazmatycznej polipeptydów o nieprawidłowej strukturze.

Niezwykle istotne znaczenie mają obserwacje wskazujące na występowanie słabych oddziaływań białka GRP78 z polipeptydami. W komórkach plazmatycznych kompleks GRP78 z łańcuchem H powstaje przejściowo i rozpada się w czasie przyłączania łańcucha lekkiego immunoglobulin [36]. Miejscem wiązania się BiP jest prawdopodobnie region CH1 łańcucha ciężkiego ponieważ cząsteczka z delecją tego fragmentu ulega sekrecji [76]. Przejściowo GRP78 asocjuje także z monomerami hemaglutyniny zanim nastąpi oligomeryzacja białka [72, 77].

Białko GRP78 *S. cerevisiae* kodowane jest przez gen *KAR2*, jeden z grupy genów, których mutacja powoduje zaburzenia kariogamii [52]. Prawdopodobnie GRP78 drożdży pełni w siateczce śródplazmatycznej takie same funkcje jak analogiczne białko w komórkach wyższych eukariontów; wskazuje na to zwiększone stężenie tego białka w zmutowanych komórkach drożdży, w których zahamowana jest glikozylacja białek komórkowych [45, 52].

Istnienie w prawidłowych warunkach fizjologicznych słabych, przejściowych oddziaływań między GRP78/BiP i polipeptydami wydaje się potwierdzać hipotezę [78], że GRP78 jest jednym z białek "opiekuńczych" (*molecular chaperones* [79]) umożliwiających przyjęcie bądź odzyskanie innym białkom natywnej struktury.

Funkcja „opiekuńcza” GRP78 może wyrażać się uczestnictwem w prawidłowym fałdowaniu się nowopowstających peptydów bądź chronić je przed tworzeniem nieswoistych agregatów. Agregaty takie mogą powstawać w wyniku ekspozycji domen hydrofobowych lub rejonów obciążonych niezobojętnionym ładunkiem w czasie translacji, podczas zmiany konformacji polipeptydów w czasie penetracji błon siateczki śródplazmatycznej, lub też na skutek działania czynników denaturujących jak np. szok termiczny. W szczególności białko GRP78 mogłoby uczestniczyć w utrzymaniu prawidłowej konformacji polipep-

tydów w czasie długotrwałego, wieloetapowego procesu glikozylacji.

Struktura kompleksów GRP78 z polipeptydami nie jest poznana zarówno jeśli chodzi o skład cząsteczkowy, kształt przestrzenny jak i określenie miejsc kontaktu cząsteczek. Istotne znaczenie może mieć struktura pierwszorzędowa tego fragmentu polipeptydu, który bezpośrednio oddziałuje z cząsteczką GRP78. Wskazuje na to zależne od sekwencji aminokwasów znaczne różnicowanie mocy kompleksów jakie GRP78 tworzy z krótkimi syntetycznymi peptydami [55].

Dysocjacja kompleksów jest stymulowana przez ATP jednak rola tej cząsteczki nie jest w pełni określona. Sądzi się, że rozpad kompleksu wymaga energii wyzwolonej w wyniku hydrolizy ATP [55], jednak według innych badaczy hydroliza ATP nie jest wymagana i przyłączenie przez GRP78 cząsteczki ATP jest czynnikiem wystarczającym aby spowodować konieczne zmiany konformacyjne kompleksu [54].

Mniej jasna jest funkcja białka GRP95. Białko to będące głównym składnikiem siateczki śródplazmatycznej występuje w niektórych komórkach w ilościach równoważnych aktynie [40, 42]. Ponieważ, cząsteczki GRP95 mają zdolność wiązania jonów wapnia białko to może być elementem struktury magazynującej wapń w siateczce śródplazmatycznej [21, 40, 42]. Sugerowano także udział białka GRP95 w translokacji nowosyntetyzowanych polipeptydów z cytoplazmy do wnętrza siateczki śródplazmatycznej [48]. Niestety, badaniom funkcji białka GRP95 nie poświęcono na razie zbyt wiele uwagi.

Na początkowym etapie są także badania nad zmianami struktury chromatyny w komórkach, w których indukowana jest ekspresja genów *grp*. Ostatnio wykazano, że w komórkach CHO rosnących w warunkach niedotlenienia, w obecności 2-deoksyglukozy oraz w obecności jonoforu A23187 następuje szybka i selektywna ucieczka topoizomerazy II z jąder komórkowych, co w konsekwencji powoduje wystąpienie oporności na niektóre cytostatyki stabilizujące kowalencyjny kompleks topoizomerazy II z DNA [80].

Artykuł otrzymano 10 października 1989 r.

Zaakceptowano do druku 29 października 1990 r.

#### Addendum

Z biblioteki genomowej *S. cerevisiae* wyizolowano gen kodujący receptor rozpoznający C-terminalny tetrapeptyd HDEL białka GRP78 drożdży (Semenza i współautorzy, *Cell*, **61**, 1349-1357, (1990)).

Wykryto także w komórkach myszy białko będące prawdopodobnie receptorem rozpoznającym C-końcowy tetrapeptyd KDEL białka GRP78 ssaków (Vaux i współautorzy, *Nature*, **345**, 495-502, (1990)). Porównanie właściwości obu receptorów patrz art. przegl., (Warren, *Cell*, **62**, 1-2, (1990)). Co

do losu polipeptydów o nieprawidłowej strukturze tworzących kompleksy z GRP78/BiP patrz art. przegl. o degradacji białek w siateczce śródplazmatycznej (Klausner i Sitia, *Cell*, **62**, 611-614, (1990)).

#### Piśmiennictwo

1. Isaka, T., Yoshida, M., Owada, M., Toyoshima, K. (1975). *Virology*, 226-327.
2. Stone, K. R., Smith, R. E., Joklik, W. K. (1974). *Virology*, **58**, 86-100.
3. Pouyssegur, J., Shiu, R. P. C., Pastan, I. (1977). *Cell*, **11**, 941-947.
4. Shiu, R. P. C., Pouyssegur, J., Pastan, I. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3840-3844.
5. Munro, S., Pelham, H. R. B. (1986). *Cell*, **46**, 291-300.
6. Haas, I. G., Meo, T. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2250-2254.
7. Haas, I. G., Wabl, M. (1983). *Nature* **306**, 387-389.
8. Sorger, P. K., Pelham, H. R. B. (1987). *J. Mol. Biol.*, **194**, 341-344.
9. Olden, K., Pratt, R. M., Jaworski, C., Yamamada, K. M. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 791-795.
10. Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Getting, M.-J., Sambrook, J. (1988). *Nature* **332**, 462-465.
11. Melero, J. A. (1981). *J. Cell. Physiol.*, **109**, 59-67.
12. Lee, A. S., Wells, S., Kim, K. S., Scheffler, I. E. (1986). *J. Cell. Physiol.*, **129**, 227-282.
13. Chang, S. C., Wooden, S. K., Nakaki, T., Kim, K. S., Lin, A. Y., Kung, L., Attanello, J. W., Lee, A. S. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 680-684.
14. Welch, W. J., Garrels, J. I., Thomas, G. P., Lin, J. J.-C., Feramisco, J. R. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 7102-7011.
15. Lee, A. S., Bell, J., Ting, J. (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 4614-4621.
16. Martonosi, A. N., Dux, L., Terjung, R. L., Roufa, D. (1982). *Ann. Rev. N. Y. Acad. Sci.*, **402**, 485-514.
17. Resendes, E., Attanello, J. W., Grafsky, A., Chang, C. S., Lee, A. S. (1985). *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1212-1219.
18. Lee, A. S., Delagane, A. M., Baker, V., Chow, P. C. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 597-603.
19. Lin, A., Lee, A. S. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 988-992.
20. Drummond, I. A. S., Lee, A. S., Resendez, E. Jr., Steinhart, R. A. (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 12801-12805.
21. Sambrook, J. F. (1990). *Cell*, **61**, 197-199.
22. Resendez, E., Jr., Ting, J., Kim, K. S., Wooden, S. K., Lee, A. S. (1986). *J. Cell. Biol.*, **103**, 2145-2152.
23. Peluso, R. W., Lamb, R. A., Choppin, P. W. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6120-6124.
24. Collins, P. L., Hightower, L. E. (1982). *J. Virol.*, **44**, 703-707.
25. Stoeckle, M. Y., Sugano, S., Hamoe, A., Vashistha, A., Pellman, D., Hanafusa, H. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2675-2680.
26. Sarnow, P. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5795-5799.
27. Kim, Y. K., Kim, K. S., Lee, A. S. (1987). *J. Cell. Physiol.*, **133**, 553-559.
28. Whelan, S. A., Hightower, L. E. (1985). *J. Cell. Physiol.*, **125**, 251-258.
29. Sciandra, J. J., Subjeck, J. R., Hughes, C. S. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4843-4847.
30. Tanaka, K., Jay, G., Isselbacher, K. J. (1988). *Biochim. Biophys. Acta*, **950**, 138-146.
31. Theodorakis, N. G., Zand, D. J., Kotzbauer, P. T., Williams, G. T., Morimoto, R. I. (1989). *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3166-3173.
32. Parfett, C. L. J., Hofbauer, R., Brudzynski, K., Edwards, D. R., Denhardt, D. T. (1989). *Gene*, **82**, 291-303.
33. Day, A. R., Lee, A. S. (1989). *DNA*, **8**, 301-310.
34. Krawczyk, Z., Wiśniewski, J., Mackiewicz, M., Biesiada, E., Chorąży, M. (1989). *Biochim. Biophys. Acta.*, **1009**, 237-243.



35. Watowich, S. S., Morimoto, R. I. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 393-405.
36. Bole, D. G., Hendreshot, L. M., Kearney, J. F. (1986). *J. Cell Biol.*, **102**, 1558-1566.
37. Wooden, S. K., Kapur, R. P., Lee, A. S. (1988). *Exptl. Cell Res.*, **178**, 84-92.
38. Pouyssegur, J., Yamada, K. M. (1978). *Cell*, **13**, 139-150.
39. McCormick, P. J., Milis, A. J. T., Babiarz, B. (1982). *Exptl. Cell Res.*, **138**, 63-72.
40. Koch, G., Smith, M., Macer, J., Webster, P., Mortara, R. (1986). *J. Cell Sci.*, **86**, 217-232.
41. Ullrich, S. J., Robinson, E. A., Law, L. W., Willingham, M., Appella, E. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3121-3125.
42. Booth, C., Koch, G. L. E. (1989). *Cell*, **59**, 729-737.
43. Mizzen, L. A., Chang, C., Garrels, J. I., Welch W. J. (1989). *J. Biol. Chem.*, **264**, 20664-20675.
44. Ting, J., Wooden, S. K., Kriz, R., Kellerher, K., Kaufman, R. J., Lee, A. S. (1987). *Gene*, **55**, 147-152.
45. Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.-J., Sambrook, J. (1989). *Cell*, **57**, 1223-1236.
46. Ting, J., Lee, A. S. (1988). *DNA*, **7**, 275-286.
47. Kulomaa, M. S., Weigel, N. L., Kleinsek, D. A., Beattie, W. G., Conneely, O. M., March, C., Zarucki-Schulz, T., Schrader, W. T., O'Malley, B. W. (1986). *Biochemistry*, **25**, 6244-6251.
48. Mazarefla, R. A., Green M. (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 8875-8883.
49. Kumar, N., Syin, C., Carter, R., Quakyi, I., Miller, L. H. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6277-6281.
50. Mattei, D., Ozaki, L. S., Pereira da Silva, L. (1988). *Nuc. Aci. Res.*, **16**, 5204.
51. Heschl, M. F. P., Baillie, D. L. (1989). *DNA*, **8**, 233-243.
52. Rose, M. D., Misra, L. M., Vogel, J. P. (1989). *Cell*, **57**, 1211-1221.
53. Patierno, S. R., Tuscano, J. M., Kim, K. S., Landolph, J. R., Lee, A. S. (1987). *Cancer Res.*, **47**, 6220-6224.
54. Kassenbrock, C. K., Kelly, R. B. (1989). *EMBO J.*, **8**, 1461-1467.
55. Flynn, G. C., Chappel, T. G., Rothman, J. E. (1989). *Science*, **245**, 385-390.
56. Carlson, L., Lazarides, E. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4664-4668.
57. Hendreshot, L., Ting, J., Lee, A. S. (1988). *Mol. Cell Biol.*, **8**, 4250-4256.
58. Mertz, L. M., Pedersen, R. C. (1989). *Endocrine Res.*, **15**, 101-115.
59. Von Heine, G. (1990). *J. Membrane Biol.*, **115**, 195-201.
60. Munro, S., Pelham, H. R. B. (1987). *Cell*, **48**, 899-907.
61. Ceriotti, A., Colman, A. (1988). *EMBO J.*, **7**, 633-638.
62. Koçh, G. L. E., Macer, D. R. J., Wooding, F. B. P. (1988). *J. Cell Sci.*, **90**, 485-491.
63. Pelham, H. R. B. (1988). *EMBO J.*, **7**, 913-918.
64. Pelham, H. R. B. (1989). *EMBO J.*, **8**, 3171-3176.
65. Resendez, E., Jr., Wooden, S. K., Lee, A. S. (1988). *Mol. Cell Biol.*, **8**, 4579-4584.
66. Chang, S. C., Erwin, A. E., Lee, A. S. (1989). *Mol. Cell Biol.*, **9**, 2153-2156.
67. Lin, A. Y., Chang, S. C., Lee, A. S. (1986). *Mol. Cell Biol.*, **6**, 1235-1243.
68. Kim, Y. K., Lee, A. S. (1989). *Gene*, **77**, 123-131.
69. Kim, K. S., Kim, Y. K., Lee, A. S. (1990). *Differentiation*, **42**, 153-159.
70. Heinrich, P. C., Castel, J. V., Andus, T. (1990). *Biochem. J.*, **265**, 621-636.
71. Kassenbrock, C. K., Garcia, P. D., Walter, P., Kelly, R. B. (1988). *Nature*, **333**, 90-92.
72. Gething, M. J., McCammon, Sambrook, J. (1986). *Cell*, **46**, 939-950.
73. Dorner, A. J., Bole, D. G., Kaufman, R. J. (1987). *J. Cell Biol.*, **105**, 2665-2674.
74. Nakaki, T., Deana, R. J., Lee, A. L. (1989). *Mol. Cell Biol.*, **9**, 2233-2238.
75. Dorner, A. J., Krane, M. G., Kaufman, R. J. (1988). *Mol. Cell Biol.*, **8**, 4063-4070.
76. Hendreshot, L., Bole, D., Kohler, G., Kearney, J. F. (1987). *J. Cell Biol.*, **104**, 761-767.
77. Ng, D. T. W., Randall, R. E., Lamb, R. A. (1989). *J. Cell Biol.*, **109**, 3273-3289.
78. Pelham, H. (1988). *Nature*, **332**, 776-777.
79. Ellis R. J., Hemmingsen, S. M. (1989). *TIBS*, **14**, 339-342.
80. Shen, J.-W., Subjeck, J. R., Lock, R. B., Ross, W. E. (1989). *Mol. Cell Biol.*, **9**, 3284-3291.

# Molekularne i genetyczne podstawy układu grupowego Gerbich ludzkich erytrocytów

## Molecular and genetic basis of blood-group Gerbich system of human erythrocytes

EWA JAŚKIEWICZ<sup>1</sup>

### Spis treści:

- I. Serologiczna identyfikacja antygenów Gerbich
- II. Lokalizacja antygenów Gerbich
  - II-1. Glikoforyny ludzkich erytrocytów
  - II-2. Glikoforyny erytrocytów Gerbich-negatywnych
  - II-3. Lokalizacja antygenów Ge2 i Ge3 w obrębie glikoforyn C i D
  - II-4. Geny wariantów strukturalnych glikoforyn C u osób Ge(-)

- III. Rola glikoforyn C i D w utrzymywaniu normalnego kształtu erytrocytów
- IV. Podsumowanie

### Contents:

- I. Serological identification of Gerbich blood-group antigens
- II. Localization of Gerbich antigens
  - II-1. Glycophorins of human erythrocytes
  - II-2. Glycophorins of Ge-negative erythrocytes
  - II-3. Localization of Ge2 and Ge3 antigens on glycophorins C and D
  - II-4. Genes for structural variants of glycophorin C in Ge(-) individuals

<sup>1</sup>Mgr, Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław

### III. Role of glycophorin C and D in maintaining the normal red cell shape

#### IV. Conclusions

Wykaz skrótów: Ge(+) - Gerbich-pozytywny, Ge(-) - Gerbich-negatywny, Gf. - glikoforyna, kpz - tysiąc par zasad.

## I. Serologiczna identyfikacja antygenów Gerbich

Układ grupowy Gerbich został zidentyfikowany w 1960 r. przez znalezienie w surowicy ciężarnej pacjentki (p. Gerbich) przeciwciał aglutynujących wszystkie badane krwinki za wyjątkiem jej własnych [1, 2]. Antygen rozpoznawany przez te przeciwciała został nazwany Gerbich (Ge), a erythrocyty pacjentki i inne znalezione później, które nie były aglutynowane przez te przeciwciała oznaczono jako Gerbich-negatywne [Ge(-)] [1]. Znalezienie następnych osób z przeciwciałami anti-Gerbich wykazało złożoność tego układu grupowego. Cypryjka pochodzenia tureckiego (p. Yussef) posiadała izoprzeciwciała, które aglutynowały wszystkie erythrocyty Gerbich-pozytywne [Ge(+)] i nie aglutynowały krwinek własnych pacjentki jak również erythrocytów Ge(-) [1, 3]. Jednakże erythrocyty p. Yussef były aglutynowane przez przeciwciała znalezione u p. Gerbich. Wykazało to zatem istnienie dwóch fenotypów krwinek Ge(-), oznaczonych jako: typ Gerbich (nie aglutynowane przez żadną surowicę anti-Gerbich) i typ Yus (nie aglutynowane przez przeciwciała znalezione u p. Yussef, ale aglutynowane przez surowicę p. Gerbich). Odmienne typy krwinek Ge(-) znaleziono u Melanezyjczyków z Nowej Gwinei, którzy posiadali przeciwciała anti-Gerbich nieaglutynujące ich erythrocyty i innych erythrocytów Ge(-). Krwinki ich były aglutynowane przez poprzednio znalezione przeciwciała typu Gerbich i Yus [1, 4, 5].

W związku z tym uznano, że układ grupowy Gerbich obejmuje co najmniej trzy antygeny (Ge1, Ge2, Ge3) powszechnie obecne w erythrocytach (fenotyp Ge(+)) oznaczony jako Ge1, 2, 3, oraz że rzadkie erythrocyty Ge(-) występują w postaci trzech fenotypów:

- oryginalnego fenotypu Gerbich-negatywnego, oznaczonego jako G-1-2-3
- wariantu fenotypu Ge(-), tzw. fenotypu Yus, oznaczonego jako Ge-1-2, 3
- fenotypu oznaczonego jako Ge-1, 2, 3, występującego jedynie u Melanezyjczyków.

Do chwili obecnej znaleziono kilkanaście osób o fenotypie Gerbich lub Yus wśród mieszkańców różnych kontynentów i przedstawicieli różnych ras [1]. Jedynie wśród Melanezyjczyków częstotliwość występowania fenotypu Ge-1, 2, 3, oraz Ge-1-2-3 (Gerbich) jest znacznie większa i waha się odpowiednio w granicach 0 - 0.3 oraz 0 - 0.8, w zależności od badanej populacji [1, 4]. Antygeny układu Gerbich są przekazywane zgodnie z prawami dziedziczenia [1, 2, 6, 7].

Powstało pytanie czy całkowity lub częściowy brak antygenów Gerbich na erythrocytach ma swoje konsekwencje w funkcjonowaniu samej krwinki, bądź kondycji całego organizmu. Z obserwacji wynika, że u osób Ge(-) o fenotypach Gerbich i Yus mogą występować przeciwciała o swoistości anti-Gerbich, samoistnie [1, 5, 8] jak również w wyniku immunizacji krwinkami Ge(+), podczas ciąży lub transfuzji [1-3, 9-12]. Przeciwciała te mogą być typu Yus (anti-Ge2) oraz typu Gerbich (anti-Ge3) [1, 13]. U osób tych nie obserwuje się żadnych zaburzeń hematologicznych. Znane są natomiast przypadki anemii hemolitycznej u osób Gerbich-pozytywnych na tle obecności we krwi autoprzeciwciał anti-Gerbich [1, 14, 15]. Krwinki osób Ge(-) typów Gerbich i Yus są na ogół morfologicznie identyczne z krwinkami osób Ge(+), [17, 18], za wyjątkiem opisanych ostatnio, przez Anstee'go i współautorów [16], osób o fenotypie Ge-1-2-3, posiadających we krwi obwodowej około 10% erythrocytów o kształcie eliptycznym (eliptocytoza). Powyższy wariant fenotypu Ge(-) otrzymał nazwę Leach.

W artykule tym omówione są badania z okresu ostatnich 5 lat, które doprowadziły do poznania struktury i lokalizacji antygenów Gerbich i ich związku z budową i funkcjonowaniem krwinki.

## II. Lokalizacja antygenów Gerbich

### II-1. Glikoforyny ludzkich erythrocytów

Z membraną komórkową erythrocytów związanych jest szereg białek integralnych, tzn. przebijających błonę komórkową, oraz peryferyjnych (Tab. 1)

Białka peryferyjne są zlokalizowane od cytoplazmatycznej strony membrany, tworząc tzw. szkielet komórkowy [19, 20]. Głównymi białkami integralnymi są: białko 3 (transporter anionów) oraz glikoforyny. W membranie ludzkich erythrocytów występują cztery podstawowe glikoforyny: A, B, C i D [21, 22] (Ryc. 1).

Różnią się one między sobą zarówno pod względem ilości w membranie jak i struktury. W wyniku analizy glikoforyn oraz odpowiadających im cDNA została poznana sekwencja aminokwasowa glikoforyn A, B i C oraz miejsca glikozylacji i budowa łańcuchów cukrowych [22].

Glikoforyna A, główna sjałoglikoproteina erythrocytów ludzkich, posiada łańcuch polipeptydowy składający się ze 131 reszt aminokwasowych [23, 24], zróżnicowany genetycznie w obrębie 1-ej i 5-ej reszty aminokwasowej (odpowiednio Ser/Leu oraz Gly/Glu). Sekwencje te stanowią determinanty antygenowe M i N układu grupowego MN ludzkich erythrocytów [22].

Glikoforyna B, druga pod względem ilości glikoproteina membran, posiada łańcuch polipeptydowy składający się z 71 reszt aminokwasowych. Fragment

**Tabela 1**

Główne białka związane z membraną ludzkich erytrocytów [wg 20]

Składnik	Ciężar cząsteczkowy	
1	Spektryna	
1	podjednostka $\alpha$	240.000
2	podjednostka $\beta$	220.000
2.1	Ankiryryna	200.000
2.2		190.000
2.3		180.000
2.6		150.000
3	Białko transportujące aniony	95.000
4.1a		80.000
4.1b		78.000
4.2		72.000
4.9		48.000
5	Aktyryna	43.000
6	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	35.000
7		29.000
7a		29.000
7b		27.000
8		24.000
Gf. A	Glikoforyna A*	43.000
Gf. B	Glikoforyna B	22.000
Gf. C	Glikoforyna C	39.000
Gf. D	Glikoforyna D	25.000

\*Pozorny ciężar cząsteczkowy został wyznaczony w oparciu o migrację monomeru w elektroforezie w żelu poliakrylamidowym.

glikoforyny B do 26 reszty aminokwasowej jest identyczny z glikoforyną A typu N, a w dalszej części łańcucha jest również kilka odcinków homologicznych z glikoforyną A. Glikoforyna B podobnie jak glikoforyna A jest zróżnicowana genetycznie, a polimorfizm dotyczy 29-ej reszty aminokwasowej (Met/Thr), co stanowi odpowiednio antygen grupowy S i s układu grupowego Ss [22].

Łańcuch polipeptydowy glikoforyny C, trzeciej pod względem ilości glikoproteiny membran erytrocytów, składa się ze 128 reszt aminokwasowych i nie wykazuje podobieństwa strukturalnego do glikoforyn A i B.

Ponadto, nie stwierdzono w jego obrębie genetycznie uwarunkowanego zróżnicowania dotyczącego reszt aminokwasowych [25, 26, 27].

Z resztami seryny i treoniny łańcucha polipeptydowego glikoforyn A, B i C związanych jest 0-glikozydowo odpowiednio około 15, 11, 12 łańcuchów cukrowych [22] o strukturze: [28, 29]

Glikoforyna B nie posiada łańcucha N-glikozydowego, natomiast z resztą asparaginy w pozycji 26 glikoforyny A i w pozycji 8 glikoforyny C związany jest N-glikozydowo jeden łańcuch cukrowy o strukturze kompleksowej [22, 30, 31].

W oparciu o analizę cDNA dla glikoforyny C immunochemiczne dowody podobieństwa glikoforyn C i D [32, 33] zaproponowano, że czwarta glikoforyna membran, glikoforyna D, stanowi fragment glikoforyny C, począwszy od 22-ej reszty metioniny [34, 35] (Ryc. 2). Brak 21 N-końcowych reszt aminokwasowych powoduje utratę 6 0-glikozydowych łańcuchów cukrowych i łańcucha N-glikozydowego, co wpływa na obniżenie ciężaru cząsteczkowego glikoforyny D, w stosunku do glikoforyny C.

Ostatnio, sugestia ta została potwierdzona przez podanie częściowej sekwencji aminokwasowej glikoforyny D [36].

Cechą wspólną wszystkich glikoforyn jest ich trójdomenowa budowa [22, 23], na którą składają się:

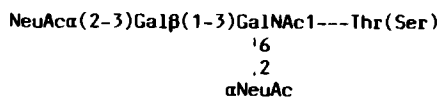
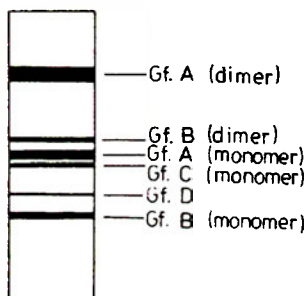
- N-końcowy, glikozylowany zewnątrzmembranowy fragment łańcucha polipeptydowego
- hydrofobowy segment wewnątrzmembranowy
- fragment cytoplazmatyczny

## II-2. Glikoforyny erytrocytów Gerbich-negatywnych

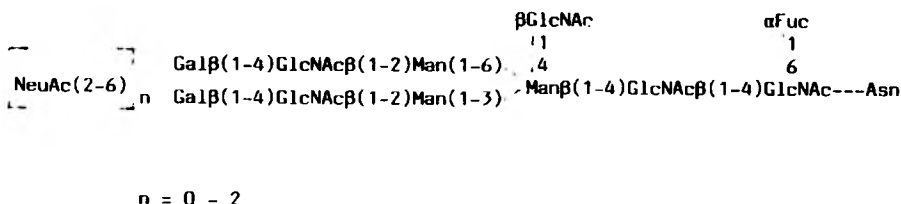
Analiza membran erytrocytów metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym wykazała nieobecność glikoforyn C i D w membranach erytrocytów Ge(-)

Wzór I

Ryc. 1. Schemat pasm glikoproteinywnych membran erytrocytów ludzkich uzyskiwanych w elektroforezie, w żelu poliakrylamidowym, w obecności SDS [wg 21].



Wzór II



fenotypów: Gerbich<sup>+</sup>Yus i Leach [16, 17, 37]. W membranach erytrocytów typu Gerbich i Yus zidentyfikowano jednocześnie (obok glikoforyn A i B) nowy składnik glikoproteinowy nie występujący w membranach erytrocytów Gerbich-pozytywnych i Ge(-) typu Leach [17, 18, 32, 37, 38]. Składnik ten migruje w elektroforezie jako szeroki prążek i wykazuje pozorny ciężar cząsteczkowy, niższy od glikoforyny C i nieco różny w erytrocytach typu Gerbich (30.5 - 34.5 tys.) i Yus (32.5 - 36.5 tys.) [17, 37]. Wykazuje on podobieństwo strukturalne do glikoforyn C i D, ponieważ reaguje z monoklonalnymi przeciwciałami posiadającymi miejsca wiązania w obrębie N-końcowego zewnątrzmembranowego fragmentu glikoforyny C [17, 33, 34] i reaguje z surowicą rozpoznającą cytoplazmatyczne fragmenty glikoforyn C i D [33]. Stwierdzono również, że wariantowa glikoproteina (nowy składnik glikoproteinowy) posiada N-glikozydowo związany łańcuch cukrowy [33, 34], który może reprezentować strukturę typu poli-N-acetylolaktozaminowego, nieobecna w glikoforynach A i C [33]. Fakt, że wariantowa glikoproteina migruje w elektroforezie jako szeroki, rozdyfundowany prążek, przypisuje się heterogenności w rozmiarze tego N-glikanu [33].

W oparciu o immunochemiczne dowody pokrewieństwa glikoforyn C, D i nowego składnika glikoproteinowego zaproponowano, że składnik ten może być hybrydą składającą się z N-końcowego fragmentu glikoforyny C i C-końcowego fragmentu glikoforyny D, powstający w wyniku *crossing-over* między odrębnymi genami kodującymi glikoforynę C i D [17, 33, 37]. Ta koncepcja okazała się jednak nieprawdziwa w świetle badań genetycznych osób Gerbich-negatywnych, omówionych w dalszej części artykułu [34, 35, 39, 40].

### II-3. Lokalizacja antygenów Ge2 i Ge3 w obrębie glikoforyn C i D

Fakt braku glikoforyn C i D u osób Gerbich-negatywnych stał się podstawą do przypuszczenia, że antygeny Gerbich znajdują się na tych cząsteczkach. Zostało to potwierdzone przy użyciu techniki immunoblottingu membran erytrocytów Gerbich-pozytywnych z zastosowaniem ludzkich surowic o swois-

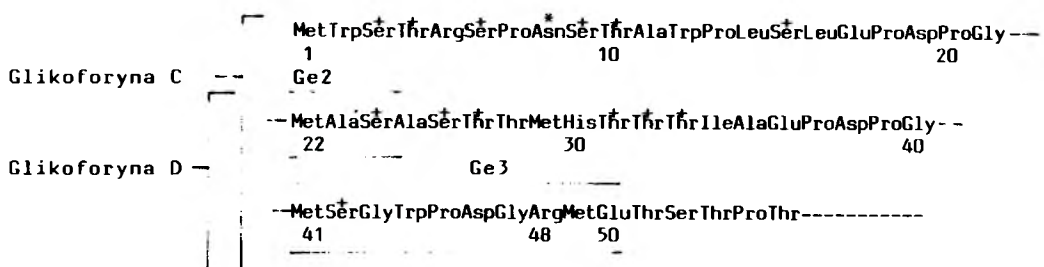
tości anty-Gerbich. Da h r i w s p ó ł a u t o r z y [32] wykazali, że posiadane przez nich surowice o swoistości anty-Ge2 reagują wyłącznie z glikoforyną D, natomiast surowice o swoistości anty-Ge3 reagują zarówno z glikoforyną C jak i D. Badając wpływ trawienia trypsyną oraz modyfikacji chemicznych cząsteczek glikoforyn C i D na reakcję z przeciwciałami anty-Gerbich, autorzy ci ustalili położenie antygenów Ge2 i Ge3 (Ryc. 2).

Antygen Ge3 zlokalizowano na N-końcowym glikozylowanym fragmencie glikoforyny C, w okolicy miejsca trawienia trypsyną, tzn. reszty argininy w pozycji 48 oraz na odpowiadającym fragmencie glikoforyny D. Modyfikacje chemiczne wykazały udział w miejscu wiązania (epitopie) reszt: metioniny, tryptofanu, argininy kwasu glutaminowego i/lub asparaginowego, występujących w łańcuchu odpowiednio w pozycjach: 41 i 49, 44, 48, 50 i 46. Epitop ten może obejmować łańcuch cukrowy związany z seryną w pozycji 42.

Antygen Ge2 jest związany wyłącznie z N-końcowym fragmentem trypsynowym glikoforyny D. W oparciu o sugestię, że struktura glikoforyny D jest identyczna z glikoforyną C począwszy od 22-jej reszty metioniny, uznano, że unikalny epitop Ge2 może stanowić tylko N-końcowa reszta metioniny wraz z sąsiadującymi resztami aminokwasowymi i łańcuchami cukrowymi związanymi 0-glikozydowo z resztami seryny i treoniny. Nie udało się jednak tej sugestii potwierdzić poprzez chemiczną modyfikację N-końcowej metioniny i jej grupy aminowej. Ponadto, obok danych stwierdzających reakcję surowicy anty-Ge2 wyłącznie z glikoforyną D [32,41] były też doniesienia, że surowice anty-Ge2 reagują zarówno z glikoforyną C jak i D [15, 42]. W świetle tych niejednoznacznych wyników należy uznać charakter epitopu Ge2 za nieustalony.

Niezwykle użytecznym narzędziem w badaniu struktury antygenów Gerbich mogłyby się okazać przeciwciała monoklonalne o swoistości antyGe2 i anty-Ge3. Jakkolwiek ostatnio otrzymano szereg monoklonalnych przeciwciał swoistych dla glikoforyny C [7, 16, 38, 43, 44, 45], nie ma wśród nich przeciwciał anty-Gerbich. Większość z nich rozpoznaje epitop glikoforyny C obejmujący N-końcową resztę metioniny z wolną grupą aminową oraz łańcuchy cukrowe związane 0-glikozydowo z resztami seryny i treoniny [45].

Ryc. 2. Hipotetyczna struktura glikoforyny D [wg 35, 36] i lokalizacja antygenów Ge2 i Ge3 na cząsteczkach glikoforyn C i D [wg 32]. Znakami: + i ★ zaznaczono miejsca glikozylacji (+ - łańcuch cukrowy O-glikozydowy, ★ łańcuch cukrowy N-glikozydowy)



Inne monoklonalne przeciwciała rozpoznają epitopy zlokalizowane niedaleko N-końca, (reszty aminokwasowe między poz. 2 a 21) [45]. Świadczy to o znacznie większej immunogenności tych regionów w porównaniu z sekwencją aminokwasową odpowiadającą antygenom Ge2 i Ge3.

#### II-4. Geny wariantów strukturalnych glikoforyny C w membranach osób Gerbich-negatywnych

W celu wyjaśnienia strukturalnego związku między glikoforynami C, D i nowym składnikiem glikoproteinowym, występującym u osób Ge(-) o fenotypie Gerbich i Yus, wyizolowano i scharakteryzowano gen dla glikoforyny C u osób Ge(+) i Ge(-) [34, 35, 39, 40]. Stwierdzono, że u osób Ge(+) normalny gen dla glikoforyny C (o długości 13,5 kbp) zawiera cztery sekwencje kodujące (eksony), oddzielone trzema sekwencjami intronowymi (niekodującymi) [39, 40].

Eksony 1, 2, 3 i 4 kodują odpowiednio sekwencje aminokwasowe: 1-16, 17-35, 36-63, 64-128 glikoforyny C [39, 40]. U osób Gerbich-negatywnych istnieje gen dla glikoforyny C, lecz o zmniejszonym ciężarze cząsteczkowym. Delecja w DNA fenotypu Yus i Gerbich ma identyczny rozmiar (rzędu 3,3 - 3,4 kbp) lecz prowadzi do utraty innych sekwencji kodujących: eksonu 2 i eksonu 3 odpowiednio [39, 40].

W DNA fenotypu Leach delecja w obrębie genu dla glikoforyny C jest rzędu co najmniej 4,5 kbp, obejmuje część eksonu 3 i ekson 4, i odpowiada C-końcowemu fragmentowi łańcucha polipeptydowego wraz z domeną wewnątrzmembranową [35, 40]. Translacja genu u osób Ge(-) prowadzi więc do powstania, zamiast glikoforyny C, jej wariantów strukturalnych (Ryc. 3).

Łańcuch polipeptydowy wariantu strukturalnego glikoforyny C u osób o fenotypie Gerbich jest pozbawiony 28 wewnętrznych reszt aminokwasowych (w poz. 36 - 63) fragmentu zewnątrzmembranowego, w tym reszt 41 - 50, stanowiących antygen Ge3. Delecja u osób o fenotypie Yus ma natomiast mniejszy zasięg i prowadzi do utraty 19 reszt aminokwasowych (w poz.

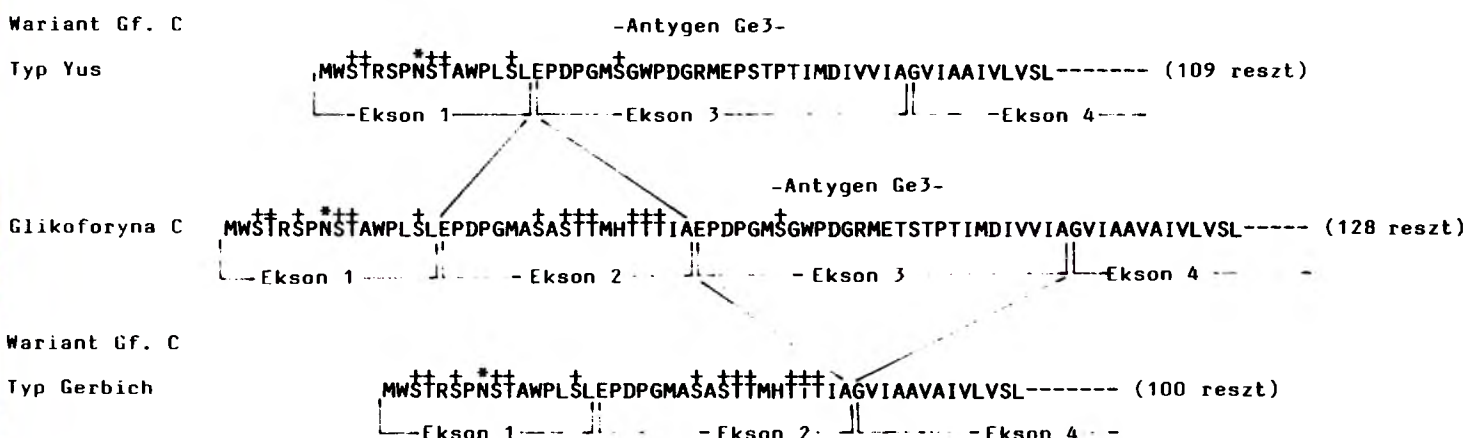
17 -35) z zachowaniem sekwencji stanowiącej antygen Ge3. Zmiana w obrębie genu dla glikoforyny C u osób o fenotypie Gerbich i Yus prowadzi zatem do powstania glikoprotein różniących się od glikoforyny C strukturą zewnątrzmembranowego fragmentu łańcucha polipeptydowego zidentyfikowanych wcześniej elektroforetycznie jako „nowe składniki glikoproteinowe”.

Konsekwencją zmiany genu dla glikoforyny C u osób o fenotypie Leach jest brak fragmentu wewnątrzmembranowego w łańcuchu polipeptydowym, przy niezmienionym fragmencie zewnątrzmembranowym glikoforyny C. Nawet, jeśli zachodziłaby synteza takiego produktu, nie miałby on możliwości utrzymania się w membranie i jak przypusza się byłby on degradowany w komórce [35, 40].

W oparciu o analizę genu dla glikoforyny C, podczas której nie stwierdzono odrębnego genu dla glikoforyny D [34, 35] oraz na podstawie wspólnych właściwości obu cząsteczek [32, 33], jak również faktu, że u osób Ge(-) brakowi glikoforyny C towarzyszy zawsze brak glikoforyny D, zaproponowano strukturę glikoforyny D (Ryc. 2) jako produktu tego samego genu co glikoforyna C [34, 35, 40]. Podano przynajmniej dwa możliwe mechanizmy prowadzące do syntezy glikoforyny D, jako skróconego produktu:

- 1/ Bezpośredni produkt transkrypcji genu dla glikoforyny C - prekursorowy mRNA jest w wyniku potranskrypcyjnej modyfikacji (*alternative splicing*) przekształcany w dwie różniące się nieco cząsteczki mRNA, z których jedna koduje glikoforynę C a druga glikoforynę D [34].
- 2/ Inicjacja translacji mRNA dla glikoforyny C może zachodzić od kodonu metioniny, stanowiącej pozycję 1 jej łańcucha polipeptydowego oraz od następnego kodonu metioniny, stanowiącej resztę 22 łańcucha polipeptydowego glikoforyny C (*leaky initiation*). Daje to glikoforynę C i mniejszą ilość produktu skróconego o 21 reszt aminokwasowych, czyli glikoforynę D [35]. Sytuacja taka jest możliwa, ponieważ sekwencja zasad nukleotydowych, po-

Ryc. 3. Hipotetyczna struktura wariantów glikoforyny C [wg 39, 40]. Nazwy reszt aminokwasowych podano w kodzie jednoliterowym [wg 65].



przedzających pierwszy z kodonów metioniny niezupełnie odpowiada regułom rozpoczęcia translacji [46] i może być pomijana.

Tak więc glikoforyny C, D i warianty strukturalne glikoforyny C u osób Ge(-) są produktami tego samego genu [34, 35, 47], a nie jak sugerowano wcześniej odrębnych genów dla glikoforyny C i D, mogących tworzyć w wyniku *crossing-over* hybrydową glikoforynę C-D u osób Ge(-). Na podstawie analizy genu dla glikoforyny C, która wykazała istnienie w jego obrębie dwóch homologicznych domen (o długości 3,3 - 3,4 kpz), przypuszcza się, że defektywne geny u osób o fenotypie Gerbich i Yus mogą powstawać w wyniku nierównego *crossing-over* zachodzącego między tymi dwiema domenami [39, 40].

### III. Rola glikoforyn C i D w utrzymaniu normalnego kształtu erytrocytów

Ściśle określona funkcja oraz specyficzne środowisko życia jakim jest krwioobieg implikują budowę erytrocytów. Konieczność wielokrotnego przechodzenia przez naczynia włosowate, podczas którego krwinka ulega znacznej deformacji, wymaga struktury elastycznej i jednocześnie dostatecznie sztywnej, aby krwinka mogła swobodnie powrócić do pierwotnego kształtu. Warunki te doskonale spełnia szkielet komórkowy - dwuwymiarowa podmembranowa sieć polipeptydowa, której podstawowymi składnikami są: aktyna, spektryna i białko 4.1 [19, 20] (Ryc. 4).

Szkielet ten oddziałuje z membraną komórkową w dwojaki sposób: za pośrednictwem białka 4.1, które stabilizuje wiązanie aktyny i spektryny [19, 48, 49, 50], a równocześnie wiąże cytoplazmatyczne fragmenty glikoforyny C [19, 20, 51, 52] i białka 3 (53), jak również przy udziale ankiryiny, wiążącej spektrynę i białko 3 [20, 54]. Kształt erytrocytu jest zatem tworzony i utrzymywany przez złożoną strukturę, a zmiany w jej obrębie prowadzą do deformacji komórki. Opisano zaburzenia objęte wspólną nazwą dziedzicznej eliptycytozy, polegające na obecności we krwi obwodowej erytrocytów o zmienionych kształtach z towarzyszącą temu anemią hemolityczną, u podstaw których leżą w większości przypadków:

- częściowy brak spektryny [55, 56] lub zmiany struktury jej podjednostek  $\alpha$  [57, 58] i  $\beta$  [59, 60].
- całkowity lub częściowy brak białka 4.1 [52, 61, 62] lub występowanie jego wariantów strukturalnych [63].

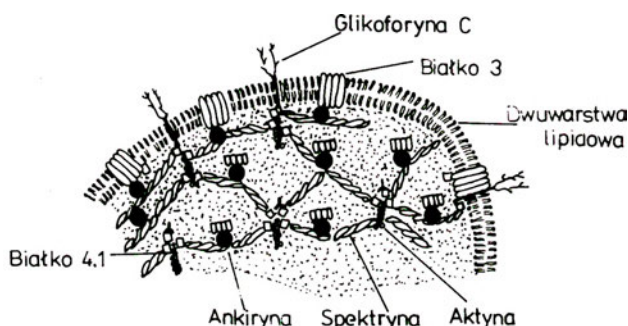
Jak zostało wspomniane we wstępie wariant Leach fenotypu Ge(-) jest związany z łagodną eliptycytozą (10% erytrocytów krwi obwodowej ma kształt eliptyczny). Analiza membran tych erytrocytów nie wykazała zaburzeń dotyczących spektryny i białka 4.1 [47], lecz jedynie nieobecność glikoforyn C i D oraz ich wariantu strukturalnego [16, 17]. Biorąc pod uwagę fakt oddziaływania glikoforyny C ze szkieletem komórkowym [20, 51, 52] i występowanie eliptycytozy towarzyszącej brakowi tej glikoforyny w membranach erytrocytów o fenotypie Leach, zaproponowano udział glikoforyny C (i D) w utrzymywaniu prawidłowego kształtu erytrocytów [16, 17, 47, 64]. Na potwierdzenie tej koncepcji wykazano obniżenie stabilności i wzrost podatności krwinek Leach na deformację [42, 64]. Zachowanie normalnego kształtu erytrocytów u osób Ge(-) o fenotypach Gerbich i Yus, mimo braku glikoforyn C i D, zapewnia natomiast wariant strukturalny glikoforyny C, który przypuszczalnie przejmuje jej funkcje w wiązaniu szkieletu komórkowego poprzez niezmienny fragment cytoplazmatyczny [17, 18, 35].

Identyfikacja roli glikoforyn C i D, polegającej na udziale w utrzymywaniu prawidłowego kształtu krwinki, odróżnia te glikoforyny od glikoforyn A i B, których funkcja jak dotychczas nie jest wyjaśniona [22].

### IV. Podsumowanie

1. W obrębie układu grupowego Gerbich ludzkich erytrocytów rozróżnia się trzy antygeny: Ge1, Ge2, Ge3.
2. Antygeny Ge2 i Ge3 zlokalizowane są na dwóch integralnych i strukturalnie pokrewnych glikoproteinach membran erytrocytów - glikoforynie C i D. Antygen Ge2 stanowi prawdopodobnie N-końcowy glikozylowany fragment łańcucha polipeptydowego glikoforyny D. Antygen Ge3 znajduje się w obrębie reszt aminokwasowych 41 - 50 glikoforyny C i odpowiadających im reszt glikoforyny D. Z uwagi na trudniejszy dostęp do surowicy o swoistości anti-Ge1, brak jest danych na temat struktury antygeny Ge1.
3. Brak antygenów Gerbich u osób Ge(-) związany jest z brakiem glikoforyn C i D w błonach (fenotyp Leach) lub ich zastąpieniem przez wariantowe formy glikoforyny C (fenotyp Gerbich i Yus).
4. Glikoforyna C, D i warianty strukturalne glikoforyny C u osób Ge(-) są kodowane przez jeden gen.
5. Właściwości erytrocytów Ge(-) typu Leach wykazują udział glikoforyn C i D w utrzymywaniu prawidłowego kształtu erytrocytów.

Ryc. 4. Model struktury szkieletu komórkowego związanego z membraną ludzkich erytrocytów [wg 19].



Artykuł otrzymano 10 czerwca 1989 r.  
Zaakceptowano do druku 28 listopada 1989 r.

## Piśmiennictwo

1. Reid M. E. (1986). *Med. Lab. Sci.* **43**, 177-182.
2. Rosenfield R. E., Haber G. V., Kissmeyer-Nielsen F., Jack J. A., Sanger R., Race R. R. (1960). *Brit. J. Haematol.* **6**, 344-349.
3. Barnes R., Lewis T. L. T. (1961). *Lancet*, **11**, Vol. II, 1285-1286.
4. Booth P. B., McLoughkin K. (1972). *Vox Sang.* **22**, 73-84.
5. MacGregor A., Booth P. B. (1973). *Vox Sang.* **25**, 474-478.
6. Daniels G. L., Shaw M. -A., Judson P. A., Reid M. E., Anstee D. J., Colpits P., Cornwall S., Moore B. P. L., Lee S. (1986). *Vox Sang.* **50**, 117-121.
7. Anderson S. E., McKenzie J. L., McLoughlin K., Beard M. E. J., Hart D. N. J. (1986). *Pathology*, **18**, 407-412.
8. McLoughkin K., Rogers J. (1970). *Vox Sang.* **19**, 94-96.
9. Fermepin G. H., Perez-Prado A., De Pippig T. F., Brito J., De Avena C. S. (1968). *Vox Sang.* **14**, 228-229.
10. Peddle L. J., Josephos J. E., Lawton A. (1970). *Vox Sang.* **18**, 547-550.
11. Booth P. B., Albrey J. A., Whittaker J., Sanger R. (1970). *Nature (Lond.)* **228**, 462.
12. Nunn H. D., Giles C. M., Seidl S. (1967). *Vox Sang.* **13**, 23-26.
13. Daniels G. L. (1982). *Transfusion*, **22**, 405.
14. Reynolds M. V., Vengelen-Tyler V., Morel P. A. (1981). *Vox Sang.* **41**, 61-67.
15. Reid M. E., Vengelen-Tyler V., Shulman I., Reynolds M. V. (1988). *Brit. J. Haematol.* **69**, 61-66.
16. Anstee D. J., Parsons S. F., Ridgwell K., Tanner M. J. A., Merry A. H., Thomson E. E., Judson P. A., Johnson P., Bates S., Fraser I. D. (1984). *Biochem J.* **218**, 615-619.
17. Anstee D. J., Ridgwell K., Tanner M. J. A., Daniels G. L., Parsons S. F. (1984). *Biochem J.* **221**, 97-104.
18. Reid M. E., Anstee D. J., Jensen R. H., Mohandas N. (1987). *Brit. J. Haematol.* **67**, 467-472.
19. Bennett V. (1989). *Biochim. Biophys. Acta.* **988**, 107-121.
20. Goodman S. R., Krebs K. E., Whitfield C. F., Zagon I. S. (1988). *Crit. Rev. Biochem.* **23**, 171-234.
21. Furthmayr H. (1978). *J. Supramol.* **79**, s.9.
22. Lisowska E. (1988) w *Molecular Immunology of Complex Carbohydrates*, (red. Wu A. M.), Adv. in Exp. Med. & Biol. t. 228, str. 265-316; Plenum Press, New York.
23. Tomita M., Marchesi V. T. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 2964-2968.
24. Tomita M., Furthmayr H., Marchesi V. T. (1978). *Biochemistry*, **17**, 4756.
25. Dahr W., Beyreuther K., Kordowicz M., Kruger J. (1982). *Eur. J. Biochem.* **125**, 57-62.
26. Blanchard D., Dahr W., Hummel M., Latron F., Beyreuther K., Cartron J.-P. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 5808-5811.
27. Colin Y., Rahuel C., London J., Romeo P.-H., d'Auriol L., Galibert F., Cartron J.-P. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 229-233.
28. Thomas D. B., Winzler R. J. (1969). *J. Biol. Chem.* **244**, 5943.
29. Lisowska E., Duk M., Dahr W. (1980). *Carbohydr. Res.* **79**, 103-113.
30. Yoshida H., Furthmayr H., Kobata A. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 9713-9718.
31. Irimura T., Tsuji T., Tagami S., Yamamoto K., Osawa T. (1981). *Biochemistry*, **20**, 560-566.
32. Dahr W., Kiedrowski S., Blanchard D., Hermand P., Moulds J. J., Cartron J.-P. (1987). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **368**, 1375-1383.
33. Reid M. E., Anstee D. J., Tanner M. J. A., Ridgwell K., Nurse G. T. (1987). *Biochem J.* **244**, 123-128.
34. Le Van Kim C., Colin Y., Blanchard D., Dahr W., London J., Cartron J.-P. (1987). *Eur. J. Biochem.* **165**, 571-579.
35. Tanner M. J. A., High S., Martin P. G., Anstee D. J., Judson P. A., Jones T. J. (1988). *Biochem. J.* **250**, 407-414.
36. El-Maliki B., Blanchard D., Dahr W., Beyreuther K., Cartron J.-P. (1989). *Eur. J. Biochem.* **183**, 639-643.
37. Dahr W., Moulds J., Baumeister G., Moulds M., Kiedrowski S., Hummel M. (1985). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **366**, 201-211.
38. Telen M. J., Bolk T. A. (1987). *Transfusion*, **25**, 309-317.
39. Colin Y., Le Van Kim C., Tsapis A., Clarget M., d'Auriol L., London J., Galibert F., Cartron J.-P. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 3773-3780.
40. High S., Tanner M. J. A., MacDonald E. B., Anstee D. J. (1989). *Biochem J.* **262**, 47-54.
41. Daniels G. L., Reid M. E., Anstee D. J., Beattie K. M., Judd W. J. (1988). *Brit. J. Haematol.* **70**, 477-481.
42. Kuczmarski C. A., Orlina A. R., Delahanty L. K., Kuczmarski E. R. (1987). *Vox Sang.* **52**, 36-42.
43. Daniels G. L., Banting G., Goodfellow P. (1983). *J. Immunogenet.* **10**, 103-105.
44. Rouger P., Lee H., Juszczyk G., Doinel C., Edelman L. (1983). *J. Immunogenet.* **10**, 333-335.
45. Dahr W., Blanchard D., Kiedrowski S., Pochman A., Cartron J.-P., Moulds J. J. (1989). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **370**, 849-854.
46. Kozak M. (1984). *Nucleic Acids Res.* **12**, 857-872.
47. Anstee D. J., Tanner M. J. A. (1988). *Blood Reviews*, **2**, 115-120.
48. Ohanian V., Wolfe L. C., John K. M., Pinder J. C., Lux S. E., Gratzer W. B. (1984). *Biochemistry*, **23**, 4416-4420.
49. Cohen C. M., Langley R. C. (1984). *Biochemistry*, **23**, 4488-4495.
50. Correas I., Leto T. L., Speicher D. W., Marchesi V. T. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 3310-3315.
51. Mueller T. J., Morrison M. (1981), w *Erythrocyte Membranes 2: Recent Clinical and Experimental Advances*, (red. Kruckeberg W., Eaton J., Brewer G.), str. 95, Alan R. Liss, Inc. New York.
52. Sondag D., Alloisio N., Blanchard D., DucluzEAU M.-T., Colonna P., Bachir D., Bloy Ch., Cartron J.-P., Delaunay J. (1987). *Brit. J. Haematol.* **65**, 43-50.
53. Pasternack G. R., Anderson R. A., Leto T. L., Marchesi V. T. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 3676-3683.
54. Bennett V., Stenbuck P. J. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 6424-6432.
55. Agre P., Casella J. F., Zinkham W. H., McMillan C., Bennet N. (1985). *Nature (Lond.)* **314**, 380-383.
56. Agre P., Asimos A., Casella J. F., McMillan C. (1986). *New. Eng. J. Med.* **315**, 1579-1583.
57. Marchesi S. L., Letsinger J. T., Speicher D. W., Marchesi V. T., Agre P., Hyun B., Gulati G. (1987). *J. Clin. Invest.* **80**, 191-198.
58. Lane P. A., Shew R. L., Iarocci T. A., Mohandas N., Hays T., Mentzler W. C. (1987). *J. Clin. Invest.* **79**, 989-996.
59. Dhermy D., Lecomte M. C., Garbarz M., Bournier O., Galand C., Gautero H., Feo C., Alloisio N., Delaunay J., Boivin P. (1982). *J. Clin. Invest.* **70**, 707-715.
60. Johnson R. M., Ravindranath Y. (1985). *Blood*, **66**, suppl. 1 (abstr.).
61. Conboy J., Mohandas N., Tchernia G., Kan Y. W. (1986). *N. Engl. J. Med.* **315**, 680-684.
62. Morle L., Garbarz M., Alloisio N., Girot R., Chaverocche I., Boivin P., Delaunay J. (1985). *Blood*, **65**, 1511-1517.
63. McGuire M., Smith B. L., Agre P. (1988). *Blood*, **72**, 287-293.
64. Reid M. E., Chasis J. A., Mohandas N. (1987). *Blood*, **69**, 1068-1072.
65. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1968). *Eur. J. Biochem.* **5**, 151-153.

# Zastosowanie zmodyfikowanych oligonukleotydów w badaniach nad mechanizmem działania endonukleazy Eco RI

## Application of modified oligonucleotides in the studies on the mechanism of Eco RI endonuclease action

MARIA KOZIOŁKIEWICZ<sup>1</sup>

### Spis treści:

- I. Metody modyfikowania wiązań internukleotydowych
- II. Tiofosforanowe i O-etylofosfotriestrowe analogi oligonukleotydów — ich zastosowanie w badaniach nad mechanizmem działania restryktazy Eco RI
- III. Podsumowanie

### Contents:

- I. Modifications of the internucleotide bonds
- II. Phosphorothioate and O-ethylphosphotriester analogues of oligonucleotides — their application in the studies on the mechanism of Eco RI endonuclease action
- III. Conclusions

### Wykaz stosowanych skrótów:

svPDE fosfodiesteraza z jadu węża; nP1 nukleaza P1; RP-HPLC wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa na odwróconej fazie; AP alkaliczna fosfataza; pdN, pdN<sup>+</sup> fosforany deoksynukleozydów; dN, dN<sup>+</sup> — deoksynukleozydy; TEAA octan trietyloamoniowy; TEAB węglan trietyloamoniowy; 5'-DMT grupa dimetoksytrytylowa blokująca funkcję 5'-hydroksylową oligonukleotydu; 5'-HO grupa 5'-hydroksylowa oligonukleotydu.

Możliwości zastosowania syntetycznych oligonukleotydów w badaniach oddziaływań między białkami i DNA pojawiły się z chwilą opracowania tzw. amidofosforanowej metody syntezy fragmentów DNA [1], tzn. na początku lat 80-tych. Ponieważ metoda ta oferuje duże możliwości modyfikowania oligonukleotydów zarówno w obrębie zasad, jak i szkieletu fosforanowocukrowego, stało się możliwe badanie tych oddziaływań za pomocą różnorodnych analogów DNA.

### I. Metody modyfikowania wiązań internukleotydowych

Wyniki uzyskane dzięki metodzie Siebenlista i Gilberta [2,3] („alkylation protection and alkylation interference”) wskazywały, iż w specyficznych oddziaływaniach białek i DNA mają udział nie tylko

zasady, ale również wiązania internukleotydowe. W związku z tym wzrosło zainteresowanie analogami DNA zawierającymi zmodyfikowane reszty fosforanowe.

Jedną z najczęściej stosowanych metod modyfikowania internukleotydowych reszt fosforanowych jest zamiana nieestrowego atomu tlenu na atom siarki (prowadząca do utworzenia grupy tiofosforanowej) lub alkilowanie wiązania internukleotydowego (prowadzące do utworzenia grupy fosfotriestrowej). Podstawienie nieestrowego atomu tlenu atomem siarki zmienia dystrybucję ładunku w modyfikowanym wiązaniu i powoduje zlokalizowanie go na atomie siarki [4]. Natomiast alkilowanie wiązania internukleotydowego prowadzi do utraty jednostkowego ładunku ujemnego, co eliminuje interakcje o charakterze jonowym i może powodować zaburzenia w sposobie oddziaływania tak zmodyfikowanego fragmentu DNA z białkiem. Dodatkowym czynnikiem destabilizującym kompleks białko-DNA może być efekt steryczny związany z obecnością grupy alkilowej. Wywołana w ten sposób destabilizacja kompleksu zależy od wielkości grupy alkilowej. Alkilowanie za pomocą etylnitrozomocznika opracowane przez Siebenlista i Gilberta pozwala na wprowadzenie do DNA grupy etylowej. Natomiast stosowane dotychczas chemiczne metody syntezy fosfotriestrowych analogów DNA pozwalają na modyfikowanie wiązań internukleotydowych za pomocą grupy etylowej [5], izopropylowej [6] lub trifluoroetylowej [7]. Objętościowo najmniejszą grupą wśród wyżej wymienionych jest grupa etylowa (promień van der Waalsa — 4,5 Å), toteż deformacja struktury DNA wywołana jej obecnością jest mniejsza w porównaniu ze zmianami spowodowanymi przez pozostałe grupy. Z tego względu grupa etylowa jest lepszym niż pozostałe elementem modyfikującym wiązania internukleotydowe w fosfotriestrowych analogach DNA.

Tiofosforanowe i fosfotriestrowe analogi oligonukleotydów umożliwiają nie tylko identyfikację niektórych miejsc kontaktu między białkiem i szkieletem fosforanowym, ale również badania tzw. stereochemicznych aspektów oddziaływań między tymi makrocząsteczkami. Należy bowiem pamiętać, iż nieestrowe

<sup>1</sup>Dr, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź



atomy tlenu wiązań internukleotydomych są topologicznie nierównocenne i różnią się między sobą położeniem w helisie DNA. Jeden z nich jest skierowany do wewnątrz, natomiast drugi — na zewnątrz helisy. Z tego względu ich udział w oddziaływaniach z łańcuchami bocznymi aminokwasów białka może być różny. Modyfikacja wiązań internukleotydomych za pomocą siarki lub grup alkilowych umożliwia „ekspresję” ich nierównocennego charakteru, będącego efektem różnego położenia w helisie DNA.

Ze stereochemicznego punktu widzenia zastąpienie jednego z nieestrowych atomów tlenu atomem siarki lub zestyfikowanie grupą alkilową wywołuje chiralność reszty fosforanowej wynikającą z obecności czterech różnych podstawników związanych z atomem fosforu. Utworzone w ten sposób chiralne tiofosforany lub fosfotriestry występują w postaci diastereoizomerów różniących się położeniem elementu modyfikującego. Ich konfiguracje absolutne określone za pomocą reguł Cahn, Ingolda i Preloga [8] definiuje się jako Rp i Sp. W cząsteczce diastereoizomeru Rp tiofosforanowego oraz O-etylofosfotriestrowego analogu DNA element modyfikujący (atom siarki lub grupa etylowa) jest skierowany do dużej bruzdy, natomiast w cząsteczce izomeru Sp — na zewnątrz helisy DNA. Warunkiem zastosowania tego typu analogów w badaniach stereochemicznych aspektów oddziaływań między białkami i DNA jest uzyskanie rozdzielonych diastereoizomerów oraz znajomość położenia w ich cząsteczkach elementu modyfikującego. (Metoda Siebenlist i Gilberta jest nieprzydatna w tego typu badaniach, ponieważ produktem działania etylnitrozomocznika jest mieszanina różnorodnych alkilopochodnych DNA.)

Z prac nad endonukleazą Eco RI (prowadzonych przez Ecksteina [9] oraz, niezależnie, Steca i Zona [10]) wynika, iż tylko jeden z atomów tlenu wiązania internukleotydomych pomiędzy G i A jest zaangażowany w oddziaływanie z enzymem. Jest to atom tlenu pro-S skierowany na zewnątrz helisy DNA. Podstawienie go atomem siarki czyni diastereoizomer Sp modyfikowanego oktameru d[GG(s)AATTCC] odpornym na działanie endonukleazy Eco RI, podczas gdy podobna modyfikacja w odniesieniu do atomu tlenu pro-R jedynie obniża szybkość hydrolizy diastereoizomeru Rp.

W związku z wykryciem diastereoselektywności endonukleazy Eco RI w stosunku do izomerów Rp i Sp oktameru d[GG(s)AATTCC] pojawiły się następujące pytania: jaki wpływ na oddziaływania DNA i enzymu mają pozostałe wiązania internukleotydomych znajdujące się w obrębie sekwencji kanonicznej rozpoznawanej przez endonukleazę Eco RI, oraz jakie efekty może wywołać modyfikowanie ich w sposób opisany wyżej. Aby odpowiedzieć na te pytania, podjęte zostały próby syntezy odpowiednio modyfikowanych substratów zawierających sekwencję kanoniczną Eco RI.

## II. Tiofosforanowe i O-etylofosfotriestrowe analogi oligonukleotydów — ich zastosowanie w badaniach nad mechanizmem działania restryktazy Eco RI

Oligonukleotydy zsyntetyzowane za pomocą zmodyfikowanej metody amidofosforanowej stanowiły analogi tiofosforanowe (okta-, deka- i heksadekameru) (Tab.2), oraz O-etylofosfotriestry o identycznych sekwencjach (Tab.3). Na podstawie wcześniejszych badań wiadomo było, iż enzym Eco RI rozpoznaje jako substraty i hydrolizuje nawet tak krótkie oligonukleotydy jak oktamer, ale jego powinowactwo wobec nich jest bardzo obniżone w porównaniu z tym, jakie enzym wykazuje w stosunku do naturalnych substratów. Jakkolwiek więc pierwszymi modelowymi substratami endonukleazy Eco RI były analogi oktameru d[GGAATTCC], w następnym etapie badań stosowano modyfikowane dekanukleotydy o zbliżonej sekwencji zasad, mianowicie dekanukleotydy d[GGGAATTCC] oraz heksadekanukleotydy o sekwencji d[GAAGGGAATCCCTTC]. Rozdział diastereoizomerów tych oligonukleotydów (będący warunkiem ich wykorzystania w badaniach nad stereochemicznymi aspektami oddziaływań endonukleazy Eco RI z DNA) przeprowadzono za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej przy użyciu kolumn z wypełnieniem typu  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> lub ODS-Hypersil (RP-HPLC).

Użycie rozdzielonych diastereoizomerów w eksperymentach z endonukleazą Eco RI zostało poprzedzone oznaczeniem położenia elementu modyfikującego w cząsteczce oligonukleotydu. Ustalenie położenia atomu siarki w każdym z dwóch izomerów tiofosforanowych analogów oligonukleotydów było możliwe dzięki znanej już wcześniej diastereoselektywności dwóch enzymów nukleolitycznych, mianowicie fosfodiesterazy z jadu węża oraz nukleazy P1 z *Penicillium citricum*. Fosfodiesteraza rozpoznaje i hydrolizuje

Tabela 1

Oczyszczanie niemodyfikowanych oligonukleotydów 1-3 metodą chromatografii wysokociśnieniowej

Związek	Sekwencja 5'→3'	5'-DMT		5'-HO	
		Warunki rozdziálu	Czas ret. [min.]	Warunki rozdziálu	Czas ret. [min.]
1	d[GGAATTCC]	A	21.50	B	9.00
2	d[GGGAATCC]	A	15.50	B	10.00
3	d[GAAGGGAATCCCTTC]	A	16.00	B	10.20

- A --- gradient stężenia acetonitrylu 5-30% CH<sub>3</sub>CN-0.1M TEAB w ciągu 20 min. (exp. 0.25), pomiędzy 20 a 25 min. - warunki izokratyczne: 30 % CH<sub>3</sub>CN-0.1M TEAB; kolumna  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (300 x 7.8 mm) szybkość przepływu 3.5 ml/min.;
- B --- liniowy gradient stężenia acetonitrylu: 5-30% CH<sub>3</sub>CN-0.1M TEAB 1.25%/min.; kolumna  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (300 x 7.8 mm); szybkość przepływu 3.5 ml/min.;

jedynie izomery Rp tiofosforanowych analogów dinukleotydów [11], natomiast nukleaza P1 — tylko izomery Sp analogicznych związków [12]. Diastereoselektywność tych enzymów wobec tiofosforanów dinukleotydów  $d[N^*p(s)N^{**}]$  umożliwiła ustalenie za ich pomocą absolutnej konfiguracji na atomie fosforu zmodyfikowanych wiązań w cząsteczkach analogów DNA o strukturze  $d[...NpN^*p(s)N^{**}pN...]$ . Produktami enzymatycznej hydrolizy każdego z rozdzielonych wcześniej diastereoizomerów FAST i SLOW (przeprowadzonej za pomocą, niezależnie, fosfodiesterazy z jadu węża oraz nukleazy P1) są 5'-fosforany nukleotydów oraz 5'-tiofosforan nukleotydu  $N^{**}$  albo 5'-fosforan odpowiedniego diastereoizomeru dinukleo-

tydu  $d[N^*p(s)N^{**}]$ . Zastosowanie alkalicznej fosfatazy katalizującej defosforylację tych związków pozwala na otrzymanie 5'-hydroksylowej pochodnej odpowiedniego diastereoizomeru dinukleotydu  $d[N^*p(s)N^{**}]$ . Wyizolowanie tego produktu za pomocą chromatografii wysokociśnieniowej oraz przypisanie mu (na podstawie jego odporności w stosunku do jednego z wyżej wymienionych enzymów) odpowiedniej konfiguracji absolutnej na atomie fosforu pozwala jednocześnie na przypisanie takiej samej konfiguracji absolutnej macierzystemu oligonukleotydowi  $d[...NpN^*p(s)N^{**}pN...]$  (Ryc. 1).

Położenie grupy etylowej w zmodyfikowanym wiązaniu internukleotydowym fosfortriestrowych ana-

**Tabela 2**

Oczyszczanie i rozdział diastereoizomerów tiofosforanowych analogów oligomerów 1, 2 i 3 (4, 5 i 6) za pomocą chromatografii wysokociśnieniowej RP-HPLC

Związek	Sekwencja 5'→3'	5'-DMT		5'-HO	
		Warunki rozdziálu	Czas ret. [min.]	Warunki rozdziálu	Czas ret. [min.]
4a	$d[G_{P(S)}GAATTCC]$	A	18.4 19.8	B	18.1 18.9
4b	$d[GG_{P(S)}AATTCC]$	A	19.2 21.8	C	14.7 14.7
4d	$d[GGAAP_{(S)}TTCC]$	D	18.5	E	10.5
4e	$d[GGAAT_{P(S)}TCC]$	F	10.9 10.9	G	17.4 17.9
4f	$d[GGAATT_{P(S)}CC]$	F	11.2 11.2	G	16.9 17.7
4g	$d[GGAATTC_{P(S)}C]$	F	11.9 11.9	G	17.1 17.6
5a	$d[G_{P(S)}GGAATCCC]$	H	23.5 24.6	B	17.7 18.1
6a	$d[G_{P(S)}AAGGGAATCCCTTC]$	D	15.1 17.4	E	10.2 10.5
6b	$d[GAP_{(S)}AGGGAATCCCTTC]$	D	16.4	E	10.4 10.8
6c	$d[GAA_{P(S)}GGGAATCCCTTC]$	D	16.5	E	11.2

Oczyszczanie i rozdział diastereoizomerów przeprowadzono na kolumnie  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$  (300 x 7.8 mm) stosując następujące warunki:

A — liniowy gradient acetonitrylu w 0.1M TEAA (octan trietyloamoniowy) (pH 7.0): 20-40%  $CH_3CN$ -0.1M TEAA, 0.5%/min., przepływ 5ml/min.;

B — 5-20%  $CH_3CN$ -0.1M TEAA, 0.5%/min., 5 ml/min.;

C — 5-30%  $CH_3CN$ -0.1M TEAA, 1.0%/min., 4 ml/min.;

D — 5-30%  $CH_3CN$ -0.1M TEAB (Exp. 0.25), t = 20 min., 3.5 ml/min.;

E — 5-20%  $CH_3CN$ -0.1M TEAB, 0.75%/min., 3.5 ml/min.;

F — 20-40%  $CH_3CN$ -0.1M TEAA, 1.0%/min., 4 ml/min.;

G — 5-20%  $CH_3CN$ -0.1M TEAA, 0.5%/min., 4 ml/min.;

H — 20-40%  $CH_3CN$ -0.1M TEAA, 0.33%/min., 4 ml/min.;

**Tabela 3**

Oczyszczanie i rozdział diastereoizomerów O-etylofosforanowych analogów oligonukleotydów 2 - 3 (7 i 8)

Związek	Sekwencja 5'→3'	5'-DMT		5'-HO	
		Warunki rozdziálu	Czas ret. [min.]	Warunki rozdziálu	Czas ret. [min.]
7a	$d[G^*GGAATCCC]$	A	19.00 21.00	B	11.00 11.00
7b	$d[GG^*GGAATCCC]$	A	19.50 21.00	B	10.50 10.50
7c	$d[GGG^*AATCCC]$	A	20.00 21.00	B	10.75 10.50
7d	$d[GGGA^*ATCCC]$	A	18.50 20.00	B	11.00 10.50
7e	$d[GGGAA^*TTCCC]$	A	19.00 22.00	B	11.50 11.00
7f	$d[GGGAAT^*TCCC]$	A	16.00 18.00	B	11.50 11.30
7g	$d[GGGAATT^*CCC]$	A	16.00 18.00	B	11.00 11.25
7h	$d[GGGAATTC^*CC]$	A	16.00 18.00	B	11.00 11.00
7i	$d[GGGAATTC^*C]$	A	19.00 20.00	B	10.70 10.70
8a	$d[G^*AAGGGAATCCCTTC]$	A	16.20	B	11.15
8b	$d[GA^*AGGGAATCCCTTC]$	A	16.25 17.25	B	11.15 11.65
8c	$d[GAA^*GGGAATCCCTTC]$	A	16.50	B	11.40

\* P(O) (OEt)

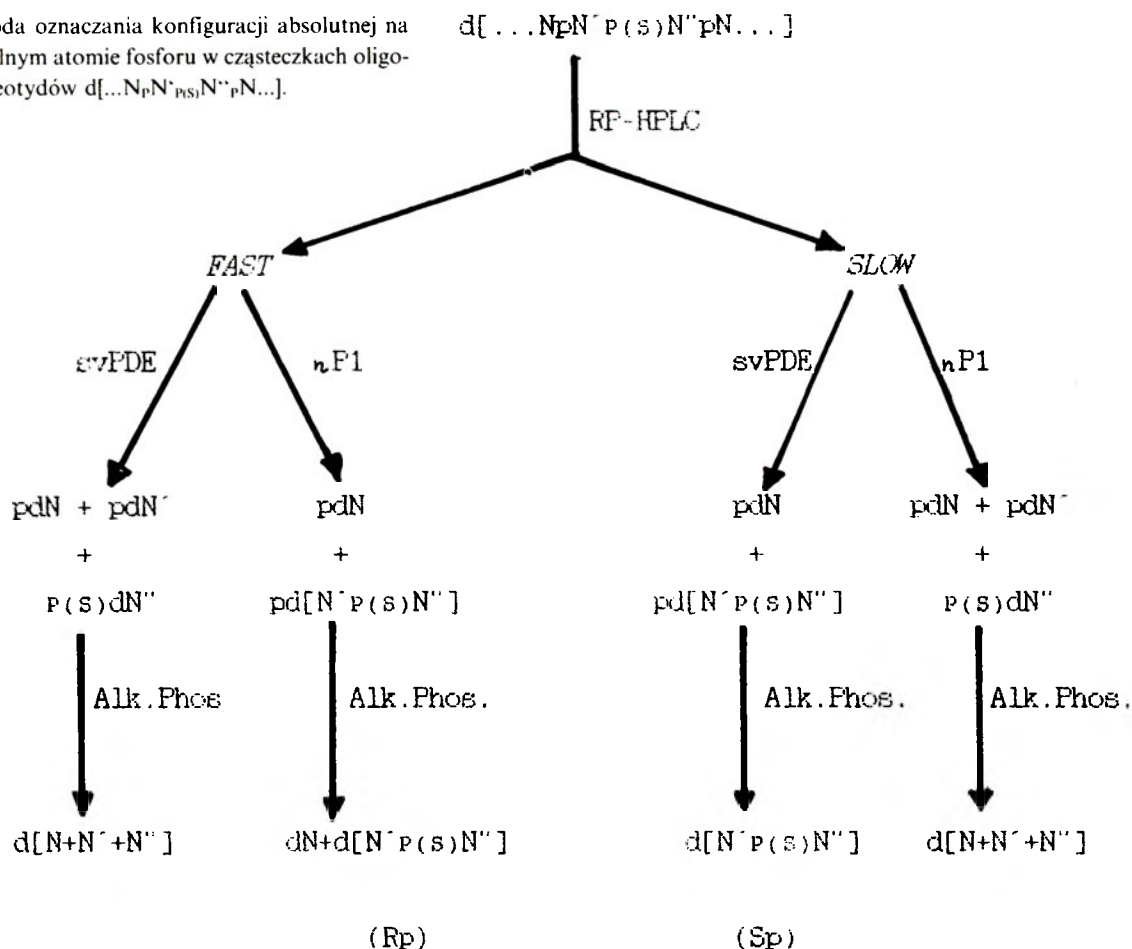
Warunki rozdziálu:

kolumna  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$  (300 x 7.8 mm), przepływ 3.5 ml/min.;

A — gradient 5-30%  $CH_3CN$ -0.1M TEAB, t = 20 min., (exp. 0.25), pomiędzy 20 i 25 min. — warunki izokratyczne: 30%  $CH_3CN$ -0.1M TEAB;

B — 5-30%  $CH_3CN$ -0.1M TEAB, 1.25%/min.;

Ryc. 1. Metoda oznaczania konfiguracji absolutnej na chiralnym atomie fosforu w cząsteczkach oligonukleotydów  $d[\dots N_P N^* P(s) N'' P N \dots]$ .



logów oligonukleotydów oznaczono w podobny sposób, wykorzystując fakt, iż w warunkach przedłużonej inkubacji tych substratów fosfodiesteraza z jadu węża degraduje od końca 3' kolejne wiązania fosfodiesterowe w kierunku 5'-końca pozostawiając nienaruszoną funkcję triestrową, a tym samym dinukleotyd  $d[N_{P(O)(OE_1)}N^*]$ , identyfikowany następnie przez porównanie (za pomocą HPLC) z odpowiednim wzorcem. Konfiguracje absolutne użytych jako wzorce dinukleotydów  $d[N_{P(O)(OE_1)}N^*]$  oznaczono dzięki opracowanej metodzie chemiczno-enzymatycznej. W ogólnym zarysie polega ona na przekształceniu O-etylotiofosforanowych analogów dinukleotydów w ich tiofosforanowe, oraz niezależnie, O-etylowe odpowiedniki, po to aby na podstawie konfiguracji absolutnej analogów tiofosforanowych (znanej w wyniku ich trawienia z fosfodiesterazą oraz nukleazą) określić konfigurację absolutną izomerów dinukleotydów:  $d[N_{P(O)(OE_1)}N^*]$  [13, 14]. Przekształceń tych dokonuje się na drodze chemicznej, stosując reakcje o znanej stereochemii: utlenianie za pomocą 3% roztworu  $H_2O_2$  zachodzące z retencją konfiguracji na atomie fosforu [15] (1) oraz dealkilację za pomocą tiofenolu (zachodzącą również z retencją konfiguracji) [16] (2) (Ryc. 2).

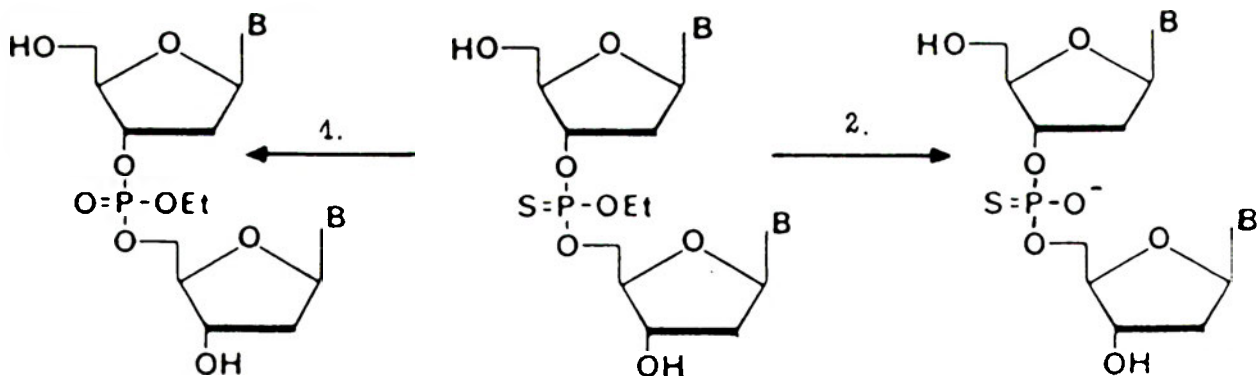
Tiofosforanowe i fosfortriestrowe analogi oligonukleotydów o ustalonej konfiguracji absolutnej na chiralnym atomie fosforu poddano działaniu endonukleazy Eco RI. Dla ułatwienia prezentacji wyników ich

hydrolizy wiązania internukleotydu oraz zasady należącej do sekwencji kanonicznej lub sąsiadującej z nią zostały oznaczone w następujący sposób:

-5 -4 -3 -2 -1 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10 +11  
 $d[G\ pA\ pA\ pG\ pG\ pG\ pA\ pA\ pT\ pT\ pC\ pC\ pC\ pT\ pT\ pC]$   
 -V -IV -III -II -I +I +II +III +IV +V +VI +VII

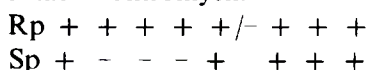
Wiązania położone na lewo od miejsca hydrolizy (oznaczonego jako +I) zostały oznaczone liczbami rzymskimi ze znakiem „-”, natomiast wiązania położone na prawo od miejsca hydrolizy są oznaczone odpowiednimi liczbami ze znakiem „+”. Natomiast zasady zostały oznaczone liczbami od -5 do +11, gdzie +1 oznacza pierwszą zasadę (od 5'-końca oligonukleotydu) należąca do sekwencji kanonicznej.

Zastosowanie jako substratów endonukleazy Eco RI oligonukleotydów zawierających internukleotydu resztą tiofosforanową w jednej z pozycji od -V do +VI pozwoliło wykryć diastereo-selektywność enzymu nie tylko wobec izomerów Rp i Sp oligomeru z resztą tiofosforanową położoną pomiędzy resztami deoksyguanozyny i deoksyadenozyny [9], ale także wobec substratów zawierających modyfikowane siarką wiązanie internukleotydu w pozycjach -I oraz +II i +III. Uzależnienie procesu hydrolizy substratu od orientacji przestrzennej atomu siarki modyfikującego jedną z reszt fosforanowych nie podlegających nukleolitycznej aktywności restryktazy Eco RI określono jako „zdalnie sterowaną” kontrolę procesu hydrolizy.



Ryc. 2. Konwersja O-etylotiofosforanów dinukleozydów  $d[N_{R(S)OEt}N']$  do ich analogów O-etylofosforanowych (1) oraz tiofosforanowych (2).

Podczas gdy w przypadku oligonukleotydów zawierających resztę tiofosforanową w pozycjach  $-I$ ,  $+I$  i  $+II$  enzym degradował jedynie izomery Rp, w przypadku substratu z resztą tiofosforanową w pozycji  $+III$ , wyraźnie preferował izomer o konfiguracji absolutnej Sp (obserwowano hydrolizę także izomeru Rp, aczkolwiek przebiegała ona znacznie wolniej). Pozostałe oligonukleotydy zawierające atom siarki w jednym z wiązań internukleotydydowych od  $-V$  do  $-II$  oraz od  $+IV$  do  $+VI$  były hydrolizowane z taką samą szybkością, z jaką enzym degradował niemodyfikowane oligomery użyte w eksperymentach kontrolnych.



G A A G pG pG pA pA pT pT pC pC C T T C  
 Tak więc użycie tiofosforanowych analogów oligonukleotydów wskazywało, iż region oddziaływań endonukleazy z resztami fosforanowymi DNA obejmuje 4 wiązania internukleotydydowe.

Natomiast zastosowanie O-etylofosfotriestrowych analogów dekanukleotydu  $d[GGGAATTC]$  oraz heksadekanukleotydu  $[GAAGGGAATTCCTTC]$  pozwoliło ustalić, iż region oddziaływań endonukleazy z resztami fosforanowymi DNA jest większy niż to wynikało z prób enzymatycznej hydrolizy analogów tiofosforanowych i obejmuje 8 wiązań internukleotydydowych.



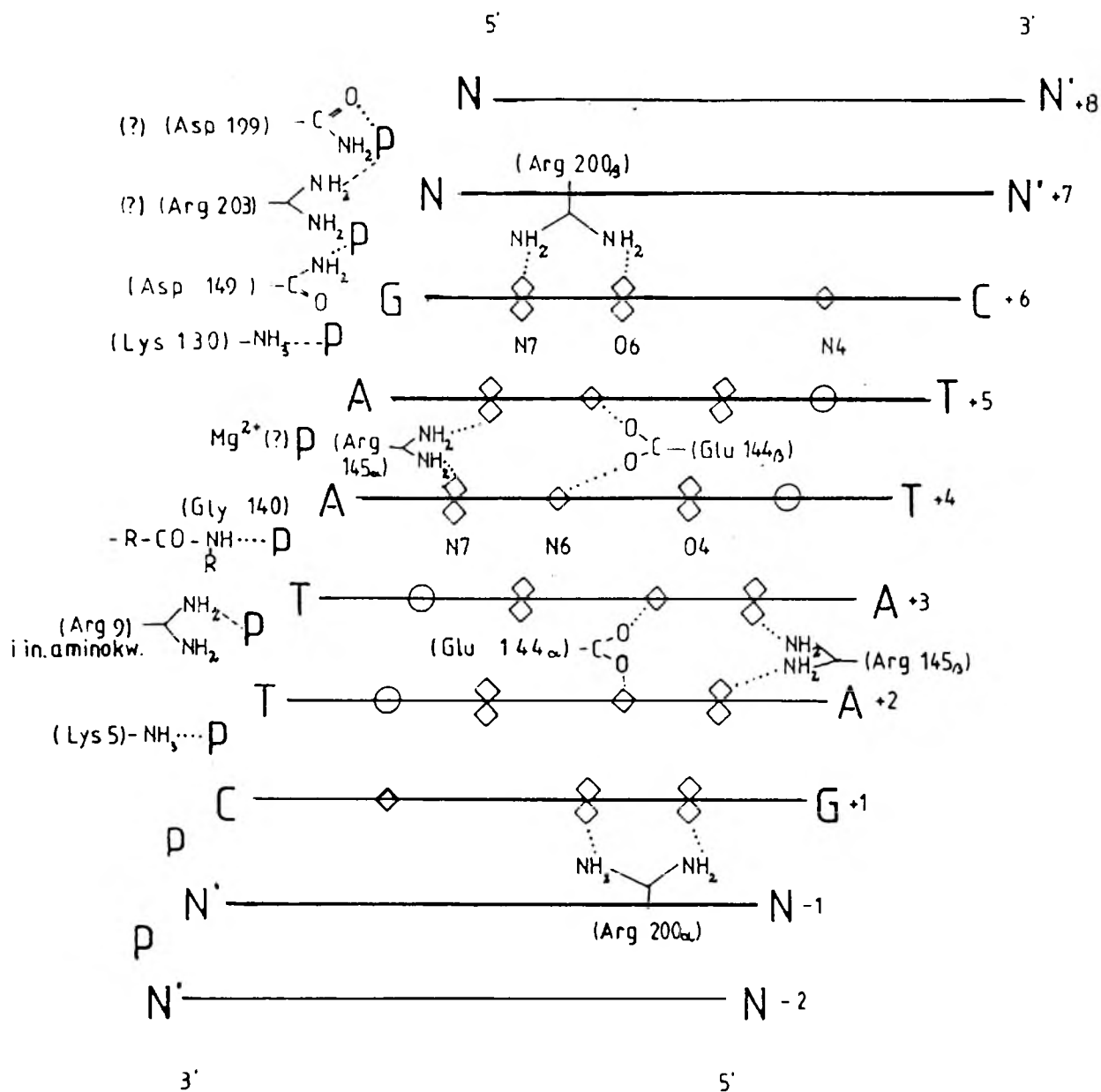
G pA pA pG pG pG pA pA pT pT pC pC pC T T C

Dekanukleotydy zawierające funkcję triestrową w pozycjach od  $-II$  do  $+III$  okazały się całkowicie odporne na działanie endonukleazy Eco RI, niezależnie od absolutnej konfiguracji na chiralnym atomie fosforu. Natomiast obecność funkcji triestrowej w pozycji  $+IV$  wywołała diastereoselektywność enzymu wobec izomerów Rp i Sp dekanukleotydu 7f: 100% przereagowania w stosunku do izomeru Sp i zaledwie 10% w stosunku do izomeru Rp. Estryfikacja wiązania internukleotydydowego w pozycji  $+V$  albo  $+VI$  wywołała obniżenie szybkości hydrolizy o ok. 80%, w porównaniu z szybkością hydrolizy niemodyfikowanego dekanukleotydu.

Powyższy przegląd wskazuje, iż widoczne zmiany aktywności nukleolitycznej enzymu mają miejsce wówczas, gdy pozycje od  $-I$  do  $+III$  są zmodyfikowane poprzez wprowadzenie atomu siarki, lub pozycje od  $-III$  do  $+VI$  są estryfikowane grupą etylową. To „powiększenie” regionu oddziaływań enzymu z wiązaniami internukleotydydowymi przy przejściu od tiofosforanowych do fosfotriestrowych analogów oligonukleotydów wynika z faktu, iż estryfikacja wiązań internukleotydydowych jest przyczyną znacznie większych zaburzeń struktury i prawdopodobnie konformacji DNA niż podstawienie nieestrowego atomu tlenu atomem siarki. Dzięki użyciu analogów DNA, które w szkieletcie fosforanowo-cukrowym zawierały grupy znacznie różniące się pod względem struktury i właściwości (tiofosforanowa lub fosfotriestrowa) dokonano próby wyjaśnienia roli wiązań internukleotydydowych w oddziaływaniach DNA z endonukleazą Eco RI, jak również określenia charakteru tych oddziaływań.

Stosowanie analogów o strukturze znacznie zmiennej w stosunku do naturalnych substratów nie zawsze pozwala uzyskać wiarygodne informacje o charakterze oddziaływań między biomolekułami. Jednakże zdaniem G u m p o r t a i w s p ó ł a u t o r ó w [17] różne sposoby modyfikowania DNA powodujące silne zaburzenia jego struktury i konformacji umożliwiają wykrywanie tzw. „słabych” oddziaływań między białkami i DNA. Podczas gdy zastosowanie analogów tiofosforanowych, w niewielkim stopniu różniących się od naturalnych oligonukleotydów, umożliwiło identyfikację wiązań internukleotydydowych silnie zaangażowanych w oddziaływania z białkiem Eco RI, użycie analogów fosfotriestrowych o znacznie bardziej zaburzonej strukturze umożliwiło wykrycie tych wiązań internukleotydydowych, które w mniejszym stopniu są zaangażowane w interakcje z enzymem (Ryc. 3).

Wiązanie internukleotydydowe znajdujące się w sekwencji kanonicznej pomiędzy deoksyguanozyną i deoksyadenozyną podlega rozszczepieniu w obecności endonukleazy Eco RI. Podstawienie atomem siarki tlenu pro-S tego wiązania czyni zmodyfikowany w ten sposób oligonukleotyd  $d[GG_{P(S)}AATTC]$  (4b) odpornym na działanie enzymu. Natomiast podstawienie



Ryc. 3. Udział zasad i wiązań internukleotydydowych dekaneru d[NGGAATTCN'N'] w oddziaływaniach z endonukleazą Eco RI (na podstawie wyników analizy rentgenostrukuralnej oraz wyników hydrolizy modyfikowanych oligonukleotydów). Przedstawiono schematycznie atomy tlenu i azotu zasad purynowych zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych z łańcuchami bocznymi argininy i glutaminianu białka Eco RI, jak również reszty fosforanowe zaangażowane w oddziaływania kulombowskie lub w tworzenie wiązań wodorowych z łańcuchami bocznymi aminokwasów białka Eco RI.

- ◇ akceptor protonu
- ◇ donator protonu
- grupa metylowa tyminy
- oddziaływania kulombowskie
- ... wiązania wodorowe

atomem siarki tlenu pro-R powoduje jedynie obniżenie szybkości hydrolizy odpowiedniego substratu. Można więc przypuszczać, iż nieestrowe atomy tlenu tego wiązania (pro-R i pro-S) są zaangażowane w oddziaływania z białkiem (poprzez udział w tworzeniu wiązań wodorowych lub poprzez udział w oddziaływaniach kulombowskich).

Z badań rentgenostrukuralnych kompleksu tridekanukleotyd — białko Eco RI wynika, iż w sąsiedztwie omawianego wiązania internukleotydydowego znajduje się łańcuch boczny lizyny 130, co sugeruje możliwość oddziaływań kulombowskich pomiędzy grupą NH<sub>3</sub>,

a jednym z atomów tlenu. Nie jest jednak wykluczone, iż drugi atom tlenu uczestniczy w tworzeniu wiązania wodorowego (z białkiem lub cząsteczką wody). Badania, podsumowane ostatnio przez P. Frey'a [4] świadczą, iż w cząsteczkach związków zawierających funkcję tiofosforanową ładunek jest zlokalizowany na atomie siarki. Na tej podstawie, jak również na podstawie wyników hydrolizy izomerów Rp i Sp oktanukleotydu 4b można przyjąć, iż obydwa nieestrowe atomy tlenu reszty fosforanowej znajdującej się w pozycji +I są zaangażowane w oddziaływania z resztami aminokwasów, przy czym atom tlenu pro-R

(skierowany do dużej bruzdy) jest zaangażowany w oddziaływanie typu kulombowskiego, zaś atom tlenu pro-S (położony na zewnątrz helisy) jest miejscem protono-akceptorowym. Zatem w cząsteczce izomeru Rp oktameru 4b (gdzie ładunek jest zlokalizowany na atomie siarki zastępującym atom tlenu pro-R) obydwa warunki mogą być spełnione. Świadczy o tym podatność oktameru na działanie endonukleazy Eco RI. Jednakże dla izomeru Sp tego typu oddziaływania są niemożliwe, gdyż nie można oczekiwać takiej zmiany konformacji białka, która spowodowałaby zmianę lokalizacji niektórych reszt aminokwasowych i zaangażowanie ich w interakcje z atomami pro-S siarki i pro-R tlenu. Z tego samego względu żaden z izomerów analogu fosfortriestrowego 7c nie spełnia obydwu warunków równocześnie — żaden więc nie jest substratem dla enzymu. Jakkolwiek atom tlenu pro-S izomeru Rp-7c jest dobrym centrum protono-akceptorowym, grupa etoksylova nie oddziałuje wystarczająco silnie z grupą  $\text{NH}_3^+$  lizyny 130, po to aby wywołać odkształcenie kątów walencyjnych czyniące resztę fosforanową podatną na atak cząsteczki wody. Zatem determinantą podatności oligonukleotydu na działanie endonukleazy Eco RI jest obecność ujemnego ładunku na atomie pro-R oraz protono-akceptorowy charakter pozycji pro-S umożliwiający utworzenie silnego wiązania wodorowego.

Również wiązania internukleotydydowe w pozycjach -I oraz -II wydają się być silnie zaangażowane w oddziaływanie z białkiem. Istnieje wiele dowodów, iż szczególnie zaangażowana w oddziaływanie z endonukleazą jest funkcja internukleotydydowa w pozycji -I. Podczas gdy izomer Rp oktanukleotydu  $d[\text{G}_{\text{P(S)}}\text{GAATTCC}]$  podlega degradacji w obecności endonukleazy Eco RI, jego analog o konfiguracji absolutnej Sp jest odporny na działanie enzymu, podobnie jak izomery Rp i Sp dekanukleotydu  $d[\text{GG}_{\text{P(O)(OEI)}}\text{GAATCCC}]$ . Wyniki te pozwalają przypuszczać, iż atomy tlenu pro-R i pro-S wiązania internukleotydydowego -I biorą udział w oddziaływaniach kulombowskich oraz w tworzeniu wiązania wodorowego z aminokwasami białka Eco RI. Jednakże analiza rentgenostrukturalna nie daje jednoznacznej odpowiedzi na pytania, jakie aminokwasy uczestniczą w oddziaływaniach z resztą fosforanową -I, bowiem w jego sąsiedztwie znajdują się łańcuchy boczne kilku aminokwasów, mianowicie: argininy 203, lizyny 148, argininy 105 oraz asparaginy 149 [18]. Podczas gdy łańcuchy boczne arginin 203 i 105 oraz lizyny 148 mogą uczestniczyć w oddziaływaniach jonowych, asparagina 149 może stanowić donora protonu zaangażowanego w tworzenie wiązania wodorowego. Jen-Jacobson sugeruje, iż grupa fosforanowa -I jest zaangażowana w tworzenie wiązania wodorowego z asparaginą 149 (co nie wyklucza istnienia równocześnie oddziaływań jonowych) [18]. Przy założeniu, iż atom tlenu pro-R uczestniczy w oddziaływaniach kulombowskich z łańcuchem bocznym jednego z podanych wyżej aminokwasów zasa-

dowych, natomiast atom tlenu pro-S jest akceptorem protonu grupy amidowej asparaginy 149, powstaje pytanie: dlaczego podstawienie atomu tlenu pro-S atomem siarki, lub estryfikacja jednego z atomów tlenu czyni odpowiednie analogi odpornymi na działanie enzymu, skoro modyfikowane wiązanie nie podlega nukleolitycznemu działaniu enzymu? Z badań rentgenostrukturalnych McClarina i współautorów [19] wiadomo, iż wskutek tworzenia się kompleksu enzym-substrat zmienia się konformacja DNA, a jednym z przejawów tej zmiany jest wzrost odległości między atomami fosforu reszt fosforanowych w pozycjach -I i +I oraz +V i +VI z 7.0Å do odpowiednio: 7,3Å i 7,4Å. Można więc sądzić, iż oddziaływanie pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów i nieestrowymi atomami tlenu wiązania -I są jednym z czynników decydujących o zmianie konformacji DNA koniecznej do zainicjowania procesu rozpoznawania i hydrolizy substratu.

Region oddziaływań endonukleazy Eco RI z wiązaniami internukleotydydowymi obejmuje także resztę fosforanową w pozycji -II. Jakkolwiek podstawienie atomu tlenu atomem siarki nie obniża szybkości hydrolizy izomerów Rp i Sp dekanukleotydu  $d[\text{G}_{\text{P(S)}}\text{GGAATCCC}]$  (w stosunku do szybkości hydrolizy niemodyfikowanego dekameru), to estryfikacja wiązania internukleotydydowego w pozycji -II czyni odpowiedni dekanukleotyd  $d[\text{G}_{\text{P(O)(EI)}}\text{GGAATCCC}]$  całkowicie odpornym na działanie endonukleazy. Można przypuszczać, iż przyczyną tego są efekty steryczne wywołane przez grupę etylową.

Kolejne wiązania internukleotydydowe, zaangażowane w oddziaływanie z endonukleazą Eco RI znajdują się w obrębie sekwencji kanonicznej w pozycjach od +II do +VI.

Sz szczególnie interesujące okazały się wyniki modyfikowania wiązania internukleotydydowego w pozycji +II, tj. pomiędzy dwoma resztami deoksyadenozyny. Podczas gdy wobec izomerów Rp i Sp okta- i dekanukleotydu zawierających w pozycji +II funkcję tiofosforanową endonukleaza wykazywała diastereoselektywność (tj. hydrolizowała jedynie izomery Rp), w stosunku do izomerów Rp i Sp dekanukleotydu  $d[\text{GGGA}_{\text{P(O)(OEI)}}\text{ATCCC}]$  okazała się zupełnie nieaktywna. Jednakże wyniki Lu i współautorów [20], a także Jen-Jacobson [18] uzyskane na podstawie alkilowania DNA za pomocą etylnitrozomocznika wykazują, iż obecność grupy etylowej w pozycji +II nie wpływa hamująco na proces rozpoznawania i tworzenia się kompleksu enzym-substrat. Nie było podstaw, aby poddawać w wątpliwość zgodność tych wyników ze stanem faktycznym, tym bardziej, że zostały one uzyskane niezależnie w dwóch laboratoriach, a ponadto Jen-Jacobson przeprowadziła eksperyment stosując bardzo niskie stężenie białka po to, aby wykryć również słabe efekty alkilowania. Pomimo to, nie stwierdzono, aby alkilowanie fosforanu w pozycji +II utrudniało, czy też

uniemożliwiało rozpoznawanie substratu przez enzym. W świetle tych wyników można przyjąć hipotezę: jeśli obecność funkcji etylowej w pozycji +II nie ma wpływu na proces rozpoznawania zachodzący bez udziału jonów magnezu, natomiast uniemożliwia hydrolizę modyfikowanych oligonukleotydów wymagającą ich udziału, to fosforan w pozycji +II, sąsiadujący z hydrolizowanym wiązaniem pomiędzy G i A, wiąże jony magnezu. Wychodząc z tego założenia, można z kolei przyjąć, iż w wiązaniu jonów magnezu uczestniczy atom tlenu pro-S, ponieważ podstawienie go atomem siarki czyni odpowiedni modyfikowany oligonukleotyd całkowicie odpornym na działanie enzymu, podczas gdy podstawienie siarką atomu tlenu pro-R powoduje jedynie obniżenie szybkości hydrolizy modyfikowanego substratu. Jak dotychczas, brak jest jakichkolwiek danych literaturowych na temat sposobu wiązania jonów magnezu przez kompleks enzym-substrat.

Alkilowanie wiązania internukleotydu w pozycji +III uczyniło zarówno izomer Rp jak i Sp dekanukleotydu d[GGGAA<sub>P(O)(OEt)</sub>TTCCC] całkowicie odpornymi na działanie endonukleazy. Natomiast izomery Rp i Sp oktanukleotydu d[GGAA<sub>P(S)</sub>TTCC] okazały się podatne na działanie enzymu, przy czym szybkość hydrolizy izomeru Sp była dwukrotnie większa w porównaniu z szybkością hydrolizy izomeru Rp. Interesujący wydaje się fakt, iż w tym przypadku enzym jest bardziej selektywny w stosunku do izomeru Sp, podczas gdy w przypadku oligonukleotydów zawierających funkcję tiofosforanową w pozycji -I, +I albo +II, wykazywał aktywność jedynie w stosunku do izomerów Rp. Analiza struktury krystalicznej białka Eco RI wykazała, iż w bezpośrednim sąsiedztwie tej reszty fosforanowej znajduje się fragment szkieletu peptydowego, a proton grupy amidowej reszty 140 (Gly) jest prawdopodobnie zaangażowany w tworzenie wiązania wodorowego z atomem tlenu funkcji internukleotydu. Być może, ze względu na fakt, iż fragment szkieletu peptydowego wykazuje mniejszą ruchliwość niż łańcuchy boczne aminokwasów, atom tlenu pro-S (skierowany na zewnątrz helisy) jest bardziej dostępny dla protonu grupy amidowej glicyny niż skierowany do dużej bruzdy atom tlenu pro-R. To tłumaczyłoby większą szybkość hydrolizy izomeru Sp w stosunku do szybkości hydrolizy izomeru Rp oktanukleotydu d[GGAA<sub>P(S)</sub>TTCC]. O tym, że wiązanie internukleotydu w pozycji +III jest w sposób istotny zaangażowane w oddziaływanie z białkiem świadczy fakt, iż oligonukleotyd zawierający w tej pozycji grupę etylową jest całkowicie odporny na działanie endonukleazy (niezależnie od konfiguracji absolutnej na chiralnym atomie fosforu).

Obecność funkcji tiofosforanowej w pozycjach +IV, +V oraz +VI nie miała wpływu na aktywność nukleolityczną enzymu Eco RI, co mogło sugerować, iż wiązania internukleotydu znajdujące się w tych pozycjach nie uczestniczą w oddziaływaniach z biał-

kiem. Jednakże zastosowanie oligonukleotydów zawierających w tych samych pozycjach funkcję triestrową wykazało, iż wiązania +IV, +V oraz +VI są zaangażowane w interakcje z białkiem. Fakty te mogą stanowić potwierdzenie wspomnianej wyżej opinii G u m p o r t a i w s p ó ł a u t o r ó w [7], co do zasadności stosowania metod modyfikowania DNA, powodujących coraz silniejsze zaburzenia jego struktury i konformacji.

Szczególnie interesujące okazały się wyniki hydrolizy izomerów Rp i Sp dekanukleotydu d[GGGAAT<sub>P(O)(OEt)</sub>TTCCC]. Podczas gdy izomer Sp w obecności endonukleazy Eco RI jest hydrolizowany z szybkością równą szybkości hydrolizy niemodyfikowanego dekanukleotydu, izomer Rp w analogicznych warunkach podlega hydrolizie zaledwie w 10%. Badania rentgenostrukturalne wykazały, że reszta fosforanowa w pozycji +IV jest zaangażowana w oddziaływanie o charakterze jonowym, w którym współuczestniczy łańcuch boczny argininy 9. Nie wydaje się, aby jedyną przyczyną zaobserwowanych zmian aktywności endonukleazy wobec izomerów Rp i Sp dekanukleotydu 7f był brak ładunku ujemnego w alkilowanym wiązaniu internukleotydu, bowiem efekt alkilowania tego wiązania (w sensie eliminacji ładunku ujemnego) jest taki sam zarówno dla izomeru Rp jak i Sp, natomiast efekt biologiczny (wyrażający się podatnością na działanie endonukleazy) — diametralnie różny. Toteż należałoby sądzić, iż przyczyną różnicowania szybkości hydrolizy izomerów Rp i Sp dekanukleotydu 7f są efekty steryczne: w przypadku izomeru Rp obecność grupy etylowej w dużej bruzdzie helisy utrudnia dostęp białka do atomu tlenu pro-R, natomiast w przypadku izomeru Sp grupa etylowa jest skierowana na zewnątrz helisy i wobec tego dostęp białka do atomu tlenu pro-R nie jest niczym zakłócony.

### III. Podsumowanie

Wyniki eksperymentów z zastosowaniem O-etylofosforanowych analogów oligonukleotydów wykazały, iż region oddziaływań endonukleazy Eco RI ze szkieletem fosforanowo-cukrowym obejmuje co najmniej 8 wiązań internukleotydu i wykracza poza heksamer GAATTC. Zastosowanie zarówno tiofosforanowych jak i fosfortriestrowych analogów oligonukleotydów dowiodło, iż specyficzne oddziaływanie pomiędzy DNA i białkami są uzależnione nie tylko od sekwencji zasad, ale w znacznym stopniu także od konformacji szkieletu fosforanowo-cukrowego.

Zaprezentowane powyżej wnioski na temat oddziaływań endonukleazy Eco RI z DNA, uzyskane dzięki użyciu syntetycznych tiofosforanowych fosfortriestrowych analogów oligonukleotydów, potwierdzają przydatność tego typu związków w badaniach mechanizmów rozpoznawania i hydrolizy specyficznych sekwencji DNA przez odpowiednie białka. Pomimo znacznego postępu, jaki ostatnio odnotowano w badaniach nad wzajemnym rozpoznawaniem białek i DNA,

lista białek o znanym mechanizmie rozpoznawania DNA jest raczej krótka. Z tego względu wartościowa jest każda nowa metoda, która rozszerza możliwości badawcze w tej dziedzinie.

Metoda badania oddziaływań białka-DNA, u podstaw której leży synteza diastereoizomerycznie czystych analogów oligonukleotydów modyfikowanych w części fosforanowo-cukrowej, jest w pewnym stopniu komplementarna do metody „alkylation protection and alkylation interference” Siebenlista i Gilberta. Ma jednak w stosunku do niej szereg zalet, jak chociażby precyzyjna lokalizacja modyfikowanych funkcji internukleotydowych oraz możliwość badania stereochemicznych aspektów procesu rozpoznawania.

Artykuł otrzymano 18 maja 1990 r.  
Zaakceptowano do druku 5 grudnia 1990 r.

## Piśmiennictwo

1. Caruthers M. H., (1985), *Science*, **230**, 281-285.
2. Siebenlist U., Gilbert W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 122-126.
3. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W., (1980), *Cell*, **20**, 269-281.
4. Frey P. A., Sammons R. P., (1985), *Science*, **228**, 541-545.
5. Uznański B., Koziółkiewicz M., Stec W. J., Zon G., Shinozuka K., Marzilli L. G., (1986), *Chem. Ser.*, **26**, 221-224.
6. Stec W. J., Zon G., Gallo K. A., Byrd R. A., Uznański B., Guga P., (1985), *Tetrahedron Lett.*, **26**, 2191-2194.
7. Uznański B., Wilk A., Grajkowski A., (1989), *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4863-4871.
8. Cahn R. S., (1964), *J. Chem. Educ.*, **41**, 116-120.
9. Connolly B. A., Potter B. V. L., Eckstein F., Pingoud A., Grotjahn L., (1984), *Biochemistry*, **23**, 3443-3453.
10. Stec W. J., Zon G., w „A Collection of Invited Section and Colloquium Lectures Presented at the 14<sup>th</sup> IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Poznań, Poland, 9—14 July 1984”, (1985), (red. Zalewski R.J., Skolik J.J., Elsevier), str. 495-510.
11. Bryant R. F., Benkovic S. J., (1979), *Biochemistry*, **18**, 2825-2828.
12. Potter B. V. L., Connolly B. A., Eckstein F., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1369-1377.
13. Guga P., Koziółkiewicz M., Okruszek A., Uznański B., Stec W. J., (1987), *Nucleosides & Nucleotides*, **6**, 111-119.
14. Koziółkiewicz M., Uznański B., Stec W. J., (1989), *Nucleosides & Nucleotides*, **8**, 185-200.
15. Stec W. J., Okruszek A., Michalski J., (1976), *J. Org. Chem.*, **41**, 233-238.
16. Daub G. W., von Tاملen E. E., (1977), *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3526-3529.
17. Brennan C. A., Van Cleve M. D., Gumpert R. J., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 7270-7278.
18. Jen-Jacobson L. — dane nieopublikowane
19. McClarin J. A., Frederick C. A., Wang B.-Ch., Greene P., Boyer H. W., Grable J., Rosenberg J. M., (1986), *Science*, **234**, 1526-1541.
20. Lu A.-L., Jack W. E., Modrich P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 13200-13206.

# SPRAWOZDANIE

## Drugie Międzynarodowe Sympozjum „Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases”

27-29 sierpnia 1990 r., Lublin

Wobec dużego zainteresowania, jakim cieszyło się pierwsze międzynarodowe sympozjum poświęcone peroksydazom roślinnym (Genewa, 17-20 września 1985 r.) postanowiono zorganizować następne nie dalej niż za pięć lat. Jako miejsce sympozjum wybrano Uniwersytet Marii Curie — Skłodowskiej w Lublinie, którego Zakład Biochemii ma już swoją tradycję i dorobek w badaniach peroksydaz grzybów wyższych, zwłaszcza tych gatunków *Basidiomycetes*, które biorą udział w degradacji ligniny. Ustalono, że organizatorami będą wspólnie Uniwersytet w Genewie i UMCS, zaś do Komitetu Naukowego weszli: prof. dr hab. Jerzy Łobarzewski (UMCS), prof. Hubert Greppin (Universite de Geneve), prof. Thomas Gaspar (Universite de Liege) i dr Claude Penel (Universite de Geneve). Po ustaleniu terminu sympozjum (koniec sierpnia 1990) rozesłano w drugiej połowie roku 1989 pierwsze zawiadomienia do wszystkich liczących się ośrodków badań peroksydaz roślinnych. Uzyskano tak

wiele zgłoszeń, że drugie zawiadomienia wysłano już imiennie do ponad dwustu osób deklarujących swój czynny udział w sympozjum. Ostatecznie do Lublina przybyło ponad sto osób ze wszystkich stron świata, od Hawajów do Władystoku i od Argentyny do obu Korei. Opłatę za uczestnictwo w sympozjum tak skalkulowano, by przy kwocie niższej niż za udział w analogicznych sympozjach na zachodzie uzyskać samofinansowanie, a nawet dochód. Z części tego dochodu oraz dotacji obu uniwersytetów współorganizujących sympozjum pokryto koszty podróży i udziału kilku uczestników, którzy złożyli o to wnioski.

Językiem obrad był język angielski. Obrady sympozjum toczyły się w pięciu sesjach tematycznych:

1. Structure and mechanisms of reactions (physicochemistry, biochemistry and molecular biology)
2. Synthesis (up to isoperoxidase diversity, traffic and location)
3. Mechanisms of control. Genetics and molecular physiology.



4. Markers and roles in growth and developmental processes, including reactions to pathogens.
5. Ecophysiology and environment. Biotechnological and industrial applications, including immobilization and analytical procedures.

Wszystkie sesje obejmowały wykłady plenarne i sekcje plakatowe. W sumie wygłoszono 35 wykładów i przedstawiono 36 plakatów. Wykład inauguracyjny pt. „The peroxidase superfamily” wygłosiła prof. Karen Welinder z Kopenhagi. Z następujących po inauguracyjnym wykładów sesji pierwszej duże zainteresowanie wzbudziły wykłady prof. Yuhei Mority (Kyoto) o strukturze pierwszorzędowej izozymu E5 peroksydazy chrzanowej, prof. Roberta van Huystee (London, Ontario) o glikozydowych składnikach peroksydaz i dr Nigela Veitcha (Oxford) o badaniach metodą  $^1\text{H-NMR}$  interakcji peroksydaza — substrat aromatyczny. W czasie sesji drugiej ożywną dyskusję wywołał wykład dr Claude Penela o udziale wapnia w wiązaniu peroksydaz ze strukturami subkomórkowymi. W sesji trzeciej, o stosunkowo największej ilości zgłoszonych wykładów i plakatów, wygłoszono dwa wykłady poświęcone udziałowi peroksydaz w syntezie ligniny (dr Renee Goldberg i dr Serge Schneider z Paryża) i dwa udziałowi peroksydaz w degradacji ligniny (prof. Andrzej Leonowicz z Lublina i dr Christopher Haertig z Lipska). Ponieważ w innych sesjach również zgłoszono doniesienia związane tematycznie z udziałem peroksydaz w ligninolizie, zarysowała się nieformalna „podsessa” dotycząca biotransformacji ligniny i jej monomerów, bardzo użyteczna dla zorientowania się w bieżącej problematyce badawczej europejskich zespołów zajmujących się tym właśnie zagadnieniem.

Podczas sesji czwartej, poświęconej głównie udziałowi peroksydaz w kontroli wzrostu roślin, duże zainteresowanie wzbudził wykład prof. Huberta Greppin o powiązaniu kontroli kwitnienia przez fitochrom z aktywnością peroksydaz tonoplastu komórek roślinnych. Z wykładów sesji piątej, poświęconej aspektom środowiskowym, szeroką dyskusję spowodowały wykłady o indukcji dwu nowych izo-

zymów peroksydazy *Phaseolus vulgaris* przez toksyczne ale nieletalne stężenia kationów cynku (II) (Frank Van Assche z Uniwersytetu w Limburgu w Belgii) i o przydatności immobilizowanej peroksydazy jako enzymu modelowego w badaniach wpływu kationów metali i pestycydów na jej aktywność (prof. Jerzy Lobarzewski z UMCS w Lublinie). Sympozjum zamknął adres pożegnalny, wygłoszony przez prof. Thomasa Gaspara (Liege) i prof. Sanforda Siegela (Honolulu).

Sesja plakatowa miała miejsce drugiego dnia obrad. Wiele plakatów miało charakter publikacji przygotowanej do druku, z przejrzystym układem części pracy, obfitym materiałem ilustracyjnym i obszerną literaturą. Wyróżniały się plakaty poświęcone udziałowi peroksydazy w ligninolizie (dr Christine Evans z Londynu), peroksydazom manganozależnym grzybów wyższych (zespół prof. Nymana z Uniwersytetu w Lund) i peroksydazom z kultur tkankowych *Medicago sativa* (zespół prof. Very Urmantsevej z Instytutu im. Timiriaziewa w Moskwie). Całość materiałów obejmująca streszczenia wykładów i zawartości plakatów została opublikowana w broszurze w sierpniu 1990 w Lublinie<sup>1</sup>, zaś wybrane prace będą wydane w wydawnictwie książkowym Uniwersytetu Genewskiego w pierwszej połowie roku 1991.

Obradom naukowym towarzyszył program nieoficjalny, przede wszystkim dla osób towarzyszących uczestnikom Sympozjum. W programie przewidziano wycieczkę do Kozłówek (muzeum wnętrz) i zwiedzanie Lublina. Na zakończenie odbyło się spotkanie towarzyskie, podczas którego w wyjątkowo miłej atmosferze, chociaż zupełnie nieoficjalnie, zobowiązano Komitet Naukowy do zorganizowania trzeciego sympozjum nie dalej niż w roku 1993. Gospodarzem tego sympozjum zgodziła się być prof. Karen Welinder z Kopenhagi.

Grzegorz Nowak

<sup>1</sup> Pojedyncze egzemplarze *Streszczeń* są jeszcze dostępne u prof. Jerzego Lobarzewskiego, w Zakładzie Biochemii UMCS, Plac Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin.

# SIGMA Chemical Company, USA

oraz  
**E. MERCK, Niemcy**

import odczynników chemicznych

Szybko ! Fachowo ! Bez kłopotów !

zamówienia: „Aurum” Sp. z o.o., 01-833 Warszawa, Daniłowskiego 1 /25

informacje: 35-20-55, 45-25-42 W-wa

# Biochemiczne podstawy nefrotoksycznego działania antybiotyków aminoglikozydowych

## Biochemical aspects of aminoglycoside nephrotoxicity

MARIUSZ MICHALIK<sup>1</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Charakterystyka antybiotyków aminoglikozydowych
- III. Transport antybiotyków przez błony komórkowe
- IV. Wpływ antybiotyków aminoglikozydowych na metabolizm nerki
  - IV-1. Oddziaływanie antybiotyków aminoglikozydowych z błonami komórek proksymalnych kanalików nerkowych
  - IV-2. Metabolizm lipidów
  - IV-3. Glukoneogeneza
  - IV-4. Oddychanie
  - IV-5. Synteza i degradacja białek
- V. Czynniki modyfikujące nefrotoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych
- VI. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Characterization of aminoglycoside antibiotics
- III. Cell membrane transport of aminoglycoside antibiotics
- IV. Effect of aminoglycoside antibiotics on renal metabolism
  - IV-1. Interactions with membranes of proximal tubular cells
  - IV-2. Lipid metabolism
  - IV-3. Gluconeogenesis
  - IV-4. Mitochondrial respiration
  - IV-5. Protein synthesis and degradation
- V. Modification of aminoglycoside nephrotoxicity
- VI. Concluding remarks

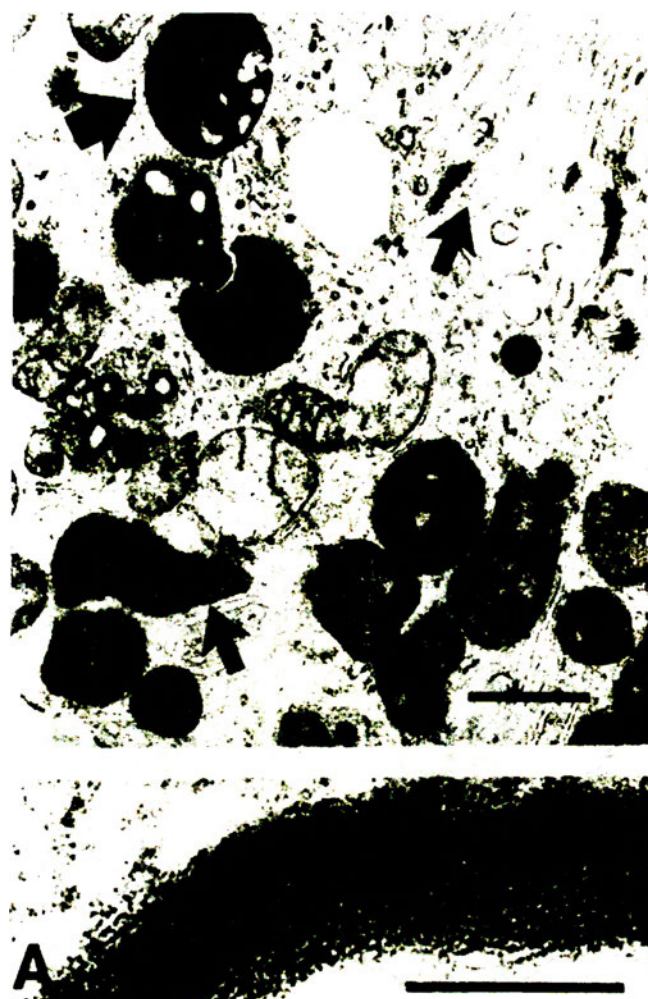
## I. Wstęp

Antybiotyki aminoglikozydowe są często stosowane we współczesnej terapii. Szeroki zakres działania antybakteryjnego oraz łatwość ich stosowania sprawia, że są one bardzo użyteczne w leczeniu infekcji wywołanych przez drobnoustroje gram ujemne [1,2]. Antybiotyki te wykazują jednak również działanie uboczne, polegające między innymi na upośledzeniu funkcji nerek u 10-15% pacjentów przyjmujących te leki [3-6]. W mniejszym stopniu (1-3%) są one również ototoksyczne [4, 7, 8], ale wywołane przez nie zmiany są najczęściej nieodwracalne.

Niewydolność nerek spowodowana działaniem antybiotyków aminoglikozydowych pojawia się w 7—10 dni od momentu rozpoczęcia leczenia i trwa do 10—30 dnia po zakończeniu terapii [6, 9, 10]. Przed pojawie-

niem się typowych klinicznych objawów uszkodzenia nerek, takich jak wzrost stężenia kreatyniny w osoczu oraz azotu mocznikowego we krwi, stwierdzić można między innymi zwiększenie ilości w moczu niskocząsteczkowych białek, takich jak lizozym, czy  $\beta_2$ -mikroglobulina. Jest to spowodowane obniżeniem ich reabsorpcji w kanalikach proksymalnych [11-13]. Wzrasta

Ryc. 1. Zmiany w komórkach kanalików proksymalnych nerki człowieka wywołane działaniem antybiotyków aminoglikozydowych podawanych przez 4 dni w dawce terapeutycznej. Lizosomy (duża strzałka) zawierają twory blaszkowate. Rąbek szczoteczkowy, mitochondria (małe strzałki) zachowują prawidłową strukturę. Poniżej powiększony fragment lizosomu. Kreska na górnym rysunku odpowiada 1  $\mu\text{m}$ , na dolnym — 0,1  $\mu\text{m}$ . Wg De Broe i wsp. [19]. Dzięki uprzejmości autorów oraz za zgodą *Kidney Int.*



<sup>1</sup>Mgr, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

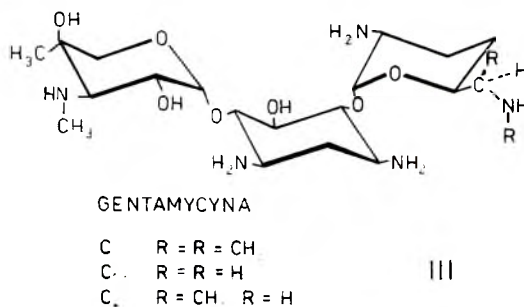
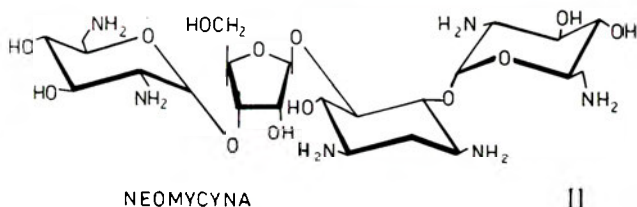
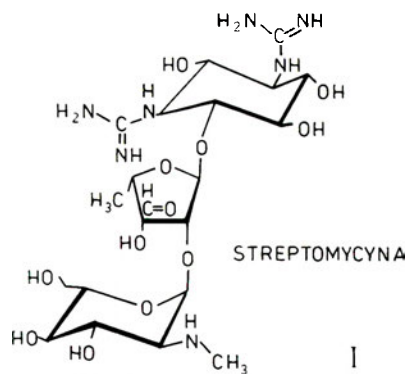
też znacznie aktywność niektórych enzymów rąbka szczoteczkowego [14, 15] oraz stężenie jonów sodu [9]. Procesom tym towarzyszą zmiany morfologiczne w komórkach proksymalnych kanalików nerkowych. Zwiększa się ilość oraz rozmiar lizosomów, w których nagromadzają się polarne lipidy w postaci tworów blaszkowatych (Ryc. 1) oraz następuje stopniowe zanikanie rąbka szczoteczkowego [16-19]. Stosowanie większych dawek lub przedłużanie czasu stosowania antybiotyków aminoglikozydowych spowodować może narcozę (Ryc. 2).

Wiedza dotycząca zaburzeń metabolicznych i funkcjonalnych kory nerki wywołanych działaniem antybiotyków aminoglikozydowych pochodzi często z badań z zastosowaniem zwierząt laboratoryjnych jako materiału doświadczalnego [17, 20-22]. Wymaga to zwykle użycia znacznie większych dawek antybiotyków (10-60 razy) niż u ludzi [21, 23, 24], chociaż istnieją pewne gatunki szczurów wykazujące podobną do ludzkiej wrażliwość na antybiotyki aminoglikozydowe [16, 22].

## II. Charakterystyka antybiotyków aminoglikozydowych

Antybiotyki aminoglikozydowe są jedną z najwcześniej poznanych grup antybiotyków. W roku 1944, a więc wkrótce po pierwszych klinicznych próbach z penicylinami, z hodowli *Streptomyces griseus* wyizolowano streptomycynę (I) [25]. Następnie wyizolowano i scharakteryzowano neomycynę (II) (1949) [26], kanamycynę (1957) [27], gentamycynę (III) (1963) [28] i sysomycynę (1970) [29].

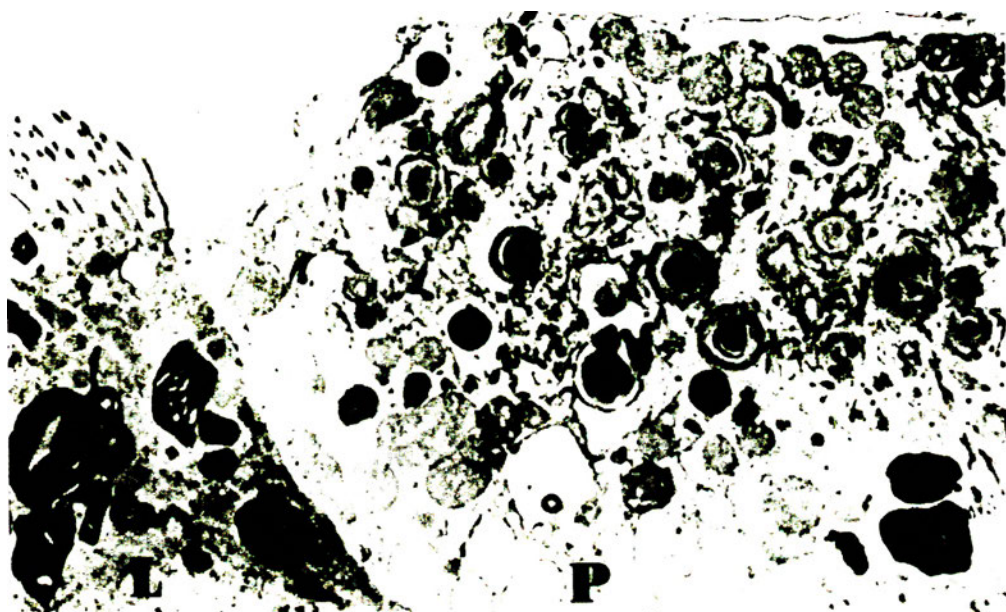
Pod względem chemicznym antybiotyki aminoglikozydowe stanowią zróżnicowaną grupę związków wielocukrowych, chociaż najbardziej charakterystycznym składnikiem ich cząsteczek jest nie cukier, lecz alkohol cykliczny podstawiony grupami aminowymi.



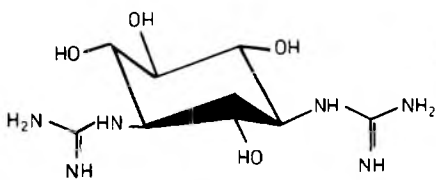
Są bezbarwne i dobrze rozpuszczalne w wodzie. Z wyjątkiem streptomycyny (I), będącej pochodną streptydyny (IV), pozostałe antybiotyki aminoglikozydowe są glikozydami 2-deokystreptaminy (V) [30].

Nowe, półsyntetyczne antybiotyki aminoglikozydowe powstają w wyniku modyfikacji antybiotyków występujących naturalnie [30, 31]. Na przykład kanamycyna używana jest do produkcji tobramycyny (VI).

Ryc. 2. Mikrofotografia elektronowa komórek kanalika proksymalnego nerki szczura po 8 dniach podawania gentamycyny w dawce 100 mg/kg dziennie. Komórka po lewej stronie (L) zawiera powiększone lizosomy z tworami blaszkowatymi, zachowując prawidłową strukturę. Komórka po prawej stronie (P) uległa degradacji. Wg K. Aloyanidesa i Pastoriya-Munoz [49]. Dzięki uprzejmości autorów oraz za zgodą *Kidney Int.*

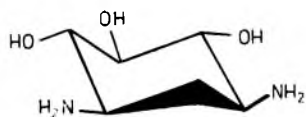


STREPTYDYNA

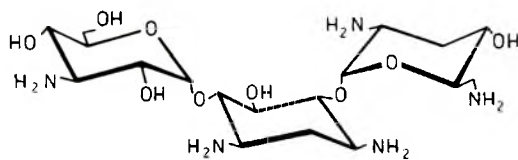


IV

2-DEOKSYSTREPTAMINA

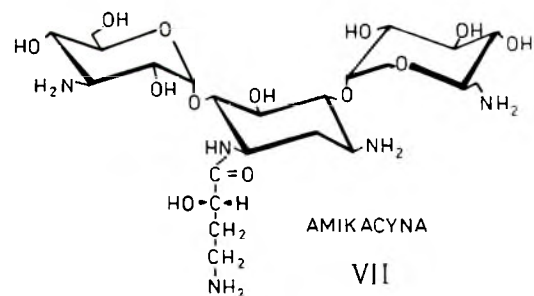


V



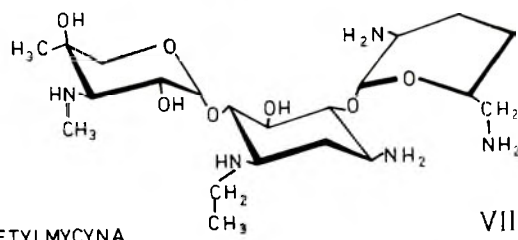
TOBRAMYCYNA

VI



AMIKACYNA

VII



NETYLMYCYNA

VIII

występującej również naturalnie, amikacyny (VII) czy dibekacyny. Innym przykładem jest syntetyzowana z sysomycyny netylmycyna (VIII), strukturalnie podobna również do gentamycyny (III). Zasadnicza różnica polega na obecności w cząsteczce netylmycyny grupy N-etylowej w miejscu występującej w sysomycynie grupy aminowej w pozycji 1 2-deoksyestreptaminy. Grupa N-etylowa ochrania netylmycynę przed inaktywacją przez szereg enzymów występujących w komórkach bakteryjnych, odpowiedzialnych za odporność na tego typu antybiotyki. Enzymy te mogą modyfikować cząsteczkę antybiotyku poprzez: acetylację grup aminowych, oraz fosforylację lub adenylację grup hydroksylowych [1, 32-35]. Zakres przeciwbakteryjnego działania netylmycyny jest podobny do obserwowanego w przypadku innych antybiotyków.

Poszczególne antybiotyki aminoglikozydowe różnią się między sobą liczbą grup aminowych ulegających jonizacji. Neomycyna zawiera ich 6, gentamycyna, tobramycyna i netylmycyna — 5, kanamycyna oraz amikacyna — 4. Streptomycyna posiada tylko 3 takie grupy. Wydaje się, że ładunek antybiotyków aminoglikozydowych wynikający z jonizacji grup aminowych jest odpowiedzialny za oddziaływanie tych związków z błonami biologicznymi oraz za ich właściwości nefrotoksyczne [36, 37].

Zasadniczo stopień w jakim antybiotyki aminoglikozydowe hamują oddychanie mitochondriów w stanie 3 oraz w obecności związków rozpręgających (patrz rozdział IV-4.) jest proporcjonalny do ładunku dodatniego grup aminowych w cząsteczkach tych związków [38]. Podobną zależność stwierdzono badając wpływ antybiotyków aminoglikozydowych na aktywność fosfolipazy C [39, 40] oraz poziom fosfolipidów w moczu, będący czułym wskaźnikiem nefrotoksycznego działania tych związków [41], a także na szybkość syntezy glukozy w izolowanych kanalikach nerkowych [42]. Co więcej, antybiotyki aminoglikozydowe można podobnie uszeregować pod względem ich zdolności do wywoływania klinicznych objawów uszkodzenia nerek [36, 43, 44]. Również inne nisko-

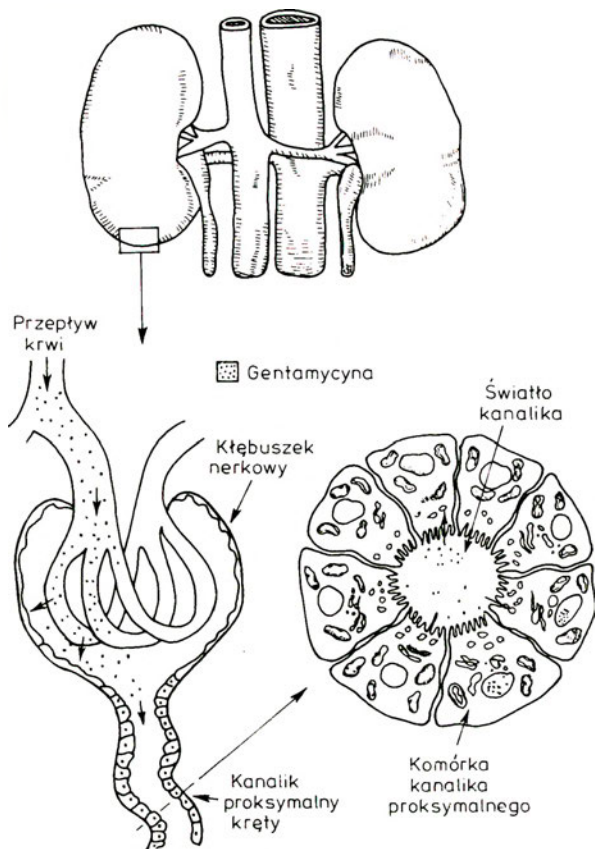
cząsteczkowe związki organiczne, obdarzone dużym ładunkiem dodatnim, wykazują takie właściwości [45-47]. Należy jednak podkreślić, że antybiotyki o takim samym ładunku w różnym stopniu zmieniają strukturę i funkcje kory nerki [48]. Może to być spowodowane różnicami w przestrzennym umiejscowieniu grup aminowych w cząsteczce antybiotyku lub różną zdolnością tych związków do nagromadzenia się w korze nerki [49].

### III. Transport antybiotyków przez błony komórkowe

Przy użyciu techniki mikroinfuzji wykazano, że <sup>3</sup>H-gentamycyna jest wchłaniana zwrotnie wzdłuż części krętej proksymalnych kanalików nerkowych i pętli Henlego [50, 51] (Ryc. 3). Natomiast nie stwierdzono reabsorpcji antybiotyku w kanalikach dystalnych. Badania autoradiograficzne potwierdziły pogląd, że gentamycyna nagromadza się w kanalikach proksymalnych [52-56]. Podobną lokalizację stwierdzono w przypadku netylmycyny, tobramycyny i amikacyny [56, 57].

Nefrotoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych jest tym większe, im większa jest zawartość tych związków w korze nerki [58, 59]. Ich stężenie może przewyższać 10—30-krotnie stężenie antybiotyków w osoczu [17, 60] i po 4 dniach stosowania (w dawce 100 mg/kg wagi ciała dziennie) u szczurów wynosić może ponad 2 mg/g tkanki [48, 49]. Zależy ono od wielkości dawki, częstotliwości podawania leku oraz czasu jego stosowania, aż do momentu ustalenia się równowagi pomiędzy pobieraniem i uwalnianiem tych związków z kory nerki [58].

Antybiotyki aminoglikozydowe wydalone są z organizmu prawie wyłącznie za pośrednictwem nerki [61, 62]. Jeśli organ ten funkcjonuje prawidłowo, stężenie antybiotyków we krwi spada szybko po ich podaniu z biologicznym czasem półtrwania równym 2 godziny u człowieka [61] lub 1 godzinę u szczura [48]. Mimo to po upływie doby tylko 60-90% dawki zostaje wydalo-



**Ryc. 3.** Lokalizacja antybiotyków aminoglikozydowych w nerce. Znaczna część antybiotyku znajdującego się w krwiobiegu zostaje wydalona, jednak pewna jego ilość jest pobierana przez komórki kanalików proksymalnych i akumulowana w lizosomach kory nerki. Objasnienia w tekście. Wg Laurenta i Tulkena [24]. Dzięki uprzejmości autorów i za zgodą *Inst. Sci. Inform.*

na z moczem [62-64]. Następnie ma miejsce powolne uwalnianie antybiotyku z kanalików proksymalnych, trwające 3-4 tygodnie [62, 64].

Wydaje się, że antybiotyki aminoglikozydowe są transportowane przez błonę luminalną kanalików proksymalnych na drodze endocytozy [52, 54, 65c]. Pierwszym etapem tego procesu jest wiązanie antybiotyku ze znajdującymi się w tej błonie, receptorami, którymi prawdopodobnie są kwaśne fosfolipidy [66, 70]. Po około 10 minutach od pulsowego podania <sup>3</sup>H-gentamycyny antybiotyk ten znajdowano w błonach pęcherzyków apikalnych komórek kanalików proksymalnych, a po godzinie w lizosomach, powstałych prawdopodobnie w wyniku fuzji pęcherzyków z lizosomami pierwotnymi [50, 52, 54].

Przypuszcza się, że antybiotyki aminoglikozydowe mogą być transportowane przez błonę luminalną przy pomocy układów transportujących aminokwasy zasadowe [71, 72], ponieważ aminokwasy te obniżają zawartość antybiotyków w korze nerki. Ze względu na wysokie stężenia aminokwasów wymagane do osiągnięcia takiego efektu nie można wykluczyć, że zasady aminokwasy hamują wiązanie gentamycyny przez receptory błonowe, nie zaś współzawodniczą o nośnik. Co więcej, wzrost stężenia białek w płynie kanalikowym również obniża pobieranie gentamycyny przez

komórki kanalików proksymalnych [73].

Na podstawie badań wiązania znakowanej netylmycyny przez pęcherzyki błon bazolateralnych kanalików proksymalnych wykazano, że powinowactwo receptorów w tych błonach do antybiotyku jest podobne do obserwowanego w rąbku szczoteczkowym. Maksymalna zdolność wiązania w przeliczeniu na miligram białka błonowego jest w tym przypadku znacznie większa [69]. Wiązanie gentamycyny przez błony luminalne, jak i antyluminalne kory nerki szczura wykazuje podobną kinetykę [74].

Dane dotyczące transportu antybiotyków aminoglikozydowych przez błony bazolateralne pochodzą głównie z badań przy użyciu skrawków kory nerki [50, 75-79] lub — rzadziej — z zastosowaniem izolowanych kanalików proksymalnych [80]. Proces ten charakteryzuje się kinetyką wysycenia i jest hamowany przez inne antybiotyki aminoglikozydowe w stopniu zależnym od ich stężenia [81]. Pobieranie gentamycyny jest częściowo hamowane przez dinitrofenol, rotenon, jodoctan, strofantynę G czy też warunki beztlenowe [75, 76, 79, 80, 82, 83], co wskazuje, że transport antybiotyku przebiega przy udziale energii. Wiadomo, że układ ten nie transportuje zasad lub kwasów organicznych czy aminokwasów [50, 76-78]. Tylko około 1/4 ilości gentamycyny jest transportowana przez błony bazolateralne [65]. Jednak ta stosunkowo niewielka ilość może być w dużym stopniu odpowiedzialna za toksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych. Związki te mogą oddziaływać z organellami wewnątrzkomórkowymi, wpływając na funkcjonowanie określonych szlaków metabolicznych [84].

Ze względu na to, że gentamycyna jest transportowana przez pęcherzyki rąbka szczoteczkowego *in vitro* [85], nie można wykluczyć innej drogi wejścia antybiotyków aminoglikozydowych do komórek kanalików proksymalnych [56]. Jednocześnie słaba rozpuszczalność tych związków w lipidach oraz ich słabe oddziaływanie z lipidami błon biologicznych wskazuje, że dyfuzja nie odgrywa znaczącej roli w transporcie antybiotyków aminoglikozydowych do kanalików proksymalnych [49, 86].

#### IV. Wpływ antybiotyków aminoglikozydowych na metabolizm nerki

Gentamycyna obniża znacznie kłębuszkowy współczynnik filtracji [87, 88] oraz powoduje prawdopodobnie zmiany strukturalne w obrębie kłębuszków nerkowych [89, 90]. Drastyczne zmiany wywołane przez antybiotyki aminoglikozydowe dotyczą jednak komórek kanalików proksymalnych (Tab. 1-3). Związki te oddziałując z błonami zakłócają transport substratów przez błony komórkowe, niekorzystnie wpływają na metabolizm lipidów, powodują zmiany funkcjonalne w mitochondriach oraz zakłócają syntezę i katabolizm białek.

**Tabela 1**

Zmiany w korze nerki wywołane przez antybiotyki aminoglikozydowe

Związki, jony	Wpływ antybiotyków		Piśmiennictwo
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
Fosfolipidy: zawartość całkowita fosfatydyloinozytoli	bz, † †		84,91-96
Woda w tkance	bz		97
Białko (w przeliczeniu na mg suchej masy)	bz		97
ATP w nerce	↓		98-100
Glutation w korze nerki	↓		97
Zawartość: K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup>	↓ †		97,101 97,101
Zawartość jonów w mitochondriach: K <sup>+</sup> Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>	↓ bz		97 97

bz — brak wpływu antybiotyków

† — wzrost

↓ — spadek

**Tabela 2**

Wpływ antybiotyków aminoglikozydowych na metabolizm nerki

Procesy	Wpływ antybiotyków		Piśmiennictwo
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
Synteza glukozy	↓	↓	20,82,102,103
Ammoniogeneza	↓		20
Synteza fosfolipidów	†		84
Pobieranie kwasów i za- sad organicznych	↓ ↓	↓	20,60,79,104-110
Oddychanie mitochond- riów:			38,97,98,111,112
w stanie 3	↓	↓	
w stanie 4	bz	†	
rozprężonych	↓	↓	
Szybkość karboksylacji pirogonianu i propio- nianu		↓	102
Zawartość oksydazy cyto- chromu c i cytochromu c	↓		112
Synteza DNA	†		83,113-115

Objaśnienia jak w Tabeli 1.

#### IV-1. Oddziaływanie antybiotyków aminoglikozydowych z błonami proksymalnych kanalików nerkowych

Najwcześniejszymi zaburzeniami spowodowanymi działaniem antybiotyków aminoglikozydowych są zmiany funkcjonalne i strukturalne w błonach komórkowych, zarówno bazolateralnych, jak i rąbka szczoteczkowego. Antybiotyki te hamują aktywność ATPazy zależnej od jonów sodu i potasu już w pół godziny po jednorazowym podaniu antybiotyku szczurom. Jednakże po upływie doby aktywność tego enzymu jest równa ponownie wartościom kontrolnym [132]. Z dru-

**Tabela 3**

Wpływ antybiotyków aminoglikozydowych na aktywność niektórych enzymów w korze nerki

Enzym	Wpływ antybiotyków		Piśmiennictwo
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
Amino-peptydaza alaninowa	↓		113
ATPaza zależna od Na <sup>+</sup> – K <sup>+</sup>	↓	↓	93,114-118
Cyklaza adenyłowa	†		119
Dekarboksylaza ornity- nowa		↓	120
Dysmutaza ponadtlen- kowa	↓		100
γ-glutamylotransferaza	↓		113,119
Fosfataza alkaliczna	↓		93
Fosfolipaza C rąbka szczoteczkowego		↓	121
Cytoplazmatyczna fosfolipaza C	↓		39,96,122
Lizosomalna fosfolipaza A i C	↓	↓	91,92,123,124
Katalaza	↓		40,99,100
Kinaza białek		↓	125
Oksydaza cytochromu c	↓		18,93,113
Fosfodiesteraza sfingomieliny	↓	↓	18,92,113,126-128

† — wzrost aktywności

↓ — spadek aktywności

giej strony wiadomo, że przy długotrwałym stosowaniu gentamycyna hamuje znacznie aktywność ATPazy zależnej od Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> w korze nerki [117]. Wykazano także hamujące działanie antybiotyków aminoglikozydowych na aktywność ATPazy zależnej od Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> *in vitro* [114, 115, 116].

Gentamycyna hamuje też związaną z błonami bazolateralnymi cyklazę adenyłową stymulowaną przez NaF [133] oraz zwiększa prawie dwukrotnie aktywność cyklazy adenyłowej stymulowanej przez izoprote-renol lub nukleotydy guanylowe w błonach plazmatycznych [119]. Autorzy tłumaczą to zjawisko wzrostem zawartości w tych błonach fosfatydylocholino-na skutek zahamowania lizosomalnych fosfolipaz (patrz rozdział IV-3.). Zaburzenia te mogą wywołać zmiany w oddziaływaniu podjednostki regulacyjnej i katalitycznej cyklazy adenyłowej [133].

Antybiotyki aminoglikozydowe hamują aktywność enzymów rąbka szczoteczkowego, takich jak fosfataza alkaliczna [93], γ-glutamylotransferaza czy też amino-peptydaza alaninowa [113] oraz powodują wzrost ich wydalania z moczem [134, 135]. Obserwuje się również wzrost zawartości fosfatydyloinozytoli w błonie rąbka szczoteczkowego [84, 93].

W początkowym okresie po podaniu gentamycyny stwierdzono zmniejszenie szybkości transportu kwasu ρ-aminohipurowego (PAH) w nerce szczura, podczas gdy po dwóch dobach następował wyraźny wzrost szybkości tego procesu [104]. Podobne zmiany obserwowano również badając transport zasad organicznych i aminokwasów. Obserwowana stymulacja transportu kwasów organicznych jest prawdopodobnie spowodowana ograniczeniem ich pasywnego wpływu

poprzez błony bazolateralne komórek kanalików proksymalnych, przy jednoczesnym zwiększeniu szybkości aktywnego transportu (być może w efekcie wzrostu ilości lub aktywności nośników odpowiedzialnych za transport tych związków) [106]. Podobnie jak gentamycyna, również inne antybiotyki aminoglikozydowe stymulują ten proces [105]. Rola stymulacji transportu kwasów organicznych w wyniku stosowania antybiotyków aminoglikozydowych nie jest jasna. Być może ma ona kompensować zaburzenia w funkcjonowaniu komórek kanalików proksymalnych, obserwowane w przypadku stosowania różnych toksyn [136]. Podkreślić należy jednak, że większość autorów wykazała znaczne obniżenie szybkości transportu zarówno kwasów, jak i zasad organicznych w wyniku długotrwałego stosowania antybiotyków aminoglikozydowych [60, 79, 105, 107]. Natomiast Kluwe i Hoek [20] nie stwierdzili wpływu gentamycyny na pobieranie kwasu  $\rho$ -aminohipurowego przez skrawki kory nerki szczura, a także  $\alpha$ -metylo-D-glukopiranozydu (analog cukru) i kwasu  $\alpha$ -aminoizomasłowego (analog aminokwasu), podczas gdy pobieranie amidu kwasu N-metylo-nikotynowego było wyraźnie obniżone. Podobne wyniki otrzymano również przy użyciu pęcherzyków z błon luminalnych i bazolateralnych [132]. Nie stwierdzono natomiast wpływu gentamycyny na transport glukozy mimo pojawienia się jej w moczu w trakcie podawania antybiotyków aminoglikozydowych [20, 108].

Antybiotyki aminoglikozydowe zmieniają przepuszczalność błon komórkowych dla kationów jedno- i dwuwartościowych oraz zakłócają równowagę elektrolitową organizmu [101, 137-140]. Gentamycyna zwiększa wydzielanie jonów potasu w kanalikach dystalnych, powodując kaliurezę [141]. Obniża też zawartość potasu w korze nerki [117]. Być może antybiotyki aminoglikozydowe, podobnie jak i inne organiczne polikationy, zwiększają przepuszczalność błon komórkowych dla potasu [142]. Co więcej, spadek zawartości potasu powoduje w następstwie nasilenie nefrotoksycznego działania gentamycyny, związane z szybszym nagromadzeniem leku w komórkach kanalików proksymalnych [143]. Wzrasta także wydalanie z moczem magnezu i wapnia [144], czemu towarzyszy spadek zawartości magnezu w korze nerki już we wczesnym okresie stosowania gentamycyny [97, 117]. Natomiast po 10 dniach stosowania gentamycyny (100 mg dziennie) stwierdzono dwukrotny wzrost zawartości jonów sodu oraz ponad pięciokrotny wzrost zawartości jonów wapnia w korze nerki oraz w mniejszym stopniu w mitochondriach [97]. Zaburzenia równowagi jonowej (głównie wzrost zawartości wapnia), jakkolwiek nie odgrywają dużej roli w początkowym okresie stosowania antybiotyków aminoglikozydowych, przy długotrwałym leczeniu mogą prowadzić do nieodwracalnych zmian funkcjonalnych nerki. Co więcej, podanie szczurom witaminy D w dawkach powodujących hiperkalcemię, nasilało nefroto-

ksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych [145]. Udział jonów wapnia w patogenezie zaburzeń funkcjonalnych innych organów jest zasadniczo udowodniony [146-151].

## IV-2. Metabolizm lipidów

Po podaniu antybiotyków aminoglikozydowych zwiększa się w korze nerki zawartość fosfatydyloinozytolu, fosfatydylocholiny, fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy [84, 91, 95, 96].

Obserwowane zmiany składu fosfolipidów w błonach komórkowych i mitochondrialnych [69, 84, 93] są prawdopodobnie wynikiem oddziaływania antybiotyków aminoglikozydowych z fosfatazą fosforylanową (tak jak w przypadku innych związków posiadających ładunek dodatni) [152]. Również lizosomy otrzymane z kory nerki zwierząt traktowanych tymi antybiotykami wykazują zwiększoną zawartość fosfolipidów [84, 96], stanowiących głowy składnik materiału gromadzącego się w tych organellach [153, 154]. Są dane wskazujące, że zjawisko to związane jest ze zmniejszeniem degradacji fosfolipidów błonowych w wyniku zahamowania lizosomalnych enzymów przez antybiotyki aminoglikozydowe, nagromadzające się w lizosomach [52, 53, 113]. Stwierdzono, że podana szczurom gentamycyna powoduje proporcjonalne do dawki zwiększenie zawartości fosfolipidów w korze nerki oraz hamuje aktywność sfingomielinazy i fosfolipazy A [92, 93, 123]. Enzymy te, jak również lizosomalna [123], cytoplazmatyczna [39, 122] oraz związana z łańcem szczoteczkowym [121] fosfolipaza C są także hamowane przez antybiotyki aminoglikozydowe *in vitro*. W konsekwencji obniżenia aktywności cytoplazmatycznej fosfolipazy C może z kolei zostać obniżona synteza prostaglandyn.

Zgodnie z hipotezą Kaloyanidesa i Pastoriga-Munoz [49] przyczyną nefrotoksycznego działania antybiotyków aminoglikozydowych są zaburzenia struktury i funkcji lizosomów, ponieważ niekontrolowane procesy degradacji mogą pozbawić komórkę substancji wymaganych w procesach reperacyjnych. W wyniku nagromadzenia antybiotyków aminoglikozydowych i fosfolipidów w lizosomach mogą następować zmiany strukturalne prowadzące do uwalniania kwaśnych hydrolaz, które z kolei mogą uszkadzać wewnątrzkomórkowe organelle. Wykazano, że stosunkowo niskie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych, porównywalne do obserwowanych w osoczu podczas antybiotykoterapii, stabilizują lizosomy [155], podczas gdy wysokie stężenia powodują zwiększone uwalnianie enzymów lizosomalnych do środowiska inkubacyjnego [155, 156]. Antybiotyki aminoglikozydowe powodują uwalnianie  $\beta$ -N-acetylo-D-glukozaminidazy, której zwiększoną aktywność stwierdza się w moczu [113, 157, 158].

Brak jednak zależności między zdolnością określonych antybiotyków aminoglikozydowych do uszka-

dziania lizosomów a potencjałem nefrotoksycznym tych antybiotyków [159]. Jest też wątpliwe, czy uwalnianie enzymów z lizosomów prowadzi do enzymatycznej degradacji organelli komórkowych, ponieważ wewnątrzkomórkowe pH znacznie różni się od optymalnego pH działania enzymów lizosomalnych [160]. Co więcej, wiele związków o charakterze kationowym powoduje fosfolipidozę i indukuje zmiany strukturalne lizosomów [153, 161, 162], nie wywołując — w przeciwieństwie do gentamycyny — letalnych zaburzeń komórkowych. Zmiany takie obserwuje się również w komórkach wątroby, niedostępnych dla antybiotyków aminoglikozydowych [163, 164].

Gentamycyna powoduje również zwiększenie peroksydacji lipidów w korze nerki szczurów [165]. Po podaniu tego antybiotyku następuje znaczny wzrost zawartości produktów końcowych peroksydacji, przy jednoczesnym spadku zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [40, 100]. Obserwowano także obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy [100, 166, 167]. Zmiany te mogą prowadzić do rozpoczęcia ataku wolnorodnikowego na wielonienasycone kwasy tłuszczowe, a w efekcie do uszkodzenia błon komórek kanalików proksymalnych. W obecności selenu, który zmniejsza peroksydację kwasów tłuszczowych *in vivo* [168] kliniczne wskaźniki nefrotoksycznego działania gentamycyny były znacznie niższe [169]. Podanie szczurom innych silnych przeciwutleniaczy równocześnie z gentamycyną zapobiega wprawdzie wzmożonej peroksydacji tłuszczowców, nie zmniejsza jednak nefrotoksycznego działania antybiotyku [100, 170, 171]. Nie można zatem wykluczyć, iż zwiększona peroksydacja lipidów jest raczej skutkiem, nie zaś jedną z przyczyn nekrozy spowodowanej działaniem antybiotyków aminoglikozydowych.

### IV-3. Glukoneogeneza

Gentamycyna podawana w dawce 100 mg/kg wagi ciała dziennie hamuje wytwarzanie glukozy i amoniaku w skrawkach kory nerki szczura [20]. Na podstawie badań przy użyciu izolowanych kanalików nerkowych królika można stwierdzić, że wpływ gentamycyny [102] oraz innych antybiotyków aminoglikozydowych [42] na szybkość glukoneogenezy zależy od rodzaju substratu użytego jako prekursor glukozy. Proces ten hamowany jest znacznie z pirogronianu, mleczanu i propionianu zarówno w kanalikach nerkowych szczura [82], jak i królika [102], prawdopodobnie w wyniku obniżenia szybkości reakcji karboksylacji [102]. Największą inhibicję glukoneogenezy obserwuje się w obecności neomycyny i gentamycyny, nieco mniejszą w obecności tobramycyny i kanamycyny. Amikacyna i streptomycyna w niewielkim stopniu hamują ten proces [42]. Obniżenie syntezy glukozy z fruktozy i dihydroksyacetonu jest prawdopodobnie wynikiem zmniejszenia szybkości fosforylacji fruktozy

oraz reakcji katalizowanej przez fruktozo 1,6-bisfosfatazę [103]. Natomiast szybkość wytwarzania glukozy z jabłczanu, 2-oksoglutaranu czy bursztynianu nie ulega zmianie. Co więcej, gentamycyna znosi inhibicję glukoneogenezy obserwowaną w obecności wysokich stężeń cytrynianu [103], wskazując na udział jonów wapnia w mechanizmie działania tego antybiotyku na proces wytwarzania glukozy.

### IV-4. Oddychanie mitochondrialne

Mimo że mitochondria zawierają 25-30% całkowitej komórkowej ilości białka i stanowią około 1/3 objętości komórek proksymalnych kanalików nerkowych [172], zaledwie 10% gentamycyny znajdującej się w tych komórkach jest związane z błonami mitochondrialnymi szczurów traktowanych antybiotykami [173]. Wykazano również działanie tego antybiotyku na funkcje mitochondriów *in vivo*. Niewielkie dawki gentamycyny (3 mg/kg dziennie przez 28 dni) stymulują zużycie tlenu przez mitochondria nerki szczurów, natomiast większe dawki (40 mg dziennie) hamują ten proces oraz wydajność oksydacyjną [174]. Obniżenie oddychania mitochondriów w stanie 3 oraz w obecności związku rozprzegającego oraz stałą szybkość tego procesu w stanie 4 obserwuje się również po podawaniu antybiotyku przez kilka dni [98]. Jednocześnie stwierdza się spadek zawartości ATP w nerce. Brak wpływu na poziom azotu mocznikowego we krwi oraz brak zmian morfologicznych w tych warunkach wskazuje, że zaburzenia funkcjonowania mitochondriów są jednym z pierwszych zmian wywołanych przez antybiotyki aminoglikozydowe. Obniżenie oddychania mitochondriów w wyniku długotrwałego podawania gentamycyny szczurom, może być wynikiem spadku zawartości cytochromu c oraz aa<sub>3</sub> w mitochondriach, na skutek obniżenia szybkości syntezy enzymów łańcucha oddechowego w cytoplazmie [112]. Obniżenie oddychania w stanie 3 oraz w mitochondriach rozprzężonych, przy jednoczesnej stymulacji tego procesu w stanie 4, obserwowano jednak również *in vitro* [8, 111, 175, 176]. Weinberg i współautorzy [38, 111, 176] tłumaczą mechanizm działania gentamycyny współzawodnictwem magnezu i antybiotyku o miejsce wiązania w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, co powoduje wzrost przepuszczalności tej błony dla jednowartościowych kationów sodu i potasu. Wykazano również, że gentamycyna w stężeniach znacznie niższych niż wymagane do obniżenia oddychania, współzawodniczo hamuje pobieranie wapnia przez mitochondria *in vitro* [177].

Inne antybiotyki aminoglikozydowe wywierają podobny do gentamycyny wpływ na oddychanie mitochondriów. Skuteczność ich działania wydaje się zależeć od ładunku dodatniego tych związków, choć nie zawsze odpowiada ich działaniu nefrotoksycznemu [38, 42, 156, 175].



## IV-5. Synteza i degradacja białek

Antybiotyki aminoglikozydowe działają bakterio-bójczo w wyniku nieodwracalnego przyłączenia do podjednostki 30S rybosomów, uniemożliwiając komórkom bakteryjnym kontrolowaną syntezę białek [178-182]. Chociaż stężenia antybiotyków potrzebne do zahamowania biosyntezy białek w komórkach eukariotycznych są dużo większe od obserwowanych w osoczu lub w tkankach ludzi i zwierząt leczonych przy użyciu tych leków, gentamycyna i inne antybiotyki aminoglikozydowe hamują te procesy w mikrosomach izolowanych z mózgu, wątroby i nerek szczurów oraz wątroby człowieka [183]. Stosując niewielkie dawki gentamycyny stwierdzono inhibicję włączania [<sup>3</sup>H] leucyny do mikrosomów nerki szczura, bez zmian szybkości syntezy białek w mikrosomach wątroby i mózgu oraz przy braku klinicznych objawów nefrotoksycznego działania leku (azot mocznikowy, poziom i klirens kreatyniny) [184]. Ponadto obserwowano hamujący wpływ gentamycyny na cytoplazmatyczną biosyntezę niektórych mitochondrialnych enzymów łańcucha oddechowego w korze nerki szczurów (patrz IV-4. oraz 112).

Podczas stosowania wysokich dawek gentamycyny obserwuje się nasilenie postnekrotycznych procesów regeneracji, nawet jeszcze w trakcie podawania leków [185, 186]. Zjawisko to występuje również przy podawaniu niewielkich ilości gentamycyny, jednak przy użyciu konwencjonalnych metod histologicznych można je wykryć dopiero przy długotrwałym stosowaniu antybiotyków [174, 187]. Mierzac włączanie radioaktywnie znakowanej tymidyny do DNA kory nerki szczura obserwowano wzrost syntezy tego kwasu *in vivo* oraz *in vitro*, głównie w komórkach kanalików proksymalnych [129-131]. Może to być wynikiem proliferacji komórek i odzwierciedlać wzmożone procesy regeneracji. Z drugiej strony antybiotyki aminoglikozydowe hamują aktywność kluczowego enzymu biosyntezy poliamin — dekarboksylazy ornitynowej w korze nerki [120]. Ze względu na znaczny udział poliamin w procesach naprawczych [188], spadek aktywności dekarboksylazy ornitynowej może w rezultacie powodować obniżenie komórkowych procesów regeneracji.

Wykazano również wpływ gentamycyny na filtrację, kanalikową reabsorpcję oraz katabolizm niskocząsteczkowych białek. W badaniach *in vivo* i *in vitro* stwierdzono inhibicję degradacji lizozymu w nerce szczura [189]. Antybiotyki aminoglikozydowe wpływają także na modyfikację białek nerki: neomycyna hamuje fosforylację białek w wyniku obniżenia aktywności kinazy białkowej C [125].

## V. Czynniki modyfikujące nefrotoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych

Na nasilenie nefrotoksycznego działania antybiotyków aminoglikozydowych może wpływać wiele czyn-

ników. Mechanizm tych procesów nie jest najczęściej znany, mogą one jednak mieć duże znaczenie podczas antybiotykoterapii. Do czynników modyfikujących działanie tych leków należą między innymi: zawartość kationów jedno- lub dwuwartościowych w pożywieniu, płeć, wiek, czy wreszcie sposób podawania antybiotyków.

**Zawartość elektrolitów.** Antybiotyki aminoglikozydowe zmieniają zawartość niektórych kationów w korze nerki (rozdział IV-1.), zakłócając równowagę elektrolityczną w organizmie. Spadkowi zawartości potasu [143] w korze nerki towarzyszy zaostrenie objawów uszkodzenia nerek, wywołane działaniem antybiotyków aminoglikozydowych. Natomiast wzrost zawartości potasu, sodu czy chloru w diecie może łagodzić nefrotoksyczne działanie tych antybiotyków [143, 190, 191].

Gentamycyna może blokować pobieranie jonów wapnia przez tkankę mięśnia sercowego [192] oraz mitochondria kory nerki szczura [112, 177], prawdopodobnie w wyniku obniżenia zdolności błon do wiązania tych jonów [193]. Z kolei wiązanie i pobieranie antybiotyków aminoglikozydowych przez różne tkanki jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia jonów wapnia [194]. Wapń może również modyfikować wiązanie gentamycyny z błonami wewnątrzkomórkowymi, co wykazano dla mitochondriów [177]. Co więcej, wzrost stężenia wapnia obniża wywołane tobramycyną hamowanie cytoplazmatycznej fosfolipazy C [39]. Również wysoka zawartość wapnia w diecie prowadzi do złagodzenia zaburzeń funkcjonalnych nerek wywołanych gentamycyną *in vivo* [195, 196]. Jest to prawdopodobnie wynikiem zmniejszenia nagromadzenia antybiotyku w korze nerki w skutek osłabienia jego wiązania przez błony rąbka szczoteczkiowego, a następnie pobierania go przez komórki kanalików proksymalnych. Wiązanie to jest również współzawodniczo hamowane przez inne antybiotyki aminoglikozydowe, poliaminy i zasadowe aminokwasy w pęcherzykach rąbka szczoteczkiowego oraz w skrawkach kory nerki [78, 81, 85, 197-199].

Należy również przypomnieć (rozdział IV-4.), że antybiotyki aminoglikozydowe zakłócają wewnątrzkomórkowe procesy oddychania, prawdopodobnie na skutek naruszenia homeostazy potasowo-magnezowej [98]. Z tego względu zachowanie właściwego poziomu obu tych kationów może mieć duże znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

**Płeć i wiek.** Wykazano, że samce szczurów są bardziej wrażliwe niż samice na nefrotoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych [200, 201], być może ze względu na nagromadzanie się ich w większych stężeniach w korze nerki samców, ze względu na obecność testosteronu [202], choć nie wszyscy są co do tego zgodni [201]. Wydaje się, że także u ludzi histologiczny obraz niewydolności nerek spowodowany działaniem antybiotyków aminoglikozydowych zależy od płci [i 27].

Uboeczne skutki stosowania antybiotyków aminoglikozydowych nasilajj się wraz z wiekiem. Zmiany wywołane ich działaniem sã znacznie mniejsze u zwierzãt laboratoryjnych, które nie osiãgnęły dojrzałości pciowej [4, 36, 126, 203, 204]. Niemniej jednak antybiotyki te podawane cięzarnym samicom wywołujã zmiany strukturalne i funkcjonalne w nerkach noworodków [205].

**Sposób podania antybiotyków aminoglikozydowych.** Uboeczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych w znacznym stopniu zależy od dawek tych leków. Nefrotoksyczne działanie gentamycyny u szczurów jest znacznie silniejsze, gdy antybiotyk podawany jest kilkakrotnie w ciãgu dnia, niź jednorazowo w tej samej iloœci [206]. Podobne wyniki otrzymano w przypadku królików [207, 208] i psów [209]. Wydaje się prawdopodobne, że utrzymanie stałego poziomu antybiotyku we krwi (np. podczas ciãgłej infuzji) powoduje zwiêkszonã akumulacjã antybiotyku w korze nerki i nasilenie objawów uboecznego działania leku [210]. Ze względu na istotny wplyw sposobu podawania antybiotyków aminoglikozydowych na wystêpujãce skutki uboeczne, opracowuje się obecnie komputerowe modele dozowania tych leków, przydatne szczególnie dla pacjentów z zaburzeniami funkcji nerek [211-213].

## VI. Uwagi koñcowe

Mimo znacznej nefrotoksycznoœci antybiotyki aminoglikozydowe sã bardzo czêsto stosowane we wspólczesnej terapii. Ich uboeczne działanie, chociaź nie w pełni poznane, jest niewãtpliwie bardzo złozone. Antybiotyki te powodujã liczne strukturalne i metaboliczne zaburzenia w komórkach kanalików proksymalnych nerki, o róznym znaczeniu dla prawidlowego funkcjonowania tych komórek. Zaburzenia te, pozornie drobne, nakladajã się na siebie powodujãc w efekcie niewydolnoœć nerek, ograniczajãc czêsto kliniczne stosowanie antybiotyków aminoglikozydowych. Nasilenie efektów uboecznych zależy z jednej strony od rodzaju leku, z drugiej zaś od stanu zdrowia pacjenta. W nerce czlowieka mechanizmy toksycznego działania wydajã się byc wspólne dla wszystkich badanych antybiotyków aminoglikozydowych, choç ryzyko upoœledzenia funkcji nerek jest proporcjonalne do stêżenia leków w korze nerki. Badania kinetyczne przy użyciu nerki szczurów wykazaly nieliniowã nagromadzenie gentamycyny i netylmycyny, natomiast liniowã zaleźnoœć w przypadku tobramycyny oraz kinetykê mieszanã, to jest wysycenie w niskich stêżeniach oraz liniowã zaleźnoœć przy wysokiej zawartoœci amikacyny w osoczu [214]. Przy stosunkowo niskim poziomie antybiotyków w osoczu ich nagromadzenie w korze nerki jest wiêc mniejsze w przypadku amikacyny czy tobramycyny, niź w przypadku gentamycyny i netylmycyny. Równieź zmiany strukturalne w lizosomach wywołane działaniem antybiotyków aminoglikozydowych sã najmniej wyraźne podczas stosowania amikacyny [214].

Mimo wielu szczególowych badañ, mechanizm funkcjonalnych i biochemicznych przemian wywołanych działaniem antybiotyków aminoglikozydowych nie jest dotychczas w pełni poznany. Wyjaœnienie tych mechanizmów moze ułatwiç przeciwdziałanie szkodliwym skutkom antybiotykoterapii oraz umożliwiç otrzymanie nowych, bezpiecznych leków.

★ ★ ★

Serdecznie dziękuję Pani Profesor Jadwidze Bryle za pomoc i krytyczne uwagi podczas przygotowywania niniejszego tekstu.

Część wyników zawartych w artykule pochodzi z badañ Zakładu Regulacji Metabolizmu, Instytutu Biochemii UW wykonanych w ramach problemu CPBP 04. 01.

*Artykuł otrzymano 11 maja 1989 r.  
Zaakceptowano do druku 5 grudnia 1989 r.*

## Piœmiennictwo

1. Dworzak D. L., (1984) w *The Aminoglycoside Antibiotics: a Guide to Therapy*, (red. Barnes W.G., Hodges G.R.), str. 23-44; CRC Press, Florida.
2. Lietman P. S., (1985) w *Principles and Practice of Infectious Diseases*, (red. Mandell G.L., Douglas R.G., Bennet J.E.), str. 192-206; Wiley, New York.
3. Smith C. R., Baughman K. L., Edwards C. Q., Rogers J. F., Lietman P. S., (1977), *N. Engl. J. Med.*, **294**, 349-353.
4. Fee W. F., Vierra V., Lathrop G. R., (1978), *J. Antimicrob. Chemother.*, **4**, 31-36.
5. Panwalker A. P., Malow J. B., Zimelis V. M., Jackson G., (1978), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **13**, 170-176.
6. Schentag J. J., Plaut M. E., Cerra F. B., Wels F. B., Walczak P., Buckley R. J., (1979), *J. Surg. Res.*, **26**, 270-279.
7. Nordstrom L., Banck G., Belfrage S., Juhlin I., Tjerstrom O., Toremalin N. G., (1973), *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* (supl. 241), **81**, 58-61.
8. Tjerstrom O., Banck G., Belfrage S., Juhlin I., Nordstrom L., Toremalin N. G., (1973), *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* (supl. 241), **81**, 73-78.
9. Gary N. E., Buzzeo L., Salahi J., Eisinger R. P., (1976), *Arch. Intern. Med.*, **136**, 1101-1104.
10. Anderson R. J., Linas S. L., Berns A. S., Henrich W. L., Miller T. R., Gabow P. A., Schrier R. W., (1976), *N. Engl. J. Med.*, **296**, 1134-1138.
11. Schentag J. J., Sutfin T. A., Plaut M. E., Jusko W. J., (1978), *J. Med.*, **9**, 201-210.
12. Schentag J. J., Plaut M. E., (1980), *Kidney Int.*, **17**, 654-661.
13. Nicot G., Merle L., Valette J.-P., Charmes J.-P., Lachet G., (1982), *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **23**, 161-166.
14. Scherberich J. E., Faldenberg F. W., Mondorf A. W., Muller H., Pflleiderer G., (1974), *Clin. Chim. Acta.*, **55**, 179-197.
15. Mondorf A. W., Beier J., Hendus J., Scherberich J. E., Mackenrodt G., Shah P. M., Stille W., Schöppe W., (1978), *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **13**, 133-142.
16. Kosek J. D., Mazze R. L., Cousins M. J., (1974), *Lab. Invest.*, **30**, 48-57.
17. Houghton D. C., Hartnett M., Campbell-Biswell M., Porter G., Bennett W., (1976), *Amer. J. Pathol.*, **82**, 589-612.
18. Carlier M. B., Paulus G., Maldague P., Giurgea L., Wilmotte E., De Broe M. E., Tulkens P., (1982), *Arch. Toxicol.*, **5**, 287-290.

19. De Broe M. E., Paulus G. J., Verpooten G. A., Roels F., Buyskens N., Wedeen R., Van Hoof F., Tulkens P. M., (1984), *Kidney Int.*, **25**, 642–652.
20. Kluwe W. M., Hook J. B., (1978), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **45**, 163–175.
21. Parker R. A., Bennett W. M., Porter G. A., (1982) w *The Aminoglycosides: Microbiology, Clinical Use, and Toxicology*, (red. Whelton A., Neu H.C.), str. 235–267; Marcel Dekker, New York.
22. Tolkoff-Rubin N. E., Haddad E. P., McCluskey R. T., Bhan A. K., Rubin R. H., (1984) w *Acute Renal Failure: Correlations Between Morphology and Function*, (red. Solez K., Whelton A.), str. 249–259; Marcel Dekker, New York.
23. Falco F. G., Smith H. M., Arcieri G. M., (1969), *J. Infect. Dis.* **119**, 406–409.
24. Laurent G., Tulkens P. M., (1987), *ISI Atlas Sci. Pharmacol.* **1**, 40–44.
25. Schatz A., Bougie E., Waksman S. A., (1944), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**, 66–69.
26. Waksman S. A., Lechevalier H. A., (1949), *Science*, **109**, 305.
27. Umezawa H., Ueda M., Maeda K., Yagashita K., Kondo S., Okami Y., Utahara R., Osato Y., Nitta K., Takeuchi T., (1957), *J. Antibiotics (Tokyo)*, **10A**, 181.
28. Weinstein M. J., Luedemann G. M., Oden E. M., Wagman G. H., (1963), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1**–7.
29. Weinstein M. J., Marquez J. A., Testa R. T., Wagman G. H., Oden E. M., Waitz J. A., (1970), *J. Antibiot.*, **23**, 551.
30. Umezawa H., (1974) w *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, (red. Tipson R.S., Norton D.), vol. 30, str. 111–182; Academic Press, New York.
31. Benitz A. M., (1984), *J. Amer. Vet. Med. Assn.*, **185**, 1118–1123.
32. Umezawa H., (1974) w *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, (red. Tipson R.S., Norton D.), vol. 30, str. 183–225; Academic Press, New York.
33. Mitsuhashi S., Kawabe H., (1982) w *The Aminoglycosides: Microbiology, Clinical Use and Toxicology*, (red. Whelton A., Neu H.C.), str. 65–94; Marcel Dekker, New York.
34. Umezawa H., (1975) w *Drug Action and Drug Resistance in Bacteria. 2. Aminoglycoside Antibiotics*, (red. Mitsuhashi S.), str. 211–218; University of Tokyo Press, Tokyo.
35. Umezawa H., (1982) w *Handbook of Experimental Pharmacology. 62. Aminoglycoside Antibiotics*, (red. Umezawa H., Hooper I.R.), str. 267–274; Springer Verlag, Berlin.
36. Humes H. D., Weinberg J. M., Knauss T. C., (1982), *Amer. J. Kidney Dis.*, **2**, 5–29.
37. Williams P. D., Bennett D. B., Gleason C. R., Hottendorf G. H., (1987), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 570–574.
38. Weinberg J. M., Simmons C. F., Humes H. D., (1980), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **27**, 521–531.
39. Lipsky J. J., Lietman P. S., (1982), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **220**, 287–292.
40. Ramsamy L., Ling K.-Y., Josepovitz C., Levine R., Kaloyanides G. J., (1985), *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3895–3900.
41. Josepovitz C., Levine R., Farruggella T., Kaloyanides G. J., (1986), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **182**, 1–5.
42. Michalik M., Głazewski S., Bryla J., (1989), *Pharmacol. Res.*, **21**, 405–414.
43. Whelton A., (1984), *Clin. Orthopaedic Related Res.*, **190**, 66–74.
44. Appel G. B., Neu H. D., (1977), *N. Engl. J. Med.*, **296**, 722–728.
45. Rosenthal S. M., Fisher E. R., Stohlman E. P., (1952), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **80**, 432–434.
46. Tabor C. W., Rosenthal S. M., (1956), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **116**, 139–155.
47. Tabor H., Tabor C. W., (1964), *Pharmacol. Rev.*, **16**, 245–300.
48. Soberon L., Bowman R. L., Pastoriza-Munoz E., Kaloyanides G. J., (1979), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **210**, 334–343.
49. Kaloyanides G. J., Pastoriza-Munoz E., (1980), *Kidney Int.*, **18**, 571–582.
50. Pastoriza-Munoz E., Bowman R. L., Kaloyanides G. J., (1979), *Kidney Int.*, **16**, 440–450.
51. Frommer J. P., Senekjian H. O., Babino H., Weinman E. J., (1983), *Miner. Elektrolyte Metab.*, **9**, 108–112.
52. Just M., Erdmann G., Heberman E., (1977), *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **300**, 57–66.
53. Kuhar M. J., Mak L. L., Lioetman P. S., (1979), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 131–133.
54. Silverblatt F. J., Kuehn C., (1979), *Kidney Int.*, **15**, 335–345.
55. Vandervalle A., Farman N., Morin J. P., Fillastre J. P., Hatt P. Y., Bonvalet J. P., (1981), *Kidney Int.*, **19**, 529–539.
56. Wedeen R. P., Batuman V., Cheeks C., Marquet E., Sobel H., (1983), *Lab. Invest.*, **48**, 212–223.
57. Giuliano R. A., Verpooten G. A., Verbist L., Wedeen R. P., De Broe M. E., (1986), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 470–475.
58. Schentag J. J., Jusko W. J., Vance J. W., Cumbo T. J., Abrutyn E., De Lattre M., Gerbracht L. M., (1977), *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**, 559–557.
59. Plamp C., Bennett W., Gilbert D., Porter G., (1978), *Clin. Res.*, **26**, 125 A.
60. Bennett W. M., Plamp C. E., Parker R. A., Gilbert D. N., Houghton D. C., Porter G. A., (1979), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**, 231–233.
61. Neu H. C., (1982) w *The Aminoglycosides: Microbiology, Clinical Use and Toxicology*, (red. Whelton A., Neu H.C.), str. 125–142; Marcel Dekker, New York.
62. Schentag J. J., (1982) w *The Aminoglycosides: Microbiology, Clinical Use and Toxicology*, (red. Whelton A., Neu H.C.), Marcel Dekker, New York.
63. Ragamey C., Gordon R. C., Kirby W. M. M., (1973), *Clin. Pharmacol. Ther.*, **14**, 396–403.
64. Adelman M., Evans E., Schentag J. J., (1982), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**, 800–804.
65. Collier V., Lietman P. S., Mitch W. E., (1979), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **210**, 247–251.
66. Just M., Habermann E., (1977), *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **300**, 67–76.
67. Schacht L., Weiner N. D., Lodhi S., (1978) w *Cyclitols and Phosphoinositides*, (red. Wells, Eisenberg), str. 153–165; Academic Press, New York.
68. Sastrasinh M., Knauss T. C., Weinberg J. M., Humes H. D., (1982), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **222**, 350–358.
69. Josepovitz C., Levine R., Farruggella T., Lane B., Kaloyanides G. J., (1983), *Kidney Int.*, **23**, 205.
70. Kaloyanides G. J., McLaughlin S. G. A., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 876–879.
71. Whelton A., (1978) w *Nephrotoxicity*, (red. Fillastre J.-P.), str. 95–126; Masson Publ., New York.
72. Whelton A., (1982) w *The Aminoglycosides: Microbiology, Clinical Use and Toxicology*, (red. Whelton A., Neu H.C.), str. 191–222; Marcel Dekker, New York.
73. Pattyn V. A., Verpooten G. A., Giuliano R. A., Zheng F., De Broe M. E., (1988), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 694–698.
74. Ishikawa Y., Inui K.-I., Hori R., (1985), *J. Pharmacobio-Dynam.*, **8**, 931–941.
75. Hsu C. H., Kurtz T. W., Weller J. M., (1977), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12**, 192–194.
76. Kluwe W. M., Hook J. B., (1978), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **45**, 531–539.
77. Kuo C. H., Hook J. B., (1979), *Life Sci.*, **25**, 873–878.
78. Bennett W. M., Plamp E. E., Eliot W. C., Parker R. A., Porter G. A., (1982), *J. Lab. Clin. Med.*, **99**, 156–162.
79. Herskowitz M., Rock M., Blum M., Katz S., Aviram A., (1983), *IRCS Med. Sci.*, **11**, 204–205.
80. Barza M., Murray T., Hamburger R. J., (1980), *J. Infect. Dis.*, **141**, 510–517.
81. Josepovitz C., Pastoriza-Munoz E., Timmerman D., Scott M., Feldman S., Kaloyanides G. J., (1982), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **223**, 314–321.

82. Chahwala S. B., Harpur E. S., (1986), *J. Pharmacol. Methods*, **15**, 21–34.
83. Saito H., Inui K.-I., Hori R., (1986), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 1071–1076.
84. Kaloyanides G. J., (1984), *Fund. Appl. Toxicol.*, **4**, 930–943.
85. Lipsky J. J., Cheng L., Sacktor B., Lietman P. S., (1980), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **215**, 390–393.
86. Auslander D. E., Felmeister A., Sciarrone B. J., (1975), *J. Pharmacol. Sci.*, **64**, 516–519.
87. Savin V., Karniski L., Cuppage F., Hodges G., Chonko A., (1985), *Lab. Invest.*, **52**, 93–102.
88. Baylis C., Rennke H. R., Brenner B. M., (1977), *Kidney Int.*, **12**, 344–353.
89. Avasthi P. S., Evan A. P., Huster J. W., Luft F. C., (1981), *J. Lab. Clin. Med.*, **98**, 444.
90. Luft F. C., Aronoff G. R., Evan A. P., Connors B. A., (1981), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.*, **34**, 89–95.
91. Feldman S., Wang M.-Y., Kaloyanides G. J., (1982), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **220**, 514–520.
92. Laurent G., Carlier M. B., Rollman B., Van Hoof P., Tulkens P., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3861–3870.
93. Knauss T. C., Weinberg J. M., Humes H. D., (1983), *Amer. J. Physiol.*, **244**, F535–F546.
94. Giuliano R. A., Paulus G. J., Verpooten G. A., Pattyn V. M., Pollet D. E., Nouwen E. J., Laurent G., Carlier M. B., Maldague P., Tulkens P. M., De Broe M. E., (1984), *Kidney Int.*, **26**, 838–847.
95. Kacew S., (1985), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 239–243.
96. Kacew S., (1987), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **91**, 469–476.
97. Weinberg J. M., Harding P. G., Humes H. D., (1983), *Exp. Molec. Pathol.*, **39**, 43–60.
98. Simmons C. F., Bogusky R. T., Humes H. D., (1980), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 709–715.
99. Ramsammy L. S., Josepovitz C., Ling K.-Y., Lane B. P., Kaloyanides G. J., (1986), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 83–88.
100. Ramsammy L. S., Josepovitz C., Ling K.-Y., Lane B. P., Kaloyanides G. J., (1987), *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 2125–2132.
101. Matsuda O., Beck F.-X., Dörge A., Thura K., (1988), *Kidney Int.*, **33**, 1107–1112.
102. Michalik M., Bryła J., (1987), *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **38**, 36–43.
103. Michalik M., Bryła J., (1987) w *Molecular Nephrology: Biochemical Aspects of Kidney Function*, (red. Kovacević Z., Guder W.G.), str. 293–298; Walter de Gruyter, Berlin.
104. Cohen L., Lapkin R., Kaloyanides G. J., (1975), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **193**, 264–273.
105. Bowman R. L., Silverblatt F. J., Kaloyanides G. J., (1977), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12**, 474–478.
106. Lapkin R., Bowman R., Kaloyanides G. J., (1977), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **201**, 233–242.
107. Bennett W. M., Plump C. E., Gilbert D. N., Porter G. A., (1978) w *Nephrotoxicity*, (red. Fillastre J.P.), str. 143–156; Masson Publ., New York.
108. Luft F. C., Bloch R., Bloan R. S., Yum M. N., Costello R., Maxwell D. R., (1978), *J. Infect. Dis.*, **138**, 541–545.
109. Bennett W. M., Plump C. E., Parker R. A., (1980), *J. Lab. Clin. Med.*, **95**, 32–39.
110. Inui K.-I., Saito H., Iwata T., Hori R., (1988), *Amer. J. Physiol.*, **254**, C251–C257.
111. Weinberg J. M., Humes H. D., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 221–231.
112. Mela-Riker L. M., Widener L. L., Houghton D. C., Bennett W. M., (1986), *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 979–984.
113. Morin J. P., Viotte G., Vandewalle A., Van Hoof F., Tulkens P., Fillastre J. P., (1980), *Kidney Int.*, **18**, 583–590.
114. Williams P. D., Trimble M. E., Crespo L., Holohan P. D., Freedman J. C., Ross C. R., (1984), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **231**, 248–253.
115. Lipsky J. J., Lietman P. S., (1980), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 532–535.
116. Chahwala S. B., Harpur E. S., (1982), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **35**, 63–78.
117. Cronin R. E., Nix K., Ferguson E. R., Southern P. M., Henrich W. L., (1982), *Amer. J. Physiol.*, **242**, F477–F483.
118. Aramaki Y., Takahashi M., Inaba A., Ishii Y., Tsuchiya S., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **862**, 111–118.
119. Queener S. F., Luft F. C., Hamel F. G., (1983), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **24**, 815–818.
120. Henley C. M., Mahran L. G., Schacht J., (1988), *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 1679–1682.
121. Schwertz D. W., Kreisberg J. I., Venkatachalam M. A., (1984), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **231**, 46–55.
122. Brill D., Kaloyanides G. J., (1982), *Clin. Res.*, **30**, 538A.
123. Hostetler K. Y., Hall L. B., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1663–1667.
124. Mingeot-Leclercq M.-P., Laurent G., Tulkens P. M., (1988), *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 591–599.
125. Hagiwara N., Inagahi M., Kanamura K., Ohta H., Hidaka H., (1988), *J. Pharm. Exp. Ther.*, **244**, 355–360.
126. Marre R., Tarara N., Louton T., Sack K., (1980), *Eur. J. Pediatr.*, **133**, 25–29.
127. Kourilsky O., Solez K., Morel-Maroger L., Whelton A., Duhoux P., Sraer J.-D., (1982), *Medicine (Baltimore)*, **61**, 258–268.
128. Ghosh P., Chatterjee S., (1987), *J. Biol. Chem.*, **266**, 12550–12556.
129. Laurent G., Maldague P., Carlier M. B., Tulkens P. M., (1983), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **24**, 586–593.
130. Porter G. A., Laurent G., Maldague P., Tulkens P. M., (1984), *Toxicol. Lett.*, **23**, 205–213.
131. Toubeau G., Laurent G., Carlier M. B., Abid S., Maldague P., Heuson-Stiennon J. A., Tulkens P. M., (1986), *Lab. Invest.*, **54**, 385–393.
132. Williams P. D., Holohan P. D., Ross C. R., (1981), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **61**, 243–251.
133. Ross E. E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10751–10758.
134. Beck P. R., Thompson R. B., Chaudhuri A. K. R., (1977), *J. Clin. Pathol.*, **30**, 432–437.
135. Mondorf A. W., Hendus J., Beier J., Scherberich J. E., Schoeppe W., (1978) w *Nephrotoxicity*, (red. Fillastre J.P.), str. 167–174; Masson Publ., New York.
136. Hirsch G. H., (1973), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **186**, 593–599.
137. Bar R. J., Wilson H. E., Mazzaferrri E. L., (1975), *Ann. Intern. Med.*, **82**, 646–649.
138. Hansen M. M., Kaaber K., (1977), *Acta Med. Scand.*, **201**, 463–467.
139. Patel R., Savage A., (1979), *Nephron.*, **23**, 50–52.
140. Cronin R. E., Bulger R. E., Southern P., Henrich W. L., (1980), *J. Lab. Clin. Med.*, **95**, 463–474.
141. Mitchell C. J., Bullock S., Ross B. D., (1977), *J. Antimicrob. Chemother.*, **3**, 593–600.
142. Kimmelberg H. K., Papahadjopoulos D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1142–1148.
143. Brinker K. R., Bulger R. E., Doby D. C., Stacey T. R., Southern P. M., Henrich W. L., Cronin R. E., (1982), *J. Lab. Clin. Med.*, **98**, 292–301.
144. Pastoriza-Munoz E., Timmerman D., Kaloyanides G. J., (1983), *Clin. Res.*, **31**, 438 A.
145. Cohen R., Johnson K., Humes H. D., (1988), *Miner. Electrolyte Metab.*, **14**, 121–128.
146. Farber J. L., Chien K. R., Mittnacht S., (1981), *Amer. J. Pathol.*, **102**, 271–281.
147. Mittnacht S., Farber J. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3199–3206.
148. Farber J. L., (1982), *Lab. Invest.*, **47**, 114–123.
149. Campbell A. K., (red.), (1983) w *Intracellular Calcium: its Universal Role as Regulator*, str. 393–454; John Wiley, New York.
150. Humes H. D., (1984), *Sem. Nephrol.*, **4**, 113–116.
151. Orrenius S., Nicotera P., (1987), *Arch. Toxicol.*, Supl. **11**, 11–19.
152. Bowley M., Colling J., Burdett S. L., Brindley D. N., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 447–454.
153. Hruban Z., Siesers A., Hopkin E., (1972), *Lab. Invest.*, **27**, 62–70.

154. Josepovitz C., Farruggella T., Levine K., Lane B., Kaloyanides G. J., (1984), *Kidney Int.*, **25**, 232 A.
155. Powell J. H., Reidenberg M. M., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3447-3453.
156. Fillastre J. P., Kuhn J. M., Bendirdjian J. P., Foucher B., Le Seur J. P., Rollin P., Vaillant R., (1976) w *Advances in Nephrology*, (red. Hamburger J., Crossier J., Maxwell M. H.), vol. 6, str. 343-370, Year Book. Med. Publ., Chicago.
157. Fujita K., Murayama T., Kawamura M., Narita K., (1987), *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*, **7**, 477-480.
158. Langhendries J. P., Battisti O., Bertrand J. M., (1988), *Biol. Neonate*, **53**, 253-259.
159. Morin J. P., Fresel J., Fillastre J. P., Vaillant R., (1978) w *Nephrotoxicity*, (red. Fillastre J. P.), str. 253-263; Masson Publ., New York.
160. Berrett A. J., Heath M. F., (1977), w *Lysosomes*, (red. Dingle J. P.), str. 123-144; North Holland Publ., Amsterdam.
161. Lullmann H., Lullmann-Rauch R., Wassermann O., (1975), *Crit. Rev. Toxicol.*, **4**, 185-218.
162. Lullmann H., Lullmann-Rauch R., Wassermann O., (1978), *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1103-1108.
163. Gray J. E., Purmalis A., Purmalis B., Mathews J., (1971), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **19**, 217-233.
164. Cox J. W., Ulrich R. G., Larson P. G., Cramer C. T., (1988), *Pharmacol. Toxicol.*, **62**, 337-343.
165. Aso Y., Ohtawara Y., Suzuki K., Tajima A., Fiyta K., (1982), *Nippon Yon Gakkai Shi.*, **24**, 583-587.
166. Chance B., Sies H., Boveris A., (1979), *Physiol. Rev.*, **59**, 527.
167. Sando T., Konno K., Takai N., Sakamoto T., Higashi I., (1984), *Cell Struct. Funct.*, **9**, 125-131.
168. Combs G. F., Noguchi J. T., Scott M. L., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 2090-2095.
169. Nagaha E. O., Ogunleye J. O., Madusolumno M. A., (1984), *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**, 831-845.
170. Welsh S. O., (1979), *J. Nutr.*, **109**, 1673-1681.
171. Greco D. S., Turnwald G. H., Adams R., Gossett K. A., Kaerney M., Casey H., (1985), *Amer. J. Vet. Res.*, **46**, 2332-2335.
172. Weinberg J. M., Harding P. G., Humes H. D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 68-74.
173. Weinberg J. M., Hunt D., Humes H. D., (1985), *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 1779-1787.
174. Cuppage F. E., Setter K., Sullivan L. P., Reitzes E. J., Melnykovich A. O., (1977), *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, **24**, 121-138.
175. Bendirdjian J.-P., Foucher B., Fillastre J. P., (1978) w *Nephrotoxicity*, (red. Fillastre J. P.), str. 315-322; Masson Publ., New York.
176. Weinberg J. M., Harding P. G., Humes H. D., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 232-239.
177. Sastrasinch M., Weinberg J. M., Humes H. D., (1982), *Life Sci.*, **31**, 2309-2315.
178. Davies J., Gorini L., Davis B. D., (1965), *Molec. Pharmacol.*, **1**, 93-106.
179. Davis B. D., Weisblum B., Davies J., (1968), *Bacteriol. Rev.*, **32**, 493-528.
180. Pestka S., (1977) w *Molecular Mechanisms of Protein Synthesis*, (red. Weissbach H., Pestka S.), str. 467-553; Academic Press, New York.
181. Kuhberger R., Pipersberg W., Petzet A., Buckel P., Bock A., (1979), *Biochemistry*, **18**, 187-192.
182. Tai P.-C., Davis B. D., (1979), *Biochemistry*, **18**, 193-198.
183. Buss W. C., Piatl M. K., Kauten R., (1984), *J. Antimicrob. Chemother.*, **14**, 231-241.
184. Bennett W. M., Mela-Riker L. M., Houghton D. C., Gilbert D. N., Buss W. C., (1988), *Amer. J. Physiol.*, **255**, F265-F269.
185. Luft F. C., Rankin L. I., Sloan R. S., Yum M. N., (1978), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 284-287.
186. Gilbert D. N., Houghton D. C., Bennett W. M., Plamp C. E., Reger K., Porter G. A., (1979), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **160**, 99-103.
187. Hottendorf G. H., Gordon L. L., (1980), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 176-181.
188. Russel D. H., (1985), *Drug Metab. Rev.*, **16**, 1-31.
189. Cojocel C., Hook J. B., (1983), *Toxicology*, **28**, 347-356.
190. Bennett W. M., Hartnett M. N., Gilbert D. N., Houghton D., Porter G. A., (1976), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **151**, 736-738.
191. Aynedjian H. S., Hguyen D., Lee H. Y., Sablay L. B., Bank N., (1988), *Amer. J. Med. Sci.*, **31**, 444-452.
192. Adams H. R., Durrett L. R., (1978), *J. Clin. Invest.*, **62**, 241-247.
193. Lullman H., Vollmer B., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3769-3773.
194. Schibeci A., Schacht J., (1977), *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1769-1774.
195. Bennett W. M., Elliott W. C., Houghton D. C., Gilbert D. N., De Fehr J., McCarron D. A., (1982), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**, 518-522.
196. Quarum M. L., Houghton D. C., Gilbert D. N., McCarron D. A., Bennett W. M., (1984), *J. Lab. Clin. Med.*, **103**, 104-114.
197. Kornguth M. L., Bayer W. H., Kunin C. M., (1980), *J. Antimicrob. Chemother.*, **6**, 121-124.
198. Kallay Z., Trnovec T., Durisova M., (1983), *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2835-2837.
199. Williams P. D., Hottendorf G. H., (1985), *Res. Commun. Chem. Pathol.*, **47**, 317-320.
200. Whelton A., Stout R. L., Franklin W., Delgado F., Solez K., (1981), *Proc. Int. Soc. Nephrol.*, **8**, 200-205.
201. Bennett W. M., Parker R. A., Elliott W. C., Gilbert D. N., Houghton D. C., (1982), *J. Infect. Dis.*, **145**, 370-373.
202. Whelton A., Solez K., (1984) w *Acute Renal Failure. Correlations Between Morphology and Function*, (red. Solez K., Whelton A.), str. 221-233; Marcel Dekker, New York.
203. Chonko A., Savin V., Stewart R., Karniski L., Cuppage F., Hodges G., (1979), *Proc. Amer. Nephrol.*, **12**, 2A.
204. Roberts J., Tumer N., (1988), *Pharmacol. Ther.*, **37**, 111-149.
205. Mallie J.-P., Coulon G., Billerey C., Faucourt A., Morin J.-P., (1988), *Kidney Int.*, **33**, 36-44.
206. Bennett W. M., Plamp C. E., Gilbert D. N., Parker R. A., Porter G. A., (1979), *J. Infect. Dis.*, **140**, 576-579.
207. Frame P., Bannister T., Tan J., Phair J., (1973), *Clin. Res.*, **21**, 842.
208. Frame P. T., Watanakunakorn C., Bannister T. W. P., (1977), *J. Infect. Dis.*, **135**, 952-956.
209. Thompson W. L., Powell S., (1980), *Scand. J. Infect. Dis.*, **23** (suppl.), 91-95.
210. Giuliano R. A., Pollet D. E., Verpooten G. A., Scharpe S., Paulus G. J., De Broe M. E., (1982), *Arch. Int. Pharmacol. Ther.*, **260**, 277-279.
211. Koup J. R., Killen T., Bayer L. A., (1983), *Clin. Pharmacokinet.*, **8**, 456-462.
212. Abel S. R., Aronoff G. R., (1984), *Amer. J. Hosp. Pharmacol.*, **41**, 2397-2399.
213. Harless G. R., Nick Y. U., (1985), *Amer. J. Hosp. Pharmacol.*, **42**, 2144.
214. De Broe M. E., Giuliano R. A., Verpooten G. A., (1986), *Amer. J. Med.*, **80** (supl. 6B), 115-118.

**Eleventh Biennial Meeting  
of EACR - European Association  
for Cancer Research**  
November 3-6, 1991  
Genova - Italy  
secretariat c/o Dr. Claudio Lombardo  
IST Istituto Nazionale  
per la Ricerca sul Cancro  
Viale Benedetto XV, no. 10  
16132 Genova, Italy

# Rola fitoaleksyn w naturalnej odporności roślin

## Phytoalexins in natural plant resistance

ANNA SZAKIEL<sup>1</sup>

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Budowa chemiczna i występowanie fitoaleksyn
- III. Czynniki wywołujące syntezę fitoaleksyn
  - III-1. Oligosacharyny
  - III-2. Kwasy tłuszczowe
- IV. Biosynteza fitoaleksyn
  - IV-1. Biosynteza fitoaleksyn izoflawonoidowych
  - IV-2. Biosynteza fitoaleksyn seskwiterpenoidowych
- V. Aktywność biologiczna fitoaleksyn
  - V-1. Działanie grzybobójcze
  - V-2. Działanie bakteriobójcze
  - V-3. Wpływ na inne organizmy
  - V-4. Mechanizm działania fitoaleksyn
  - V-5. Tolerancja i detoksykacja
- VI. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Chemical structure and occurrence of phytoalexins
- III. Factors eliciting synthesis of phytoalexins
  - III-1. Oligosaccharins
  - III-2. Fatty acids
- IV. Biosynthesis of phytoalexins
  - IV-1. Biosynthesis of isoflavonoid phytoalexins
  - IV-2. Biosynthesis of sesquiterpenoid phytoalexins
- V. Biological activity of phytoalexins
  - V-1. Fungitoxity
  - V-2. Bacteriotoxicity
  - V-3. Influence on other organisms
  - V-4. Mode of action of phytoalexins
  - V-5. Tolerance and detoxication
- VI. Concluding remarks

### Wykaz stosowanych skrótów:

CHS — syntaza chalkonu, FPP — pirofosforan farnezyli, PAL — amoniakoliza fenyloalaninowa, PIIF — czynnik indukujący inhibitory proteinaz.

## I. Wprowadzenie

Odporność roślin jest skoordynowanym, wieloskładnikowym mechanizmem obronnym, obejmującym niespecyficzne reakcje bierne oraz ukierunkowane procesy o różnym stopniu specyficzności, skierowane przeciwko różnym czynnikom chorobotwórczym. Jest oczywiste, że związki chemiczne występujące natywnie w roślinach stanowią niewielką przeszkodę dla patogenów. Rozwój poglądów w tej dziedzinie był przedmiotem kilku prac przeglądowych w piśmiennictwie polskim [1, 2, 3].

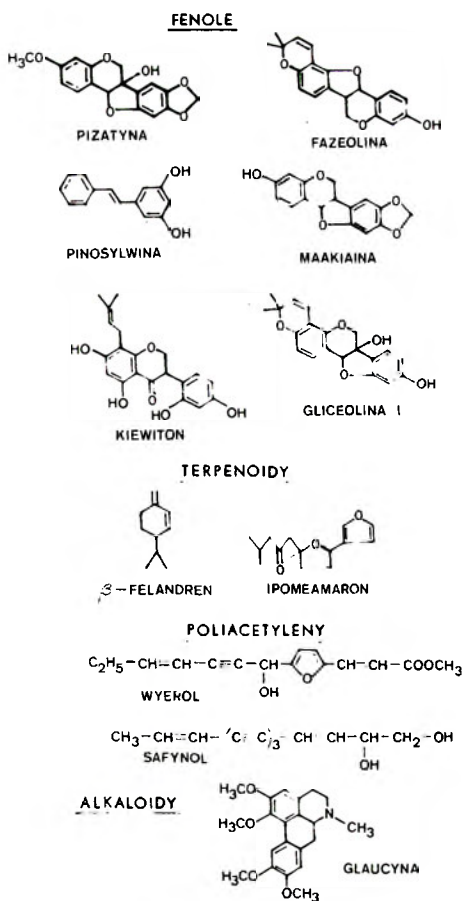
<sup>1</sup> Mgr, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

Jednym z mechanizmów odporności roślin jest ich zdolność do nagromadzenia w miejscu infekcji niskocząsteczkowych związków chemicznych o szerokim spektrum działania i znacznej toksyczności wobec patogenów. Już w 1926 r. opisano gromadzenie metabolitów wtórnych w strefie pomiędzy martwą a zdrową tkanką zranionego i zainfekowanego mikroorganizmami drzewa [4]. Obserwacja podobnych efektów doprowadziła w 1940 r. Müllera i Börgera [5] do sformułowania teorii fitoaleksynowej. Badali oni choroby pędów ziemniaka wywołane przez grzyb *Phytophthora infestans* i przedstawili hipotezę o ograniczaniu rozwoju grzyba w tkankach rośliny w wyniku nagromadzenia związków toksycznych wytwarzanych w komórkach gospodarza. Nie zdoławszy określić natury chemicznej tych związków zaproponowali dla nich nazwę — fitoaleksyny (z gr. *phyton* — roślina, *alexin* — ochraniać). Obecnie mianem fitoaleksyny określamy niskocząsteczkowe, lipofilne związki chemiczne o różnej strukturze, będące produktami metabolizmu wtórnego roślin, syntezowane *de novo* w odpowiedzi na atak mikroorganizmów i gromadzone w miejscu infekcji w stężeniach hamujących rozwój patogena.

## II. Budowa chemiczna i występowanie fitoaleksyn

Pierwsze fitoaleksyny zidentyfikowano pod względem budowy chemicznej w końcu lat 50-tych [6]. Są to izoflawonoidy: pizatyna z grochu *Pisum sativum* i fazeolina z fasoli *Phaseolus vulgaris* (Ryc. 1). Dotychczas wykazano występowanie fitoaleksyn w roślinach z ponad 20 rodzin systematycznych, obejmujących nagoli i okrytozalążkowe, jedno- i dwuliścienne [7, 8, 9]; nie wykazano natomiast ich występowania u roślin niższych.

Ustalono budowę chemiczną ponad 200 fitoaleksyn, przy czym więcej niż połowa z nich występuje w roślinach z jednej rodziny — *Fabaceae* (motylkowate). Większość fitoaleksyn to fenole (flawonoidy, stilbeny, lignany, fenantreny, benzofurany, fenylopropanoidy) lub terpenoidy (mono-, seskwi-, di- i triterpeny). Mniej liczne to poliacetyleny — pochodne kwasów tłuszczowych oraz alkaloidy (Ryc. 1).



Ryc. 1. Budowa chemiczna niektórych fitoaleksyn.

Często u roślin zaliczanych do jednej rodziny systematycznej przeważają fitoaleksyny jednego typu. I tak rośliny z rodziny *Fabaceae* syntezują głównie izoflawonoidy, rośliny z *Solanaceae* (psiankowate) — głównie karbocykloeskwyterpeny, *Compositae* (złożone) — poliacetyleny a *Convolvulaceae* (powojowate) — furanoseskwyterpenoidy. Rośliny z rodziny *Fabaceae* nie wytwarzają w ogóle fitoaleksyn terpenoidowych, zaś przedstawiciele rodziny *Solanaceae* nie syntezują fitoaleksyn flawonoidowych [10, 11].

### III. Czynniki wywołujące syntezę fitoaleksyn

Synteza fitoaleksyn w roślinach mogą wywoływać nie tylko organizmy infekcyjne, ale także liczne czynniki zewnętrzne i warunki środowiskowe. Zaobserwowano na przykład, że groch *Pisum sativum* rozpoczyna syntezę pizatyny nie tylko w odpowiedzi na infekcję grzybem *Monilinia fructicola*, ale także pod wpływem działania chlorków miedzi i rtęci. Czynniki wywołujące syntezę fitoaleksyn klasyfikuje się jako biotyczne i abiotyczne [12]. Jako czynniki abiotyczne działają m.in. sole metali ciężkich, niektóre inhibitory jak cyjanki i fluorki; detergenty, niektóre fungicydy oraz czynniki fizyczne — promieniowanie UV, uszkodzenia mechaniczne, zamrożenie [13, 14, 15, 16]. Nie wszystkie rośliny odpowiadają na te czynniki jednakowo efektywnie. Stosunkowo podatne na stymulację abiotyczną są rośliny z rodziny *Fabaceae*; w przeciwieństwie do *Solanaceae*, w których jak się wydaje,

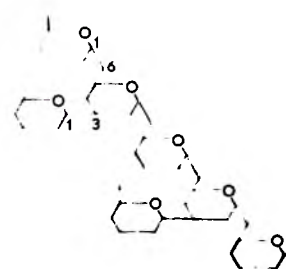
rozpoczęcie syntezy fitoaleksyn jest pod ściślejszą kontrolą metaboliczną [11].

Mechanizm działania czynników wywołujących syntezę fitoaleksyn był przedmiotem wielu badań. Wstępne prace nad działaniem czynników biotycznych wskazywały, że bezpośrednimi aktywatorami syntezy fitoaleksyn są składniki ścian komórkowych — glukozy, glikoproteidy, lipoproteidy, kwasy tłuszczowe [17].

#### III-1. Oligosacharyny

W reakcjach odporności roślin czynnikiem wywołującym syntezę fitoaleksyn są wg. Darville i Albersheim [18-22] fragmenty ścian komórkowych złożone z kilku cząsteczek cukrów, nazwane przez autorów oligosacharydami. Uważają oni, że oligosacharydy mogą funkcjonować jako cząsteczki regulatorowe i kontrolować rozmaite procesy, takie jak reakcje odpornościowe, morfogenezę czy reprodukcję.

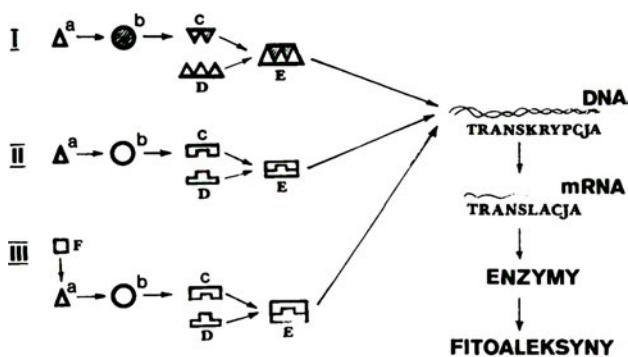
Pierwszą oligosacharydą odpowiedzialną za wywołanie syntezy fitoaleksyn u soi *Glycine max* infekowanej grzybem *Phytophthora megasperma* wyodrębniono ze ściany komórkowej grzyba i scharakteryzowano jako hepta-β-glukozyd. Takich fragmentów ściany komórkowej grzyba jest ponad 300. Badania wykazały, że fragment aktywny jako oligosacharyd różni się od innych, nieaktywnych heptaglukozydów pozycją dwóch bocznych cząsteczek glukozy, związanych pięciodziałeczkowym łańcuchem (Ryc. 2). Enzymy uwalniające tę oligosacharydę ze ściany komórkowej grzyba pochodzą z komórek rośliny — gospodarza.



Ryc. 2. Schemat budowy pierwszej wyodrębnionej oligosacharydy.

W przypadku infekcji bakteryjnych oligosacharydy nie pochodzą ze ściany komórkowej patogena. Stwierdzono, że czynnikiem wywołującym syntezę gliceoliny w komórkach liści soi zainfekowanej bakteriami *Erwina carotovora* jest fragment pektynowego polisacharydu roślinnej ściany komórkowej, uwalniany przez enzym pochodzący z patogena. Ta oligosacharyd została zidentyfikowana jako dodeka — α (1→4) — D — galakturonid [22].

Odkryto ponadto, że uszkodzone komórki rośliny same wydzielają enzym odszczepiający odpowiednie fragmenty polisacharydów ze ścian komórkowych sąsiednich komórek. Zjawisko to umożliwia syntezę fitoaleksyn w odpowiedzi na zarażenie wirusowe, a także na działanie czynników abiotycznych.



Ryc. 3. Mechanizmy uwalniania oligosacharyn ze ściany komórkowej.

- I. W niektórych infekcjach grzybowych enzym z zainfekowanej rośliny (a) odszczepia z grzybowej ściany komórkowej (b) fragment heptaglukanowy (c).
- II. Enzym bakteryjny lub grzybowy (a) uwalnia oligosacharynę (c) ze ściany komórkowej zainfekowanej rośliny (b).
- III. W przypadku infekcji wirusowej lub działania czynnika abiotycznego (F) uszkodzona roślina sama uwalnia enzym (a) odszczepiający oligosacharynę (c) z jej własnej ściany komórkowej (b).

We wszystkich trzech przypadkach oligosacharyna prawdopodobnie łączy się z receptorem w roślinie (D) i tworzy aktywną cząstkę sygnałową (E), oddziałującą na transkrypcję odpowiednich genów.

Wszystkie trzy wskazane mechanizmy uwalniania oligosacharyn ze ścian komórkowych patogena lub gospodarza zostały przedstawione na (Ryc.3). Mechanizmy (I) i (II) mogą współdziałać w jednej interakcji gospodarz - patogen, dając efekt synergistyczny [22].

Receptor oligosacharyn znajduje się w błonie cytoplazmatycznej komórki roślinnej i jest białkiem prostym lub glikoproteiną. Wykazano że błonowe preparaty z soji specyficznie wiążą mykolaminaran — rozgałęziony  $\beta$  (1→3) — glukan, pochodzący ze ściany komórkowej *Phytophthora megasperma* [23]. Stwierdzono, że komórki soji zawierają  $\beta$  (1→3) — endoglukanazę, która degraduje mykolaminaran i znosi jego aktywność jako czynnika wywołującego syntezę fitoaleksyn. Mykolaminaran związany z receptorem błonowym nie jest podatny na trawienie glukanazą.

Obserwowaną u roślin wielu gatunków odpowiedzią obronną jest tzw. reakcja nadwrażliwości, czyli szybkie obumieranie komórek roślinnych w miejscu infekcji patogenem. Zjawisko to zapobiega rozprzestrzenianiu się infekcji w czasie potrzebnym roślinie do uruchomienia innych mechanizmów obronnych (np. syntezę fitoaleksyn). Okazało się że reakcję nadwrażliwości również wywołują oligosacharyny [21].

W odpowiedzi na uszkodzenie komórek wywołane np. przez żerujące owady, rośliny syntezują inhibitory proteinaz. Sygnałem do wytwarzania tych inhibitorów są oligosacharyny zwane PIIF (*protein-inhibitor inducing factors*). Wykazano, że komórki pomidora *Lycopersicon esculentum* rozpoczynają syntezę i gromadzenie inhibitorów proteinaz w odpowiedzi na PIIF uwolniony z polisacharydów ściany komórkowej w wyniku działania endo- $\alpha$  (1→4) — galakturonaz

[24]. PIIF jest oligogalakturonidem podobnie jak pochodzące z roślinnych ścian komórkowych oligosacharyny wywołujące syntezę fitoaleksyn.

Oligosacharyny występują zatem w wielu reakcjach odpornościowych roślin. Jednakże nie wiadomo, czy mechanizm wywoływania syntezę fitoaleksyny przez oligosacharyny przebiega w identyczny sposób u roślin wszystkich gatunków.

### III-2. Kwasy tłuszczowe

Kuć i współautorzy [25-27] wykazali, że w chorobach ziemniaka *Solanum tuberosum* wywołanych przez patogen *Phytophthora infestans* (porównaj wprowadzenie) syntezę fitoaleksyn wywołują kwasy tłuszczowe pochodzenia grzybowego. Właściwość taką mają kwasy : arachidonowy — 5, 8, 11, 14 — cis-eikozapentaenowy i eikozapentaenowy — 5, 8, 11, 14, 17 — cis-eikozapentaenowy, zarówno w formie wolnej jak i niektórych estrów. Równie aktywne jak wolny kwas arachidonowy są : 1, 2 - diarachidonylo-sn-3-fosfatydylocholina, 1-arachidonylo-2-lizofosfatydylocholina i monoarachidonylglicerol, mniej aktywny jest 1, 2- i 1, 3- diarachidonylglicerol, a nie aktywny jest triarachidonylglicerol [28].

Liście ziemniaka porażone komórkami szczepu „niekompatybilnego” *Phytophthora infestans* odpowiadają na infekcję reakcją nadwrażliwości i nagromadzeniem fitoaleksyn seskwiterpenoidowych [27, 29-32] (Ryc. 5). Już po 8 godzinach od momentu infekcji fitoaleksyny nagromadzone są w stężeniu wystarczającym do efektywnego ograniczenia dalszego rozwoju grzyba. Natomiast odpowiedź na infekcję komórkami szczepu „kompatybilnego” jest powolna i trwa 3-4 dni, a stężenie fitoaleksyn jest niewystarczające do obrony przed patogenem [33]. W następstwie komórki szczepu kompatybilnego *Phytophthora infestans* rozwijają się w tkankach rośliny do rozpoczęcia sporulacji nie wywołując reakcji nadwrażliwości ani innych mechanizmów obronnych. Jest sprawą interesującą, że komórki szczepu kompatybilnego i niekompatybilnego nie różnią się ilościowo zawartością odpowiedzialnych za wywołanie syntezę fitoaleksyn kwasów arachidonowego i eikozapentaenowego. Wykazano ponadto, że uprzednia infekcja patogenem kompatybilnym hamuje syntezę fitoaleksyn w odpowiedzi na inwazję patogenu niekompatybilnego. To sugeruje, że komórki szczepu kompatybilnego w jakiś sposób blokują rozpoznanie patogena i reakcje odpornościowe w roślinie.

Ten szczepowo-specyficzny supresor reakcji odpornościowych zidentyfikowano jako oligosacharynę zbudowaną z 17-23 cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$  (1→3) i (1→6) [34-38]. Funkcja oligosacharyn w reakcjach odpornościowych ziemniaka wydaje się jeszcze bardziej złożona, gdyż wykazano także, iż niektóre z nich stymulują działanie kwasów arachidonowego i eikozapentaenowego. Po wyizolowaniu kwasy te wykazują, jako czynniki wywołujące syntezę fitoaleksyn seskwiterpenoidowych, zaledwie



21% aktywności nieoczyszczonego homogenatu mycelium *Phytophthora infestans* [26, 39]. Aktywność wywołania syntezy fitoaleksyn można przywrócić, dodając do oczyszczonych kwasów homogenatu pozbawionego lipidów przez ekstrakcję chloroformem. Zawarte w takim homogenacie czynniki wspomagające aktywność zidentyfikowano także jako oligosacharyny [37, 40]. Na razie trudno jest wytłumaczyć ową naturę oligosacharyn w chorobach ziemniaka wywołanych przez *Phytophthora infestans*.

#### IV. Biosynteza fitoaleksyn

Pierwotnie rozważano możliwość tworzenia fitoaleksyn (szczególnie izoflawonoidowych) w wyniku hydrolizy odpowiednich glikozydów [41], jednak koncepcja ta nie znalazła potwierdzenia i wiadomo, że fitoaleksyny powstają *de novo* z odległych metabolicznych prekursorów [42, 43].

Można wyodrębnić trzy podstawowe szlaki metaboliczne syntezy większości roślinnych metabolitów wtórnych, wiodące przez charakterystyczne związki pośrednie - malonian, mewalonian i szikimian [7]. W syntezę fitoaleksyn może być zaangażowany jeden z tych szlaków, dwa albo wszystkie trzy. Synteza fitoaleksyn na więcej niż jednym szlaku metabolicznym wymaga ścisłej regulacji i koordynacji wszystkich szlaków współdziałających. Brak lub deficyt prekursora z jednego szlaku może okazać się czynnikiem ograniczają-

cym szybkość lub całkowicie blokującym syntezę fitoaleksyn.

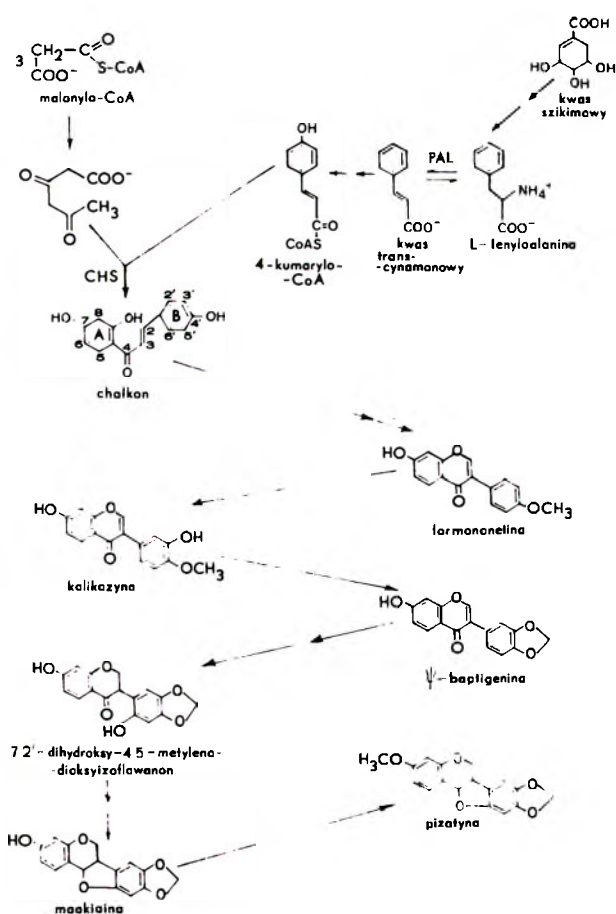
Najlepiej poznane są szlaki biosyntezy fitoaleksyn izoflawonoidowych i seskwiterpenoidowych.

#### IV-1. Biosynteza fitoaleksyn izoflawonoidowych

Podstawowa cząsteczka izoflawonoidów, difenylpropan  $C_6 - C_3 - C_6$  zawierający dwa pierścienie aromatyczne połączone układem heterocyklicznym, powstaje w toku działania dwóch z uprzednio wymienionych szlaków - przez malonian i szikimian (Ryc.4). Układ fenylopropenowy  $C_3 - C_6$ , tworzący pierścień B izoflawonoidów (patrz wzór chalkonu na Ryc. 4), wywodzi się z aminokwasów aromatycznych powstających z kwasu szikimowego; natomiast pierścień fenylowy A ( $C_6$ ) tworzy się z trzech cząsteczek malonylo-CoA na drodze poliketydowej. W wyniku kondensacji obu tych układów powstają formy otwarte — chalkony. Izoflawonoidy powstają z chalkonów przez przesunięcie pierścienia fenylowego B z pozycji 2 w pozycję 3, które odbywa się przed zamknięciem pierścienia heterocyklicznego [44, 45]. Następnie możliwe są dalsze przekształcenia, polegające na hydroksylacji [46], metylacji [47, 48] czy dołączeniu łańcucha prenylowego [49], przy czym enzymy katalizujące te końcowe przekształcenia są na razie dość słabo poznane. Izoflawonoidy różnią się więc między sobą stopniem utlenienia pierścienia heterocyklicznego oraz występowaniem w cząsteczce dodatkowych grup hydroksylowych, metoksylowych czy prenylowych.

Kluczowymi enzymami biosyntezy fitoaleksyn izoflawonoidowych są: amoniakolizaza fenyloalaninowa (PAL) i syntaza chalkonu (CHS). PAL katalizuje odszczepienie cząsteczki amoniaku z fenyloalaniny prowadzące do powstania kwasu trans-cynamonowego i jest enzymem kluczowym w kontroli biosyntezy flawonoidów i innych związków fenylopropanoidowych. CHS katalizuje powstawanie chalkonów z kwasów cynamonowych i malonylo-CoA. Jest to pierwsza reakcja w metabolizmie fenylopropanoidów charakterystyczne dla flawonoidów [50]. Stwierdzono że poziom tych enzymów podczas syntezy fitoaleksyn izoflawonoidowych w komórce roślinnej ulega charakterystycznym zmianom [51]. Infekcja patogenami wywołuje szybki i znaczny, choć krótkotrwały, wzrost syntezy tych enzymów [52-61]. W hodowanych *in vitro* komórkach fasoli zainfekowanych grzybem *Colletotrichum lindemuthianum* wzrost szybkości syntezy enzymów PAL i CHS jest zauważalny już po 20 minutach od momentu infekcji, a maximum osiąga pomiędzy 2,5 a 3 godz. [59, 62]. Podobne zjawiska obserwuje się w przypadku innych enzymów zaangażowanych w syntezę fitoaleksyn izoflawonoidowych, takich jak 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego [63] czy ligaza kumarylo-CoA [63-65]. Wykazano selektywną indukcję 15 enzymów (w tym PAL i CHS) zaangażowanych w syntezę kiewitonu i innych fitoaleksyn izoflawonoidowych u fasoli [66]. Stwierdzono, że wzrost szybkości

Ryc. 4. Szlak biosyntezy fitoaleksyn izoflawonoidowych.



syntezy enzymów odzwierciedla wzrost szybkości syntezy odpowiedniego mRNA [61, 67]. Aktynomycyna D hamuje odpowiedź fitoaleksynową u soi [68], zatem synteza mRNA *de novo* jest konieczna do ekspresji mechanizmów obronnych.

Wydaje się zatem, że sekwencja wydarzeń prowadzących do uruchomienia fitoaleksynowej odpowiedzi obronnej jest następująca:

wywołana infekcją ekspresja informacji genetycznej, dotyczącej tworzenia fitoaleksyn



transkrypcja odpowiedniego mRNA



synteza enzymów biosyntezy fitoaleksyn.

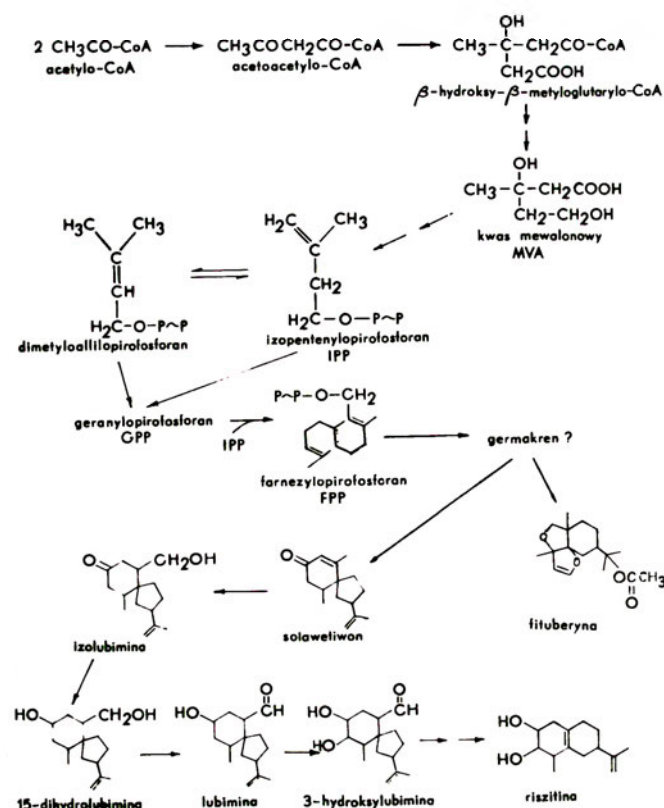
Fitoaleksynowa reakcja odpornościowa jest zatem ściśle kontrolowanym mechanizmem, a nie niespecyficznym, wtórnym efektem generalnych zaburzeń metabolizmu wywołanych infekcją.

## IV-2. Biosynteza fitoaleksyn seskwiterpenoidowych

Całkowity schemat biosyntezy fitoaleksyn seskwiterpenoidowych nie jest znany, jednakże początkowe etapy, będące częścią szlaku mewalonianowego są dobrze scharakteryzowane, a wiele przekształceń do produktów końcowych można wywnioskować logicznie.

Badając włączenie ( $^{14}$  C)-octanu i ( $^{14}$  C)-mewalonianu do fitoaleksyn seskwiterpenoidowych wykazano, że szlak biosyntezy tych związków przebiega jak szlak mewalonianowy do etapu pirofosforanu far-

Ryc. 5. Szlak biosyntezy fitoaleksyn seskwiterpenoidowych.



nezyli (FPP) [69], który jest metabolitem pośrednim także w biosyntezie innych związków, m.in. steroli i glikoalkaloidów sterydowych (Ryc.5). Stwierdzono, że niektóre czynniki abiotyczne, jak mechaniczne uszkodzenia bulwy ziemniaka powodują nagromadzenie znacznych ilości glikoalkaloidów sterydowych w miejscu uszkodzenia [70-74], jednakże nie są one syntezowane pod wpływem biotycznych czynników wywołujących syntezę fitoaleksyn (jak kwas arachidonowy i eikozapentaenowy) [74].

Fitoaleksyny seskwiterpenoidowe są tworzone przez cyklizację do form germakrenu [75], jednakże germakren A, uważany za bezpośredni produkt cyklizacji FPP, nie został wyizolowany z ziemniaka. W roślinach *Datura stramonium*, zainfekowanych przez *Monilinia fructicola* wykazano natomiast, że fitoaleksyny seskwiterpenoidowe lubimina i hydroksylubimina są syntezowane z 2,3-dihydroksygermakrenu A [76]. Kolejnych przesłanek dotyczących dalszych przekształceń dostarczyły badania zdrowych tkanek ziemniaka, w których stwierdzono przemiany seskwiterpenoidu solawetiwonu do izolubiminy, lubiminy, 15-dihydrolubiminy i wreszcie — riszityny [76, 77]. Zatem w taki lub podobny sposób przebiega prawdopodobnie biosynteza i w tkankach zainfekowanych, produkujących fitoaleksyny. Wykazano, że 15-dihydrolubimina nie jest koniecznym metabolitem pośrednim, zaś inne fitoaleksyny seskwiterpenoidowe: fituberol i fituberyna prawdopodobnie powstają wprost z form germakrenu.

## V. Aktywność biologiczna fitoaleksyn

### V-1. Działanie grzybobójcze

Müller i Börger w swojej teorii fitoaleksynowej określili działanie fitoaleksyn jako powodujące „...porażenie lub przedwczesną śmierć grzyba” [5]. Późniejsze obserwacje wykazały, że fitoaleksyny hamują wzrost mycelium, wydłużanie się trzonek konidialnych, kiełkowanie spor oraz przyrost suchej masy grzybni [78, 79]. Procesom tym towarzyszą różnorodne zjawiska cytologiczne, obserwowane w mikroskopie świetlnym lub elektronowym, jak gwałtowne wstrzymanie ruchów cytoplazmy, jej granulacja, dezorganizacja organelli komórkowych czy rozpad błon [80- 83]. Uszkodzenia plazmalemmy powodują niekontrolowany wpływ metabolitów z komórki i w konsekwencji ubytek suchej masy [82, 83], zaburzone może być także pobieranie składników pokarmowych takich jak glukoza [83].

Transport cząsteczek przez plazmalemmy nie jest jedynym procesem fizjologicznym grzybów zaburzonym przez fitoaleksyny. Obserwowano również hamowanie pobierania tlenu w obecności fazeoliny przez intensywnie rosnące mycelium *Rhizotonia solani* [82]. Zjawisko to może być spowodowane uniemożliwieniem dopływu substratów oddychania bądź rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej. Stwierdzono jednak

także, iż fazeolina nie hamuje oddychania izolowanych mitochondriów z grzyba *Neurospora crassa*, a więc hamowanie pobierania tlenu przez grzybnię wydaje się być efektem pośrednim działania fitoaleksyn [81].

## V-2. Działanie bakteriobójcze

Fitoaleksyny w różnym stopniu wykazują działanie bakteriostatyczne lub bakteriobójcze w odniesieniu do bakterii różnych szczepów. Stwierdzono, że dla *Rhizobium japonicum* i *Rhizobium lupini* najbardziej toksyczne są fitoaleksyny izoflawonoidowe: medikarpina i kiewiton, średnio-fazeolina i maakiaina, słabo-pizatyna i kumestrol [84,85]. Twierdzenie, że bakterie Gram-ujemne są na ogół mniej wrażliwe na antybiotyki niż Gram-dodatnie wydaje się prawdziwe także w odniesieniu do fitoaleksyn izoflawonoidowych [86,87]. I tak, kiewiton i fazeolina hamują rozwój bakterii Gram-dodatnich w stężeniach, które w ogóle nie wykazują wpływu na wzrost bakterii Gram-ujemnych. Kiewiton hamuje również rozwój trzech ludzkich patogenów Gram-dodatnich: *Gorynebacterium diptheriae*, *Streptococcus haemolyticus* i *Staphylococcus aureus*.

## V-3. Wpływ fitoaleksyn na inne organizmy

Fitoaleksyny są toksyczne nie tylko dla grzybów i bakterii, ale mogą wywoływać różne zaburzenia także u innych organizmów żywych. Skutki toksycznej aktywności fitoaleksyn widoczne są u roślin je produkujących, choć w tym przypadku mogą być traktowane jako część strategii obronnej. Stwierdzono, że pizatyna powoduje zahamowanie wzrostu kultur kallusa grochu [88], fazeolina hamuje oddychanie i wzrost komórek fasoli i grochu, prowadząc do ich obumarcia [89]. Z kolei fazeolina i kiewiton powodują wypływ beta-cyjaniny i innych związków z korzenia buraka [88]. Dezorganizacja komórek roślinnych w miejscu działania fitoaleksyn, a więc w miejscu infekcji, powodująca zniszczenie źródeł pożywienia dla patogena, może być czynnikiem ograniczającym jego kolonizację. Śmierć komórek w reakcji nadwrażliwości uniemożliwia rozwój pasożytów obligatoryjnych, wymagających do wzrostu żywych komórek gospodarza, oraz uniemożliwia replikację wirusów, wykorzystujących w tym procesie zorganizowane i funkcjonujące systemy komórki roślinnej.

Fitoaleksyny mogą wywierać wpływ także na organizmy zwierzęce. Obserwowano hamowanie pobierania tlenu przez larwy pasożytniczego nicienia *Meloidogyne incognita* w obecności izomerów gliceoliny [90,91]. Pewne uboczne skutki działania fitoaleksyn występują także u zwierząt żywiących się roślinami zawierającymi te związki. Stwierdzono, że fitoaleksyny izoflawonoidowe wywołują liżę erytrocytów, a niektóre, jak pizatyna, hamują oddychanie izolowanych mitochondriów z wątroby szczura [92]. Izoflawonoidowa fitoaleksyna - kumestrol wykazuje aktywność

estrogenową na macicę myszy, co tłumaczy okresową niepłodność lub inne zaburzenia reprodukcyjne u ssa-ków żywiących się zainfekowanymi roślinami.

## V-4. Mechanizm działania fitoaleksyn

Z dotychczasowych badań wynika, że fitoaleksyny wpływają na wiele reakcji metabolicznych i procesów fizjologicznych raczej niespecyficznie. Nie są one bowiem toksynami specyficznymi „miejscowo”, to znaczy wpływającymi na jedną szczególną reakcję lub proces, ale często po zadziałaniu fitoaleksyn obserwuje się dość zróżnicowane zmiany fizjologiczne i cyto-logiczne, co sugeruje występowanie wielu „wtórnych” efektów. Istniejące dane wskazują, że miejscem działania fitoaleksyn są błony komórkowe [93], w pierwszym rzędzie plazmalemma, jako pierwsza błona patogena wchodząca w kontakt z egzogennym związkiem toksycznym. W roślinach syntezujących fitoaleksyny ich tworzenie jest wewnątrzkomórkowe, stąd obserwowane niekiedy w komórkach roślinnych wcześniejsze oddziaływanie fitoaleksyn na tonoplast [94].

Niektórzy badacze uważają, że nie można wykluczyć miejscowo specyficznego działania fitoaleksyn w konkretnych procesach metabolicznych, szczególnie biorąc pod uwagę zjawisko hamowania oddychania, wywołane przez fitoaleksyny w całych organizmach, tkankach bądź izolowanych mitochondriach. Wykazano, że w obecności gliceoliny następuje hamowanie pobierania tlenu przez larwy *Meloidogyne incognita* oraz izolowane mitochondria soi [90]. Wydaje się, że gliceolina nie działa jako związek rozprzegający oksydacyjną fosforylację, ale raczej jako inhibitor przepływu elektronów w którymś nieokreślonym bliżej miejscu za dehydrogenazą bursztynianową. Natomiast późniejsze prace innej grupy badaczy [95] wykazały, że gliceolina specyficznie hamuje utlenianie jabłczanu, jako inhibitor działający podobnie do rotenonu.

Wobec wielu tego typu kontrowersyjnych doniesień o hamowaniu oddychania przez fitoaleksyny, jak hamowanie fosforylacji substratowej w izolowanych mitochondriach wątroby szczura przez seskwiterpenoid ipomeamaron [95], czy rozprzeganie oksydacyjnej fosforylacji przez pizatynę [92], trudno jest autorytatywnie rozstrzygnąć kwestię „miejscowej” specyficzności działania fitoaleksyn. Wydaje się że wciąż brak przekonującego dowodu na taką specyficzność [96,97], a zjawiska związane z rozprzeganiem fosforylacji czy hamowaniem transportu elektronów można tłumaczyć jako jeden z wielu efektów wtórnych oddziaływania fitoaleksyn na błony komórkowe.

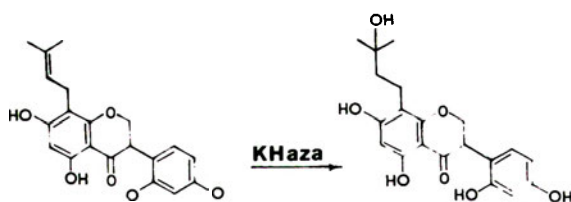
## V-5. Tolerancja i detoksykacja

Mimo dużej skuteczności obrony roślin przed czynnikami chorobotwórczymi, opartej na mechanizmach wywołujących syntezę fitoaleksyn, istnieją wszakże patogeny efektywnie przełamujące barierę tej obrony. Muszą one zatem albo unikać rozpoznania przez

roślinę, aktywnie hamując uruchomienie reakcji odpornościowej, albo też przezwyciężyć tę reakcję. Blokowanie rozpoznania przez roślinę wykazano w przypadku kompatybilnego szczepu *Phytophthora infestans*. Inne niewrażliwe patogeny mogą posiadać bariery utrudniające wnikanie fitoaleksyn lub charakteryzować się mniejszym powinowactwem do tych związków w miejscach podatnych na ich działanie. Ponadto, patogeny mogą mieć uzupełniający szlak metaboliczny, równoległy do hamowanego przez fitoaleksyny lub dysponować możliwością enzymatycznej detoksykacji fitoaleksyn przed lub po ich wniknięciu do komórki.

Stwierdzono, że patogen *Fusarium solani* ma co najmniej dwa systemy obrony przed fitoaleksynami grochu: możliwość enzymatycznej detoksykacji przez monoooksygenazy oraz uruchomienia syntezy niezidentyfikowanego, indukowalnego czynnika, który modyfikuje plazmalemę utrudniając penetrację jej przez fitoaleksyny [97-100]. Także z *Fusarium solani* wyizolowano hydratazę kiewitonu, przekształcającą kiewiton w formę nietoksyczną dla grzyba (Ryc.6). Hydrataza kiewitonu jest jednym z pierwszych wyizolowanych i scharakteryzowanych enzymów degradacji fitoaleksyn; stwierdzono, że jest to zewnątrzkomórkowa glikoproteina o masie cząsteczkowej 102000 [101-104]. Zbadano 28 dzikich szczepów *Fusarium solani* pod kątem wirulentności w stosunku do *Phaseolus vulgaris* i zdolności detoksykacji kiewitonu [105]. Komórki tylko trzech szczepów wykazywały zewnątrzkomórkową aktywność hydratazy kiewitonu i tylko te trzy patogeny były wirulentne.

Ryc. 6. Reakcja detoksykacji katalizowana przez hydratazę kiewitonu.



Rośliny mogą wytwarzać jednakże nie tylko jedną fitoaleksynę, ale mieszaninę wielu, do 25 w pojedynczej reakcji odpornościowej. Patogen przełamujący barierę obrony musi więc mieć możliwość detoksykacji mieszaniny takich związków. Wykazano, że *Fusarium solani* metabolizuje i unieczynnia mieszaninę kiewitonu i izomerów fazeoliny w różnych proporcjach [106,107].

## VI. Uwagi końcowe

W przeciwieństwie do reakcji immunologicznych u zwierząt, mechanizmy odpornościowe roślin były dotychczas dość słabo poznane. Taki stan rzeczy nie wynikał z braku zainteresowania tą dziedziną, a raczej z trudności technicznych napotykanych przy badaniach. Niedogodności doświadczeń przeprowadza-

nych przy użyciu roślin gruntowych stają się zrozumiałe, wzięwszy pod uwagę chociażby fakt ograniczenia reakcji obronnej do niewielu komórek położonych bezpośrednio w miejscu infekcji.

Fitoaleksyny, wytwarzane miejscowo, nie są w roślinie transportowane, a więc nie można ich wyodrębnić czy wyznaczyć stężenia tak łatwo jak w przypadku przeciwciał. Stosowane obecnie do badań kultury tkankowe nie zawsze mogą być wykorzystane do prac nad mechanizmami odpornościowymi. Zmieniony charakter komórek roślinnych w kulturze (utrata wyspecjalizowanych cech indywidualnych komórek rosnących w zawieszynie lub w postaci kallusa o ciągłej aktywności merystematycznej) powoduje zmiany w ich metabolizmie. Niektóre warunki potrzebne do założenia i utrzymania kultur, jak regulatory wzrostu, związki do sterylizacji, intensywne oświetlenie itp. same spełniają rolę abiotycznych czynników wywołujących syntezę fitoaleksyn.

Jednakże mimo wzmiankowanych trudności ostatnie lata przyniosły wiele interesujących prac w dziedzinie odporności roślin. Oprócz prób wyjaśnienia mechanizmów reakcji obronnych uzyskano wyniki mogące w przyszłości znaleźć zastosowanie praktyczne. Wykazano możliwość uodporniania roślin jednorocznych przeciwko chorobom grzybowym, bakteryjnym i wirusowym przez ograniczoną infekcję patogenami, awirulentnymi formami patogenów lub działanie składnikami tworzonymi w uodpornionych już roślinach [108-116]. Szczególnie łatwo udaje się „szczepić” rośliny z rodziny *Cucurbitaceae*. Kontrolowana infekcja *Colletotrichum lagenarium* może np. uodpornić ogórek na przynajmniej 12 niespokrewnionych chorób wywołanych przez rozmaite patogeny. Podobne efekty uzyskuje się i u innych roślin. Można zaszczyć pomidor przeciwko chorobie niebieskiej pleśni wywołanej przez *Peronospora tabacina* [117,118], a groch przeciwko antraknozie powodowanej przez *Colletotrichum lindemuthianum* [119,120]. Taka immunizacja nie oznacza niewrażliwości, ale indukuje u szczepionych roślin bardzo szybką odpowiedź w przypadku infekcji patogenem. Odpowiedź obronna jest wieloskładnikowa i obejmuje nie tylko syntezę fitoaleksyn. I tak np. podstawą reakcji odpornościowej u grochu jest szybkie nagromadzenie fazeoliny czy pizatyny w stężeniach toksycznych, natomiast u ogórka — szybka lignifikacja w miejscu infekcji. Synteza fitoaleksyn jest bowiem, jak zaznaczono na wstępie, jedynie częścią złożonego mechanizmu obronnego rośliny, którego poszczególne elementy zaczynają być coraz bardziej zrozumiałe.

Artykuł otrzymano 5 maja 1989 r.

Zaakceptowano do druku 3 listopada 1989 r.

Autorka pragnie serdecznie podziękować Pani dr hab. Wirginii Janiszowskiej za wiele cennych uwag podczas przygotowywania niniejszej pracy.

## Pismienictwo

1. Grzelińska A., (1973), *Postępy Biochemii*, **19**, 141-158.
2. Bujarski J. J., (1980), *Postępy Biochemii*, **26**, 477-497.
3. Skrzypczak L., Thiemb B., (1987), *Wiadomości Botaniczne*, **31**, 157-166.
4. Swarbrick T., (1926), *J. Pomol. Hortic. Sci.*, **5**, 98.
5. Müller K. O., Börger H., (1940), *Arb. Biol. Anst. Reichsanst. Berl.*, **23**, 189.
6. Cruickshank A. M., Perrin D. R., (1960), *Nature (Lond.)*, **187**, 799.
7. Kuć J., Rush J. S., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**, 455-472.
8. Smith D. A., Banks S. W., (1986), *Phytochemistry*, **25**, 979-995.
9. Kemp M. S., Burden R. S., (1986), *Phytochemistry*, **25**, 1261-1266.
10. Ingham I., (1982), w *Phytoalexins* (red. Bailey I., Mansfield J.), str. 21-80, Blackie and Sons, Glasgow, London.
11. Kuć J., (1982), w *Phytoalexins* (red. Bailey I., Mansfield J.), str. 81-105, Blackie and Sons, Glasgow, London.
12. Yoshikawa M., (1978), *Nature (Lond.)*, **275**, 546-547.
13. Keen N. T., (1975), *Science*, **187**, 74-75.
14. Bailey J. A. (1980), *Ann. Phytopathol.*, **12**, 395-402.
15. Takahashi H., Jaffe M. J., (1984), *Physiol. Plant.*, **61**, 405-407.
16. Dixon R. A., Dey P. M., Lawton M. A., Lamb C. J., (1983), *Plant Physiol.*, **71**, 251-256.
17. West C. A., (1981), *Naturwissenschaften*, **68**, 447-457.
18. Darvill A. G., Albersheim P., (1984), *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 243-275.
19. Davis K. R., Darvill A. G., Albersheim P., (1986), *Plant Mol. Biol.*, **6**, 23-32.
20. Sharp J. K., McNeil M., Albersheim P., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 11321-11336.
21. Nothnagel E. A., McNeil M., Albersheim P., Dell A., (1983), *Plant Physiol.*, **71**, 916-926.
22. Albersheim P., Darvill A. G., (1985), *Sci. Am.*, **253** (3) 58-63.
23. Yoshikawa M., Kenn N. T., Wang M. C., (1983), *Plant Physiol.*, **73**, 497-506.
24. Bishop P. D., Makus D. J., Pearce G., Ryan C. A., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3536-3540.
25. Bostock R. M., Kuć J., Laine R. A., (1981), *Science*, **212**, 67-69.
26. Bostock R. M., Laine R. A., Kuć J., (1982), *Plant Physiol.*, **70**, 1417-1424.
27. Tjamos E. C., Kuć J., (1982), *Science*, **217**, 542-544.
28. Preisig C. L., Kuć J., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**, 379-389.
29. Ishizaka N., Tomiyama K., (1972), *Plant Cell Physiol.*, **13**, 1053-1063.
30. Varns J. L., Kuć J., Williams E., (1971), *Phytopathology*, **61**, 174-177.
31. Shih M. J., Kuć J., (1973), *Phytopathology*, **63**, 821-826.
32. Varns J. L., Currier W. W., Kuć J., (1971), *Phytopathology*, **61**, 968-971.
33. Varns J. L., Kuć J., (1971), *Phytopathology*, **61**, 179-181.
34. Doke N., Garas N. A., Kuć J., (1979), *Physiol. Plant. Pathol.*, **15**, 127-140.
35. Doke N., Tomiyama K., (1980), *Physiol. Plant. Pathol.*, **16**, 177-186.
36. Doke N., Garas N. A., Kuć J., (1979), *Phytopathology*, **70**, 35-39.
37. Bostock R. M., Laine R. A., Kuć J., (1981), *Science*, **212**, 67-69.
38. Preisig C. L., Kuć J., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**, 379-389.
39. Maniara G., Laine R. A., Kuć J., (1984), *Physiol. Plant Pathol.*, **24**, 177-186.
40. Kurantz M. J., Osman S. F., (1983), *Physiol. Plant Pathol.*, **22**, 363-370.
41. Olah A. F., Sherwood R. T., (1973), *Phytopathology*, **63**, 739-744.
42. Moesta P., Grisebach H., (1980), *Nature (Lond.)*, **286**, 710-711.
43. Moesta P., Grisebach H., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 39-43.
44. Grisebach H., Brandner G., (1961), *Z. Naturforsch.*, **16b**, 2-9.
45. Patschke L., Barz W., Grisebach H., (1966), *Z. Naturforsch.*, **21b**, 45-49.
46. Hagmann M. L., Heller W., Grisebach H., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **142**, 147-150.
47. Poulton J. E., Grisebach H., Ebel J., Schaller-Hekeler B., Hahlbrock K., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 301-307.
48. Wengenmayer H., Ebel J., Grisebach H., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **50**, 135-140.
49. Leube J., Grisebach H., (1983), *Z. Naturforsch.*, **38c**, 730-736.
50. Whitehead I. M., Dey P. M., Dixon R. A., (1982), *Planta*, **154**, 156-164.
51. Loschke D. C., Hadwiger L. A., Waggoner W., (1983), *Physiol. Plant Pathol.*, **23**, 163-173.
52. Lamb C. J., Dixon R. A., (1978), *FEBS Lett.*, **94**, 277-280.
53. Dixon R. A., Lamb C. J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **586**, 453-463.
54. Lawton M. A., Dixon R. A., Lamb C. J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **633**, 162-175.
55. Loschke D. C., Hadwiger L. A., Schroder J., Hahlbrock K., (1981), *Plant Physiol.*, **68**, 680-685.
56. Hahlbrock K., Lamb C. J., Purwin C., Ebel J., Fautz E., Schafer E., (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 768-773.
57. Ragg H., Kuhn D. N., Hahlbrock K., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10061-10065.
58. Borner H., Grisebach H., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**, 65-71.
59. Lawton M. A., Dixon R. A., Hahlbrock K., Lamb C. J., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **129**, 593-601.
60. Lawton M. A., Dixon R. A., Hahlbrock K., Lamb C. J., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **130**, 131-139.
61. Ryder T. B., Cramer C. L., Bell I. N., Robbins M. P., Dixon R. A., Lamb C. J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5724-5728.
62. Rathmell W. G., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 259-263.
63. Dixon R. A., Bandall D. S., (1978), *Physiol. Plant Pathol.*, **13**, 295-299.
64. Kuhn D. H., Chappell I., Boudet A., Hahlbrock K., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1102-1106.
65. Kimpell A., Kosuge T., (1985), *Plant Physiol.*, **77**, 1-6.
66. Robbins M. P., Bolwell G. P., Dixon R. A., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **148**, 563-569.
67. Bell I. N., Dixon R. A., Bailey J. A., Rowell P. M., Lamb C. J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3384-3388.
68. Yoshikawa M., Yamouchi K., Masago H., (1978), *Plant Physiol.*, **61**, 314-319.
69. Shih M., Kuć J., (1973), *Phytopathology*, **63**, 826-829.
70. Allen E., Kuć J., (1968), *Phytopathology*, **58**, 776-780.
71. Shih M., Kuć J., (1974), *Phytochemistry*, **13**, 997-1000.
72. Ishizaki N., Tomiyama K., (1972), *Plant Cell Physiol.*, **13**, 1053-1063.
73. Tjamos E., Kuć J., (1982), *Science*, **217**, 542-544.
74. Stoessl A., Stothers J. B., Ward E. W. B., (1976), *Phytochemistry*, **15**, 855-872.
75. Kalan E. B., Osman S. F., (1976), *Phytochemistry*, **15**, 775-776.
76. Kalan E. B., Patterson J. M., Swartz D. P., (1976), *Plant Physiol.* (Supl.), **57**, 91.
77. Sato K., Ishiguri Y., Doke N., Tomiyama K., Yagihashi F., Murai A., Katsui N., Masamune T., (1978), *Phytochemistry*, **17**, 1901-1902.
78. Higgins V. J., Millar R. L., (1968), *Phytopathology*, **58**, 1377-1381.
79. Smith D. A., (1976), *Physiol. Plant Pathol.*, **9**, 45-48.
80. Grisebach H., Ebel J., (1978), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **17**, 635.
81. Skipp R. A., Bailey J. A., (1976), *Physiol. Plant Pathol.*, **9**, 253-255.
82. Van Etten H. D., Bateman D. F., (1971), *Phytopathology*, **61**, 1363-1368.
83. Higgins V. J., (1978), *Phytopathology*, **61**, 338-340.
84. Lyon F. M., Wood R. K. S., (1975), *Physiol. Plant Pathol.*, **6**, 117-119.
85. Wyman J. G., Van Etten H. D., (1978), *Phytopathology*, **68**, 583-588.

86. Gnanamanickam S.S., Mansfield J. W., (1981), *Phytochemistry*, **20**, 997-1000.
87. Gnanamanickam S.S., Smith D. A., (1980), *Phytopathology*, **70**, 894-899.
88. Bailey J. A., (1970), *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 409-412.
89. Glazener J. A., Van Etten H. D., (1978), *Phytopathology*, **68**, 111-114.
90. Kaplan D. T., Keen N. T., Thomason I. J., (1980), *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 309-319.
91. Kaplan D. T., Keen N. T., Thomason I. J., (1980), *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 319-326.
92. Oku H., Ouchi S., Shiraishi T., Utsumi K., Seno S., (1976), *Proc. J. Acad.*, **52**, 33-39.
93. Smith D. A., (1982), w *Phytoalexins* (red. Bailey J. A., Mansfield J. W.), str. 218, Blackie and Sons, Glasgow, London.
94. Hargreaves J. A., (1980), *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 351-356.
95. Boydston R., Paxton J. D., Koeppe D. E., (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 151-155.
96. Kramer R. P., Hindorf H., Jha H. C., Kallage J., Zilliken F., (1984), *Phytochemistry*, **23**, 2203-2205.
97. Johnson G., Maag D. D., Johnson D. K., Thomas R. D., (1976), *Physiol. Plant Pathol.*, **8**, 225-231.
98. Denny T. P., Van Etten H. D., (1983), *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2893-2897.
99. Matthews D. E., Van Etten H. D., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 494-499.
100. Tegtmeier K. J., Van Etten H. D., (1982), *Phytopathology*, **72**, 604-607.
101. Kuhn P. J., Smith D. A., (1979), *Physiol. Plant Pathol.*, **14**, 179-183.
102. Kuhn P. J., Smith D. A., Ewing D. F., (1977), *Phytochemistry*, **16**, 296-300.
103. Smith D. A., Wheeler H. E., Banks S. W., Cleveland T. E., (1984), *Physiol. Plant Pathol.*, **25**, 135-139.
104. Tegtmeier K. J., Van Etten H. D., (1982), *Phytopathology*, **72**, 608-612.
105. Smith D. A., Harrer J. M., Cleveland T. E., (1982), *Phytopathology*, **72**, 1319-1322.
106. Smith D. A., Harrer J. M., Cleveland T. E., (1981), *Phytopathology*, **71**, 1212-1216.
107. Zhang Y., Smith D. A., (1983), *Physiol. Plant Pathol.*, **23**, 89-93.
108. Kuć J., Shockley G., Kearney K., (1975), *Physiol. Plant Pathol.*, **7**, 195-199.
109. Kuć J., Richmond S., (1977), *Phytopathology*, **67**, 533-536.
110. Richmond S., Kuć J., Elliston J., (1979), *Physiol. Plant Pathol.*, **14**, 329-338.
111. Hammerschmidt R., Acres S., Kuć J., (1976), *Phytopathology*, **66**, 790-793.
112. Jenns A., Kuć J., (1977), *Physiol. Plant Pathol.*, **11**, 207-212.
113. Hammerschmidt R., Nucle E., Kuć J., (1982), *Physiol. Plant Pathol.*, **20**, 73-82.
114. Jenns A., Kuć J., (1979), *Phytopathology*, **69**, 753-756.
115. Hammerschmidt R., Kuć J., (1982), *Physiol. Plant Pathol.*, **20**, 61-71.
116. Jenns A., Kuć J., (1980), *Physiol. Plant Pathol.*, **17**, 81-91.
117. Tuzun S., Kuć J., (1983), *Phytopathology*, **73**, 823.
118. Tuzun S., Kuć J., (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 158-160.
119. Elliston J., Kuć J., Williams E., (1977), *Phytopathol. Z.*, **88**, 43-52.
120. Elliston J., Kuć J., Williams E., Rahe J., (1977), *Phytopathol. Z.*, **88**, 114-130.

## Biochemiczna charakterystyka izoenzymu – $\gamma\gamma$ enolazy i jego znaczenie diagnostyczne

### Isoenzyme – $\gamma\gamma$ of enolase - biochemical properties and its role in diagnosis

ELŻBIETA KULIG <sup>1</sup>

#### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Rozmieszczenie izoenzymu- $\gamma\gamma$  w tkankach
  - II-1. Rozmieszczenie izoenzymu- $\gamma\gamma$  w tkankach ptaków i ssaków
  - II-2. Zmiany zawartości podjednostki  $\gamma$  w tkankach w ontogenezie
  - II-3. Rozmieszczenie podjednostki  $\gamma$  w układzie nerwowym
- III. Biochemiczna charakterystyka izoenzymu- $\gamma\gamma$  enolazy
- IV. Budowa genu strukturalnego podjednostki  $\gamma$  enolazy i jego ekspresja
- V. Znaczenie diagnostyczne izoenzymu- $\gamma\gamma$  enolazy

#### Contents:

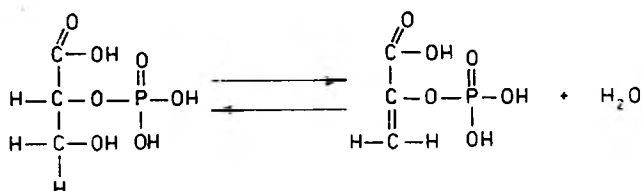
- I. Introduction
- II. Localization of isoenzyme- $\gamma\gamma$  of enolase in tissues
  - II-1. Localization of isoenzyme- $\gamma\gamma$  in tissues of birds and mammals

- II-2. Changes of  $\gamma$  subunit level during ontogenesis
- II-3. Localization of  $\gamma$  subunit in nervoustissue
- III. Biochemical properties of isoenzyme- $\gamma\gamma$  of enolase
- IV. Structure and expression of  $\gamma$  subunit gene
- V. Importanse of isoenzyme- $\gamma\gamma$  for diagnosis

#### I. Wprowadzenie

Enolaza (hydrataza 2-fosfoglicerynianowa, E.C.4.2.1.11) katalizuje jedną z reakcji glikolizy (Ryc.1). Zarówno do przeprowadzenia reakcji, jak i do utrzymania

Ryc. 1. Reakcja katalizowana przez enolazę.



<sup>1</sup> Dr, Zakład Biochemii Akademii Medycznej we Wrocławiu ul. Chalubińskiego 10, 50-368 Wrocław

natywnej struktury enzym wymaga jonów magnezu. W komórkach drożdży [1], ryb [2], płazów [3], ptaków [4] i ssaków [5] enolaza występuje w postaci dimeru. U termofilnych bakterii [6], np. *Bacillus stearothermophilus* lub *Thermus aquaticus* enolaza jest oktamerem złożonym z identycznych podjednostek.

W komórkach Eukaryota enolaza występuje w postaci kilku izoenzymów. U drożdży, *Saccharomyces cerevisiae* [1,7,8] podlegają ekspresji dwa geny strukturalne kodujące enolazę i pojawiają się dwa typy podjednostek, zwane EnoI i EnoII, o bardzo wysokiej homologii (95%) sekwencji aminokwasowej. Z organizmów tych wyizolowano trzy rodzaje dimerów, zbudowane z jednakowych lub różnych podjednostek. Wstępne dane wskazują na występowanie pięciu izoenzymów enolazy w komórkach płazów (*Xenopus laevis*). Jednak nie ustalono jeszcze definitywnie ani ich liczby, ani specyficzności tkankowej [3]. Wyznaczono sekwencję nukleotydów cDNA izoenzymu enolazy najpowszechniej występującego w organizmie *Xenopus laevis* i na tej podstawie odtworzono jego sekwencję aminokwasową. Jest ona w 88% homologiczna z sekwencją izoenzymu  $\alpha$  ptaków i ssaków [3]. W organizmach ptaków i ssaków wykryto trzy formy izoenzymatyczne [4,5]. Pojawiają się trzy typy podjednostek białkowych, które nazwano  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Dimeryczny enzym występuje w 5 formach. Najpowszechniej występujące izoenzymy są homodimerami:  $\alpha\alpha$  (potocznie zwany izoenzymem- $\alpha$ ),  $\beta\beta$  (izoenzym- $\beta$ ) oraz  $\gamma\gamma$  (izoenzym- $\gamma$ ). Obok form dimerycznych stwierdzono występowanie hybrydów — heterodimerów  $\alpha\beta$  i  $\alpha\gamma$ . Izoenzymy enolazy są nierównomiernie rozmieszczone w organizmie [9, 10, 11]. Podjednostka  $\alpha$  pojawia się we wszystkich tkankach, a dominuje np. w hepatocytach. Podjednostka  $\beta$  jest charakterystyczna głównie dla mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego [12], chociaż jej występowanie stwierdzono także w mięśniach języka oraz w grasicy, nadnerczach, tkance tłuszczowej i mięśniach pęcherza [12]. Izoenzym- $\gamma\gamma$  znajdowano początkowo tylko w komórkach nerwowych [13, 14]. Stąd pochodzi jego starsza i mniej precyzyjna nazwa — enolaza neuronowa (ang. *neuron specific enolase-NSE*). Przeciwstawiano go izoenzymowi- $\alpha\alpha$  zwanemu nieneuronową enolazą (ang. *nonneuronal enolase-NNE*). W miarę postępu badań i stosowania czulszych metod wykryto podjednostkę  $\gamma$  i izoenzym- $\gamma\gamma$  także w tkankach neuroendokrynych i szeregu innych [14] (Tab.1).

Wzajemne proporcje izoenzymów enolazy zmieniają się podczas rozwoju ontogenetycznego [4, 17]. Podjednostka  $\alpha$  jest formą dominującą w życiu płodowym i nie zanika u osobników dorosłych. Podjednostki  $\beta$  i  $\gamma$  pojawiają się w środkowym okresie życia płodowego i w niektórych tkankach u osobników dorosłych są formą dominującą.

Podobnie, zjawisku transformacji nowotworowej towarzyszy zmiana proporcji izoenzymów enolazy

**Tabela 1**

Zawartość izoenzymu- $\gamma\gamma$  enolazy w niektórych tkankach ludzkich wyznaczona metodą radioimmunochemiczną.

Tkanka	Izoenzym- $\gamma\gamma$ enolazy (ng/mg białka)
mózg (kora)	15000 [26]
szyszynka	8000 [20]
przysadka nadnercza	600 [20]
- kora	100 [20]
- rdzeń	940 [20]
tarczycza	250 [20]
przytarczycze	231 [16]
trzustka	39 [16]
grasica	78 [16]
wątroba	3 [20]
płuca	18 [26]
nerka	22 [26]
mięsień szkieletowy	< 10 [26]
erytrocyty	21 [26]
płytki krwi	470 [26]

[18]. Z tego względu opracowano i podjęto produkcję czułego immunochemicznego testu do pomiaru zawartości poszczególnych izoenzymów enolazy w tkankach i płynach ustrojowych. Uzyskane informacje są pomocne w diagnostyce chorób nowotworowych.

## II. Rozmieszczenie izoenzymu- $\gamma\gamma$ w tkankach

### II-1. Rozmieszczenie izoenzymu- $\gamma\gamma$ w tkankach ptaków i ssaków

Podjednostka  $\gamma$  jest dominującą formą enolazy w dojrzałych komórkach nerwowych i astrocytach fібrylarnych [13, 20, 33]. Izoenzym- $\alpha\alpha$  występuje tu w mniejszych ilościach — stanowi 25% całkowitej zawartości enolazy w neuronach [21]. Głównym jego źródłem w zdrowej tkance nerwowej są komórki glejowe [18, 33]. Izoenzym- $\gamma\gamma$  stanowi 1,5%-3% wszystkich cytoplazmatycznych białek w neuronach [46].

Zastosowanie czułych metod immunochemicznych pozwoliło wykryć obecność podjednostki  $\gamma$  w komórkach określanych wspólnie jako system neuroendokryny lub komórki APUD (ang. *amine precursor uptake and decarboxylation cells*) [15, 20]. Komórki neuroendokryne mają wiele cech wspólnych z neuronami — są zdolne do produkcji i wydzielania peptydów i amin, posiadają pęcherzyki sekrecyjne, niejednokrotnie mają wspólne z neuronami pochodzenie z neuronalnej ektodermy [19]. Zawartość izoenzymu- $\gamma\gamma$  enolazy w komórkach APUD jest zróżnicowana (Tab. 1).

Niektóre tkanki, np. szyszynka są pod tym względem podobne do neuronów. Nieco mniejszą zawartością izoenzymu- $\gamma\gamma$  charakteryzuje się przysadka i rdzeń nadnerczy, a trzustka, komórki jelita, płuca i tarczycza

wykazują jedynie niewielkie ilości tego izoenzymu [16, 19]. Stwierdzono także obecność izoenzymu- $\gamma\gamma$  enolazy w endokrynno-parakrynnych komórkach prostaty [23]

Niewielkie ilości podjednostki  $\gamma$  enolazy, głównie w postaci heterodimeru- $\alpha\gamma$  [14] znaleziono w ścianie tętnic, mięśniach macicy, w nerce (nabłonek cewki i komórki przykłębuszkowe), w komórkach kurczliwych nabłonka, w limfocytach [24], erytrocytach [24, 25] megakariocytach i płytkach krwi [14, 24, 26].

Wśród komórek krwi, względnie bogate w podjednostkę  $\gamma$  enolazy są płytki krwi [24]. Już badanie szpiku kostnego metodą barwienia immunochemicznego wykazało, że megakariocyty i wywodzące się z nich płytki krwi syntezują więcej tego białka niż pozostałe komórki [26]. Jednocześnie wiadomo, że płytki krwi wykazują cechy właściwe neuronom i komórkom neuroendokrynnym — są zdolne do aktywnego transportu, metabolizmu i sekrecji monoamin [26].

Izoenzym- $\gamma\gamma$  enolazy występuje także w wewnętrznych komórkach włosowych (ang. *hair cells*) ślimaka w uchu środkowym, które, choć nie mają pochodzenia neuronalnego, wydzielają neurotransmitery i ulegają polaryzacji na skutek bodźców mechanicznych, chemicznych lub synaptycznych. Jest interesujące, że nie stwierdzono obecności podjednostki  $\gamma$  w zewnętrznych komórkach włosowych, o funkcji głównie mechanicznej.

Występowanie podjednostki  $\gamma$  i izoenzymu- $\gamma\gamma$  w neuronach i tkankach neuroendokrynnych jest dobrze udokumentowane. Rozważając obecność tego białka w pozostałych tkankach należałoby jednak wykluczyć zanieczyszczenie podjednostką  $\gamma$  uwalnianą z włókien nerwowych, a w przypadku elementów morfotycznych krwi, zanieczyszczenie płytkami krwi.

W obecnym stanie badań nie stwierdzono w żadnej tkance występowania heterodimeru  $\beta\gamma$ . Generalnie wydaje się, że jednoczesna obecność izoenzymów  $\beta\beta$  i  $\gamma\gamma$  niemal całkowicie się wyklucza. Obok tkanek charakteryzujących się zdecydowaną dominacją jednej z form izoenzymatycznych, np. izoenzymu- $\gamma\gamma$  w neuronach, izoenzymu- $\beta\beta$  w mięśniach szkieletowych lub izoenzymu- $\gamma\gamma$  w wątrobie, w pozostałych tkankach formie  $\alpha\alpha$  towarzyszą większe ilości jednego z pozostałych izoenzymów, przy śladowej ilości drugiego. Tak więc, poszczególne komórki ptaków i ssaków podobnie jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, zawierająby praktycznie dwa izoenzymy enolazy.

## II-2. Zmiany zawartości podjednostki $\gamma$ w tkankach w ontogenezie

Wzajemne proporcje izoenzymów enolazy zmieniają się w czasie rozwoju osobniczego. W początkowych etapach życia płodowego dominuje izoenzym- $\alpha\alpha$ . Podjednostki  $\beta$  i  $\gamma$  pojawiają się w środkowym okresie życia płodowego [4, 17].

Większość autorów uważa, że podjednostka  $\gamma$  pojawia się dość późno w procesie różnicowania neuronalnego [17, 30, 31, 32]. W niektórych obszarach mózgowia, np. w pniu mózgu i jądrach głębokich mózdku moment ten jest wcześniejszy niż w innych, jak neurony podwzgórza i komórki Purkiniego [31].

Ostatnio opublikowane dane o zawartości podjednostki  $\gamma$  w rozwijającym się embrionie szczura wykazały, że pojawia się ona już w szóstym dniu życia płodowego [43]. W ósmym dniu, gdy wykształca się płytka neuronowa, ilość izoenzymu- $\gamma\gamma$  wzrasta bardzo gwałtownie. W szóstym dniu rozwoju szczura nie ma jednak jeszcze histologicznie rozróżnialnych neuronów, a wykrywa się izoenzym- $\gamma\gamma$ , pojawia się on więc w bardzo wczesnym etapie różnicowania.

## II-3. Rozmieszczenie podjednostki $\gamma$ w układzie nerwowym

Posługując się poliklonalnymi przeciwciałami *Vinores* i współautorzy zauważyli, że w neuronach mózgu podjednostka- $\gamma$  jest obecna w ciele komórkowym i w dendrytach, nie występuje natomiast w aksonach mielinowych. Neurony mózdku wykazywały obecność tego białka we wszystkich regionach cytoplazmy. W komórkach Purkiniego zaobserwowano jedynie śladowe ilości podjednostki  $\gamma$  enolazy w perikarionie [33]. Inny zespół badaczy, posługując się trzema różnymi monoklonalnymi przeciwciałami zauważył, że jedno z przeciwciał selektywnie oddziaływało z enolazą perikarionów kory mózgowej, podwzgórza, śródmózgowia i rdzenia kręgowego, podczas gdy dwa pozostałe przeciwciała wiązały jedynie podjednostkę- $\gamma$  enolazy obecną w mielinowych aksonach oraz w perikarionach komórek koszykowych i wzrokowej kory mózgowej. Działanie trypsyną na preparaty tkanki nerwowej usuwało jedynie epitopy rozpoznawane przez pierwsze przeciwciało monoklonalne. Wszystkie trzy przeciwciała reagowały jednakowo intensywnie z wyizolowaną podjednostką  $\gamma$  *in vitro* [34]. Różnice w oddziaływaniu przeciwciała z wolnym białkiem, oraz białkiem mieszczącym się w komórkach mogą wskazywać na to, że w tym ostatnim przypadku wchodzi ono w skład kompleksów białkowych. Wiadomo, że w neuronach tworzenie się takich kompleksów ma miejsce w procesie tzw. wolnego (powolnego) transportu wzdłuż aksonu [34, 35, 36]. Szereg białek strukturalnych (aktyna, klatryna, kalmodulina) i wiele enzymów glikolitycznych, wykazujących punkt izoelektryczny w kwaśnym zakresie pH, może tworzyć supramolekularne kompleksy, które przesuwały się wzdłuż osi aksonu, nie dysocjując przez szereg dni [37]. Udział enolazy w tworzeniu kompleksów potwierdza wynik eksperymentu, w którym uszkodzono nerw kulszowy szczura [38]. W części proksymalnej do perikarionu zawartość izoenzymu- $\gamma\gamma$  nie zmieniła się, natomiast w części dystalnej raptownie się obniży-



ła. Uszkodzenie nerwu nie miało wpływu na rozmieszczenie tego izoenzymu. Po regeneracji połączenia nerwowego proces ten zatrzymał się i zawartość izoenzymu- $\gamma\gamma$  w części dystalnej nerwu wróciła do stanu początkowego. Asocjacja podjednostki  $\gamma$  do supramolekularnego kompleksu białkowego transportu aksonalnego mogłaby zmienić ekspozycję epitopów na jej powierzchni i wywołać odmienną reakcję z monoklonalnymi przeciwciałami. Dodatkowo, struktura epitopów białek transportu aksonalnego może ulegać modyfikacji przez ufosforylowanie [34]. Dotychczas nie udowodniono, czy zjawisko to dotyczy również podjednostki  $\gamma$ . Stwierdzono natomiast, że enolaza jest substratem kinazy tyrozynowej w komórkach transformowanych niektórymi wirusami [39].

Problem tworzenia supramolekularnych kompleksów w komórkach mięśniowych [40] jest również intensywnie badany. Wstępne dane doświadczalne potwierdzają udział izoenzymu- $\alpha\alpha$  w tym procesie. [14].

Wiązanie podjednostki  $\gamma$  z organellami jest także zróżnicowane. Zaobserwowano, że oddziaływanie przeciwciał z enolazą w neuronach przebiega często wzdłuż prostych linii, co dodatkowo sugeruje wiązanie z elementami cytoszkieletu [33]. Nie stwierdzono nigdy obecności izoenzymu- $\gamma\gamma$  w jądrze komórkowym, wewnętrznej błonie mitochondrialnej (bardzo rzadko — na zewnętrznej błonie mitochondrialnej) i mitochondrialnej matrix [42]. Izoenzym- $\gamma\gamma$  był obecny na błonach aparatu Golgiego, ale nie wewnątrz cystern. Rzadko pojawił się na szorstkim retikulum endoplazmatycznym i w porach błony jądrowej, a częściej na wolnych rybosomach [33].

### III. Biochemiczna charakterystyka izoenzymu- $\gamma\gamma$ enolazy

Wszystkie podjednostki izoenzymów enolazy są zbliżone pod względem masy cząsteczkowej. Zależnie od stosowanych metod, względną masę podjednostki  $\gamma$  wyznaczono w zakresie 44 000 — 46 000 [5, 44, 45]. Masa obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej wynosi 47 kDa [46]. Podjednostka  $\gamma$  zbudowana jest z 434 aminokwasów [46] identycznie jak podjednostka  $\alpha$ . Podjednostka  $\beta$  zawiera 433 reszty aminokwasowe [47]. Obie formy enolazy z drożdży składają się z 437 aminokwasów [7, 46]. Stopień homologii podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  wynosi 81-83% sekwencji aminokwasowej.

W składzie aminokwasowym podjednostki  $\gamma$  zwraca uwagę zwiększona, w porównaniu do podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , zawartość reszt kwasu glutaminowego i asparaginowego oraz obniżona zawartość reszt lizyny (Tab.2). Punkt izoelektryczny tego białka wynosi 4,7 jednostki pH.

Struktura C-końcowego fragmentu enolazy jest szczególnie konserwatywna (95% homologii sekwencji aminokwasowej). Z siedmiu reszt cysteiny wy-

stępujących w podjednostce  $\gamma$ , pięć zlokalizowano właśnie w tym regionie białka, i to we wszystkich izoenzymach enolazy ptaków i ssaków. Obie formy

**Tabela 2**

Zestawienie zawartości aminokwasów kwaśnych i zasadowych w izoenzymach enolazy ptaków i ssaków. Dane wyrażono w molach reszty aminokwasowej na mol podjednostki. Sporządzono na podstawie [46] i [47].

izoenzym enolazy	pI	Lys	Arg	His	Asn	Gln	Asp	Glu
$\alpha\alpha$	7,2	31	14	5	20	13	26	26
$\beta\beta$	—	32	18	12	15	13	28	27
$\gamma\gamma$	4,7	27	17	7	21	13	29	29

enolazy izolowane z drożdży zawierają jedynie po jednej reszcie cysteiny, o zupełnie innej niż w enolazach ptaków i ssaków lokalizacji. W tym samym odcinku białka we wszystkich izoenzymach enolazy Eukaryota występuje także arginina, Arg 414, zaangażowana w wiązanie substratu [49]. W podjednostce  $\gamma$  występują 4 reszty tryptofanu. Położenie trzech z tych reszt w C-końcowym fragmencie białka jest identyczne jak w podjednostkach  $\alpha$  i  $\beta$ , oraz w obu izoenzymach drożdżowych. Jedna z tych reszt, Trp 367, jest prawdopodobnie eksponowana na powierzchni wiązania monomerów enzymu [48]. Doświadczenia przeprowadzone nad rozdysocjowanym białkiem sugerują, że monomer enolazy nie wykazuje aktywności enzymatycznej [72]. Niewielka aktywność jest prawdopodobnie spowodowana częściową reasocjacją podjednostek w warunkach testu enzymatycznego. Powyższe informacje upoważniają do stwierdzenia, że C-końcowy fragment jest istotny dla powstania prawidłowej struktury centrum aktywnego enzymu.

Inny aminokwas istotny dla funkcji enolazy to histydyna w pozycji 191, uczestnicząca w wiązaniu magnezu (49). W izoenzymach- $\gamma\gamma$  i  $\beta\beta$  sąsiednia do niej reszta to hydroksyaminokwas — treonina, Tre 192, w podjednostce  $\gamma$  i seryna, Ser 192 w podjednostce  $\beta$  [46, 47]. Podjednostka  $\alpha$  i oba enzymy drożdżowe mają w tej pozycji resztę asparaginy. Wysunięto hipotezę, która tłumaczy przypuszczalne znaczenie tej zmiany dla funkcji izoenzymu- $\gamma\gamma$  [50]. W czasie pobudzenia neuronu, polaryzacji błony komórkowej towarzyszy napływ jonów chlorkowych do cytoplazmy. Mogą one sprzyjać oddysocjowaniu jonów magnezu od cząsteczki białka, upośledzając w ten sposób jego aktywność. Obecność w bliskim sąsiedztwie reszty treoniny znanej z dużego powinowactwa do jonów magnezu, zapobiega być może temu zjawisku. Hipotezę popiera obserwacja wolniejszej denaturacji dime-ru- $\gamma\gamma$  niż  $\alpha\alpha$  enolazy w otoczeniu wysokich stężeń KCl [50].

Inną cechą upodabiającą izoenzymy- $\gamma\gamma$  i  $\beta\beta$  jest zwiększona w stosunku do formy- $\alpha\alpha$  stabilność podczas ogrzewania w 50°C [5, 9, 45]. Izoenzym- $\gamma\gamma$  jest także bardziej niż  $\alpha\alpha$  odporny na dysocjację pod wpływem ciśnienia. Sugeruje to albo mocniejsze powiązanie monomerów albo większą stabilność struktury podjednostki  $\gamma$  [51, 52].

Optimum pH reakcji katalizowanej przez izoenzymy enolazy ptaków i ssaków jest zbliżone i mieści się w granicach 6,8 — 7,0 [5]. Podobnie nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach stałych Michaelisa-Mentena dla fosfoenolopirogronianu (PEP) i dla 2-fosfoglicerynianu (2-PGA). Izoenzym- $\gamma\gamma$  jest słabiej niż forma- $\alpha\alpha$  hamowany przez nadmiar 2-PGA [45] (Tab. 3). Doświadczenia z użyciem drożdżowych izoenzymów enolazy sugerują, że EnoII — izoenzym o punkcie izoelektrycznym w pH 5,5 — uczestniczy w reakcji glikolizy, przeprowadzając 2-PGA w PEP, natomiast forma EnoI — o punkcie izoelektrycznym w pH 7,5 — katalizuje reakcję glukoneogenezy [1].

### Tabela 3

Stale Michaelisa-Mentena dla fosfoenolopirogronianu (PEP) i 2-fosfoglicerynianu (2-PGA) wyznaczone dla izoenzymów - $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  i  $\gamma\gamma$  enolazy ptaków i ssaków oraz EnoI i EnoII drożdży. Sporządzono na podstawie [1, 5, 9, 87].

$K_m$	Izoenzym enolazy				
	$\alpha\alpha$	$\beta\beta$	$\gamma\gamma$	EnoI	EnoII
$K_m$ dla PEP	$1,5 \times 10^{-4}$ M	$3,7 \times 10^{-4}$ M	$1,4 \times 10^{-4}$ M	$5 \times 10^{-4}$ M	$6 \times 10^{-4}$ M
$K_m$ dla 2-PGA	$3 \times 10^{-5}$ M	$3,2 \times 10^{-5}$ M	$3,3 \times 10^{-5}$ M	$5 \times 10^{-5}$ M	$15 \times 10^{-5}$ M

Również forma- $\beta\beta$  jest prawdopodobnie bardziej zaangażowana w reakcji glikolizy [12].

## IV. Budowa genu strukturalnego podjednostki $\gamma$ enolazy i jego ekspresja

W 1985 r. [53] i 1986 r. [46] opublikowano pierwsze dane o budowie mRNA i cDNA genu strukturalnego podjednostki  $\gamma$  z mózgu szczura. Całkowita sekwencja cDNA zawiera 2222 nukleotydów i składa się z niekodujących odcinków na końcach 5' i 3' oraz sekwencji kodującej o długości 1302 nukleotydów, co odpowiada tripletom dla 434 aminokwasów.

Niekodujący fragment 5' zbudowany jest z 68 nukleotydów. Jest to sekwencja bogata w guaninę i cytozynę (70%). Zawiera też krótki odcinek pirymidyn, homologiczny z sekwencją 3' końca rRNA 18S, który stanowi prawdopodobnie miejsce wiązania z rybosomem. W niekodującym fragmencie 5' znaleziono siedem lub osiem miejsc startu transkrypcji. Oznacza to, że w wyniku ekspresji genu podjednostki  $\gamma$  powstaje rodzina mRNA o różnej długości niekodującego od-

cinka 5'. Heterogenność miejsc inicjacji transkrypcji jest zjawiskiem szczególnie częstym w przypadku mRNA białek tkanki nerwowej, choć spotyka się je także, z dużo mniejszą częstotliwością, w innych tkankach oraz w genomie wirusów [46].

Niekodzący odcinek 3' jest bardzo długi, składa się z 852 nukleotydów (od kodonu nonsensownego do sygnału poliadenylacji). Nadmierna długość niekodującego fragmentu 3' jest również cechą często spotykaną wśród mRNA białek tkanki nerwowej. Odpowiedni fragment w genie strukturalnym izoenzymu- $\alpha\alpha$  jest krótszy [53]. Żaden z niekodujących odcinków 5' i 3' w genach podjednostek  $\alpha$  i  $\gamma$  nie wykazuje istotnej homologii [53].

Wielu autorów analizowało wpływ różnych czynników na ekspresję genów enolazy. Indukcja izoenzymów drożdżowych zależy od źródła węgla obecnego w pożywce. Glukoza działa jako represor EnoI, a jako induktor EnoII. Metabolity glukoneogenezy, np. mleczan i pietanol indukują syntezę EnoI [1]. W sekwencji DNA, poprzedzającej początek transkrypcji genu EnoII znaleziono fragment odpowiadający za indukcję ekspresji uzależnioną od glukozy [8]. Izoenzym EnoI został ostatnio zidentyfikowany jako jedno z białek szoku termicznego. W temperaturach fizjologicznych produkt genu *hsc70* blokuje syntezę EnoI, podobnie jak i innych białek tej grupy. Kolejnym czynnikiem regulującym ekspresję genów enolaz drożdżowych jest faza wzrostu komórki. W okresie spoczynkowym  $G_0$  dominuje izoenzym EnoI. EnoII nie uczestniczy ani w zahamowaniu wzrostu komórki ani w ochronie przed szokiem termicznym [54].

Regulacja ekspresji genów strukturalnych izoenzymów enolazy w organizmach ptaków i ssaków jest bardziej skomplikowana. Niektórzy autorzy obok regulacji transkrypcji dopuszczają możliwość regulacji na poziomie translacji, ze względu na różną kinetykę nagromadzania się mRNA i produktu białkowego (enolazy) w rozwijających się organizmach (46).

Nie mamy danych o wpływie metabolitów glikolizy i glukoneogenezy na ekspresję genów poszczególnych izoenzymów enolazy w komórkach ptaków i ssaków. Wysunięto natomiast hipotezę, według której indukcja syntezy podjednostek  $\gamma$  i  $\beta$  następuje po utworzeniu synaps pomiędzy neuronami lub neuronami i innymi komórkami. Wielu autorów w swoich pracach popiera tę koncepcję [28, 30, 31, 32, 46], chociaż została ona ostatnio poddana krytyce [43] (patrz rozdział II). Ekspresja genu strukturalnego podjednostki  $\beta$  we włóknach mięśniowych drugiego typu (szybko kurczące się, glikolityczne, w przeciwieństwie do włókien pierwszego typu - o metabolizmie tlenowym) wydaje się być pod kontrolą neuronalną [12]. Po przecięciu unerwienia obserwuje się drastyczne obniżenie ilości tego białka i zmianę proporcji na korzyść podjednostki  $\alpha$ ).

Inni badacze przypisują izoenzymowi- $\gamma\gamma$  enolazy istotne znaczenie dla intensywności glikolizy komórek

rosnących, podlegających podziałom naturalnym lub wynikającym z transformacji nowotworowej. Badając komórki drobnokomórkowego raka płuc w hodowli tkankowej zauważono, że zawartość izoenzymu- $\gamma\gamma$  jest większa w komórkach populacji będącej w logarytmicznej fazie wzrostu, niż w populacji będącej w fazie stacjonarnej [56]. Podobne zjawisko zaobserwowano w komórkach S c h w a n n a [57]. Komórki zmienione nowotworowo oraz zdrowe w czasie podziału wykazywały obecność podjednostki  $\gamma$ . Izoenzym- $\gamma\gamma$  był rozmieszczony nierównomiernie, głównie w rejonach bliskich błonie cytoplazmatycznej. Podziałom komórkowym towarzyszyła wzmożona glikoliza. Również w fibroblastach szczura transkrypcja genu tej podjednostki jest stymulowana po indukcji czynnikami wzrostu lub surowicą [58]. Indukcję transkrypcji tego genu poprzez stymulację mitozy zaobserwowano też w ludzkich limfocytach [59]. Z przedstawionych danych wynika, że również u wyższych Eukaryota ekspresja genów poszczególnych izoenzymów enolazy zmienia się wraz z fazami cyklu komórkowego i procesami wzrostu i podziału.

Kultury tkankowe neuronów, prowadzone w środowiskach o kontrolowanym składzie, są dobrym układem doświadczalnym, który pozwala zweryfikować różne hipotezy. W takich warunkach badano wpływ amin biogennych [30], hormonów oraz wspólnej kultury neuronów i komórek glejowych [60] na ekspresję izoenzymu- $\gamma\gamma$  enolazy.

Stwierdzono, że noradrenalina reguluje proces różnicowania neuronalnego hamując przejście od komórek preneuronowych do neuronów. Uwidacznia się to hamowaniem ekspresji genu specyficznego białka adhezji Li we wczesnych etapach różnicowania i genu izoenzymu- $\gamma$  w etapach późniejszych. Podobnie hamujące działanie okazuje serotonina [61], która ogranicza wzrost neurytów i tworzenie synaps przez niektóre neurony. Zauważono, że gdy hoduje się wspólnie neurony i komórki glejowe, zawartość podjednostek  $\alpha$  jest wyższa niż w czystych hodowlach neuronów i czystych hodowlach komórek glejowych. Dodanie

medium, pobranego z kultury neuronów do hodowli komórek glejowych stymulowało syntezę podjednostki  $\alpha$  przez te ostatnie. Podobnie, jeżeli do hodowli neuronów dodano medium, w którym rosły komórki glejowe, zaobserwowano wzrost zawartości izoenzymu- $\gamma\gamma$ . Wzajemny wpływ obu typów komórek na syntezę charakterystycznych dla nich izoenzymów enolazy może odbywać się za pośrednictwem drobnocząsteczkowych substancji wydzielanych do otoczenia [60].

Badając efekt hormonów zauważono, że hydrokortyzon stymuluje syntezę izoenzymu- $\gamma\gamma$  enolazy, podczas gdy progesteron i estradiol działały hamująco, podobnie jak insulina [60].

## V. Znaczenie diagnostyczne izoenzymu- $\gamma\gamma$ enolazy

Pod koniec lat siedemdziesiątych i na początku lat osiemdziesiątych, w niezależnych ośrodkach opracowano testy histoimmunochemiczne służące do wykrywania izoenzymów enolazy w tkankach i płynach ustrojowych [5, 20, 62, 63, 64]. Firma „Pharmacia” podjęła produkcję radioimmunologicznego testu do oznaczania zawartości podjednostki  $\gamma$ . W licznych publikacjach opisano zwiększoną w stosunku do zdrowych tkanek zawartość izoenzymu- $\gamma\gamma$  w komórkach wielu nowotworów, a także w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym w przypadkach chorób nowotworowych oraz w uszkodzeniach i degeneracji tkanki nerwowej.

Wyższą od normy zawartość podjednostki  $\gamma$  stwierdzono w tkankach nowotworów układu nerwowego, jak nerwiaka niedojrzałego (neuroblastoma) [65, 66, 67, 68], glejaka [18, 57, 69, 70] i glejaka siatkówki (retinoblastoma) [29], a także w licznych nowotworach tkanek neuroendokrynych. Wzmożona synteza podjednostki  $\gamma$  zachodzi w komórkach nowotworu chromochłonnych komórek kory nadnerczy [16], przysadki [16], w nowotworach płuc (rak drobnokomórkowy) [56, 71, 73, 74]. Podobne zjawisko opisano w nowotworach, których neuroendokrynnie pochodzenie jest trudne do wykazania. Są to nowotwory grasicy [75,

## BIOCHEMISCHE ANALYTIC 92

13. INTERNATIONALE TAGUNG FÜR BIOCHEMISCHE ANALYSE  
Jahreshauptversammlung  
der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie e.v.

MÜNCHEN, 5 - 8. 5. 1992

PRASIDENT:  
Prof. Dr. Dr. H. GREILING  
Aachen

ORGANISATION:  
Ulrike Arnold  
Anneli Hönke

Nymphenburger Strasse 70 D - 8000 München 2  
Telefon: (089) 1234500 Telefax: (089) 183258

76], rak sutka [77, 78, 79], czerniak [80] i nowotwór okrągłych komórek tkanki kostnej [81, 82].

Wykorzystanie diagnostyczne pomiarów zawartości izoenzymu- $\gamma\gamma$  uzyskanych za pomocą metod immunochemicznych w surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym i płynie owodniowym budzi wiele zastrzeżeń. Na ogół bowiem nie jest możliwe określenie źródła izoenzymu. Może on pochodzić zarówno ze zniszczonej przez nowotwór zdrowej tkanki, jak i obumierania własnych komórek nowotworu. Za tą drugą ewentualnością przemawia przejściowy wzrost zawartości izoenzymu- $\gamma\gamma$  we krwi po terapii naświetlaniem i obserwowanym zaniku guza [76]. Jednocześnie stwierdzono, że w hodowli tkankowej komórki nowotworowe nie wydzielają tego izoenzymu do pożywki [19]. Pojawienie się podjednostki  $\gamma$  we krwi może zależeć od unaczynienia tkanki nowotworowej. Oznaczanie zawartości izoenzymu- $\gamma\gamma$  w surowicy może być obarczone błędem wynikającym ze śladowych zanieczyszczeń płytkami krwi lub częściowej hemolizy erytrocytów. Izoenzym ten pojawia się także w płynach ustrojowych na skutek uszkodzeń mechanicznych tkanki nerwowej lub wywołanych chorobami neurologicznymi [83, 84, 85]. Zawartości podjednostki  $\gamma$  w płynach ustrojowych nie można traktować jako niezawodnego testu diagnostycznego w defektach rozwojowych płodu. Podwyższoną w stosunku do normy zawartość izoenzymu- $\gamma\gamma$  w płynie owodniowym i surowicy matki zaobserwowano jedynie w 50% przypadków stwierdzonych defektów cewy nerwowej płodu [86].

Podobnie, pomiarów zawartości izoenzymu- $\gamma\gamma$  w surowicy na ogół nie można stosować jako wskaźnika przy monitorowaniu skuteczności leczenia wielu wymienionych chorób nowotworowych. Do wyjątków należy drobnokomórkowy rak płuc i nerwiak niedojrzały u dzieci [19, 66, 67, 71, 73]. W surowicy około 65-72% pacjentów z drobnokomórkowym rakiem płuc stwierdza się podwyższoną zawartość podjednostki- $\gamma$ , a w zaawansowanym stadium choroby nawet u 91% pacjentów [73]. U pacjentów, u których wyniki leczenia były pozytywne (u 6 z 13 leczonych) obserwowano powrót zawartości podjednostki  $\gamma$  w surowicy do wartości prawidłowych [71]. Ponowne podwyższenie zawartości tej podjednostki w surowicy obserwowano przy nawrotach choroby. W przypadkach nerwiaka, drobnokomórkowego raka płuc i czerniaka zauważono zależność między zawartością izoenzymu- $\gamma\gamma$  w tkankach lub surowicy a złośliwością nowotworu i czasem pojawienia się przerzutów [80]. Można na tej podstawie rokować o przeżywalności pacjenta — im więcej izoenzymu- $\gamma\gamma$  enolazy zawiera nowotwór, tym gorsze rokowanie [19, 66, 80].

Oznaczanie zawartości izoenzymu- $\gamma\gamma$  ułatwia rozróżnienie nowotworów o niejasnym obrazie histologicznym. Wśród nowotworów płuc jedynie rak drobnokomórkowy objawia się istotnym podwyższeniem za-

wartości tego izoenzymu, w przeciwieństwie do raka komórek łuskowatych (ang. *squamous cell*) i gruczolaka (adenocarcinoma) [88].

Podjęte próby interpretacji zjawiska wzmożonej syntezy podjednostki- $\gamma$  enolazy przez nowotworowe komórki. Niektórzy autorzy za czynnik decydujący uważają neuroendokrynne pochodzenie komórek, które uległy transformacji. Jednak w pewnych przypadkach, jak rak sutka lub grasiczak, trudno jest przyjąć powyższy pogląd. Zmierzono zawartość izoenzymów- $\alpha\alpha$  i - $\gamma\gamma$  enolazy w homogenatach komórek wielu nowotworów i wyznaczono względną proporcję obu form. Stwierdzono, że nowotwory neuronalne i neuroendokrynne charakteryzuje względnie duża ilość izoenzymu - $\gamma\gamma$  ( $\alpha : \gamma = 1 - 1,25$ ), a pozostałe nowotwory - wyższa zawartość izoenzymu - $\alpha\alpha$  ( $\alpha : \gamma = 30$  do 600). Wśród nowotworów o wysokiej wartości stosunku  $\alpha : \gamma$  autorzy wymienili gruczolaka, grasiczaka i czerniaka [29].

Inna hipoteza tłumaczy zmiany proporcji izoenzymów enolazy w nowotworach odmiennym metabolizmem komórek po transformacji nowotworowej. Na przykład o ile w zdrowych komórkach glejowych występuje głównie forma- $\alpha$  enolazy, to w glejaku dominuje forma- $\gamma$ . Podobne zjawisko zmiany proporcji form izoenzymatycznych w komórkach glejaka zaobserwowano w przypadku kinazy pirogronianowej, dehydrogenazy mleczanowej i heksokinazy [18]. W złośliwych nowotworach tkanki mięśniowej (mięsa-ko-mięśniak, *rhabdomyosarcoma*) równowaga izoenzymów enolazy przesunęła się na korzyść formy  $\beta$  [29]. Wzmoczoną syntezę podjednostki  $\gamma$  enolazy wykazują komórki drobnokomórkowego raka płuc w hodowli tkankowej w warunkach beztlenowych [56]. Także płytki krwi, najbogatsze w izoenzym- $\gamma\gamma$  wśród wszystkich komórek krwi, są zdolne do wykonywania swoich funkcji w warunkach beztlenowych [26]. Synteza formy- $\gamma$  enolazy może więc być również sposobem przystosowania się komórki do życia w warunkach ograniczonego dostępu tlenu.

Artykuł otrzymano 9 maja 1989r.

Zaakceptowano do druku 6 listopada 1989r.

## Piśmiennictwo

1. Entian K.-D., Meurer B., Köhler H., Mann K.-H., Mecke D., (1987). *Biochim. Biophys. Acta*, **923**, 214-221.
2. Wold F., (1971). w *The enzymes*, 5, 499-538, (red. Boyer P. D.), Academic Press, New York.
3. Segil A., Shrutkowski A., Dworkin-Rastl E., (1988). *Biochem. J.*, **251**, 31-39.
4. Tanaka M., Sugisaki K., Nakashima K., (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**, 868-872.
5. Shimizu A., Suzuki F., Kato K., (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **748**, 278-284.
6. Veronese F. M., Schiavon O., Boccu E., Benassi C. A., Fontana A., (1984). *Int. J. Pept. Protein Res.*, **24**, 557-562.
7. Holland M. J., Holland J. P., Thill G. P., Jackson K. A., (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 1385-1395.

8. Cohen R., Holland J. P., Yokoi T., Holland M. J., (1986), *Mol. Cel. Biol.*, **6**, 2287-2297.
9. Rider C. C., Taylor C. B., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 285-300.
10. Rider C. C., Taylor C. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 175-187.
11. Kato K., Ishiguro Y., Ariyoshi Y., (1983), *Disease Markers*, **1**, 213-220.
12. Kato K., Shimizu A., Semba R., Satoh T., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **841**, 50-58.
13. Hulín D. A., Brown K., Kynoch P. A. M., Smith C., Thompson R. J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **628**, 98-107.
14. Schmechel D. E., (1985), *Lab. Invest.*, **52**, 239-242.
15. Schmechel D. E., Marangos P. J., Brightman M. W., (1976), *Nature, (Lond.)*, **276**, 834-836.
16. Iwase K., Nagasaka A., Kato K., Ohtani S., Nagatsu I., Ohyama T., Nakai A., Aono T., Nakagawa H., Shinoda S., Inagaki M., Tei T., Miyakawa S., Kawase K., Miura K., Nakamura T., Kanno T., Kawayama A., Kageyama N., (1986), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **63**, 94-101.
17. Tanaka M., Sugisaki K., Nakashima K., (1986), *J. Neurochem.*, **47**, 1523-1526.
18. Van Den Doel E. M. H., Rijksen G., Roholl P. J. M., Van Veelen C. W. M., Staal G. E. J., (1986), *J. Neurosurg.*, **65**, 345-353.
19. Marangos P. J., (1985), w *Advances in Neuroblastoma Research*, 285-294, Alan R: Liss, Inc. New York.
20. Marangos P. J., Schmechel D. E., Parma A. M., Clark R. L., Goodwin F. K., (1979), *J. Neurochem.*, **33**, 319-329.
21. Kato K., Suzuki F., Semba R., (1981), *J. Neurochem.*, **37**, 998-1005.
22. Mc Clure C. D., Mc Millan P. J., Miranda C. A., (1986), *Am. J. Anat.*, **176**, 461-467.
23. Di Sant' Agnese P. A., De Mesy Jensen K. L., Churukian C. J., Agarwal M. M., (1985), *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **109**, 607-612.
24. Kato K., Asai R., Shimizu A., Suzuki F., Ariyoshi Y., (1983), *Clin. Chim. Acta*, **127**, 353-363.
25. Brown K. W., Kynoch P. A. M., Thompson R. J., (1980), *Clin. Chim. Acta.*, **101**, 257-264.
26. Marangos P. J., Camobell I. C., Schmechel D. E., Murphy D. L., Goodwin F. K., (1980), *J. Neurochem.*, **34**, 1254-1258.
27. Altschuler R. A., Reeks K. A., Marangos P. J., Fex J., (1985), *Brain Res.*, **327**, 379-384.
28. Dechesne C. J., Escudero P., Lamanda N., Thomasset M., Sans A., (1987), *Acta Otolaryngol.*, **436**, 69-75.
29. Nakajima T., Kato K., Tsumuraya M., Kodama T., Shimosato Y., Kameya T., (1985), *Neurochem Int.*, **7**, 615-619.
30. König N., Drian M.-J., Privat A., Lamande N., Pares - Herbute N., Schachner M., (1986), *Neurosci. Lett.*, **66**, 67-72.
31. Seto - Oshima A., Kitajima S., Sano M., Kato K., Mizutani A., (1984), *Cell. Struct. Fuct.*, **9**, 337-344.
32. Scarna H., Keller A., Pujol J. F., Legault - Demare L., Zietoun Y., Lamande N., Lando D., Cousin M. A., (1981), *Neurochem Int.*, **3**, 295-301.
33. Viores S. A., Herman M. M., Rubinstein L. J., Marangos P. J., (1984), *J. Histochem. Cytochem.*, **32**, 1295-1302.
34. Frikke M. J., Seshi B., Bell Jr. C. E., (1987), *Brain Res.*, **417**, 283-292.
35. Erickson P., Moore B., (1980), *J. Neurochem.*, **35**, 232-241.
36. Marangos P. J., Zomzely - Neurath C., York C., Bondy S. C., (1975), *Biochim. Biophys. Acta.*, **392**, 75-81.
37. Brady S. T., Lasek R. J., (1981), *Cell*, **23**, 1445-1449.
38. Kato K., Satoh T., (1983), *J. Neurochem.*, **40**, 1076-1081.
39. Cooper J. A., Esch F. S., Taylor S. S., Hunter T., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 7835-7841.
40. Hofer H. W., Gerlach G., Birkel G., Kirschenlohr H. L., (1987), *Biochem. Soc. Trans.*, **15**, 982-985.
41. Walsh J. L., Knoll H. R., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **952**, 83-91.
42. Weyhenmeyer J. A., Bright M. J., (1983), *Neurosci. Lett.*, **43**, 303-307.
43. Kato K., Suzuki F., Watanabe T., Semba R., Keino H., (1984), *Neurochem. Int.*, **6**, 51-54.
44. Marangos P. J., Zis A. P., Clark R. I., Goodwin F. K., (1978), *Brain Res.*, **150**, 117-133.
45. Keller A., Scarna H., Mermert A., Pujol J. F., (1981), *J. Neurochem.*, **36**, 1389-1397.
46. Fross - Peter S., Danielson P., Sutcliffe J. G., (1986), *J. Neurosci. Res.*, **16**, 141-156.
47. Russel G. A., Dunbar B., Fothergill - Gilmore L. A., (1986), *Biochem. J.*, **236**, 115-126.
48. Brewer J. M., Bastiaens P., Lee J., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 329-334.
49. Chin C. Q., Brewer J. M., Wold F., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1377-1384.
50. Marangos P. J., Parma A. M., Goodwin F. K., (1978), *J. Neurochem.*, **31**, 727-732.
51. Kornblatt J., Hui Bon Hoa G., (1987), *Arch. Biochem. Biophys.*, **252**, 277-283.
52. Kornblatt J., Kornblatt M. J., Hui Bon Hoa G., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **128**, 577-581.
53. Sakimura K., Kushija E., Obinata M., Odani S., Takahashi Y., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7453-7457.
54. Iida H., Yahara I., (1985), *Nature (Lond.)*, **315**, 688-690.
55. Park J. H., Brown R. L., Park C. R., McCully K., Cohn M., Haselgrove J., Chance B., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8976-8980.
56. Reeve J. G., Stewart J., Watson J. V., Wulfrank D., Twentyman P. R., Bleehen N. M., (1986), *Br. J. Cancer*, **53**, 519-528.
57. Viores S. A., Herman M. M., Rubinstein L. J., (1987), *Histochem. J.*, **19**, 439-448.
58. Matrisian L. M., Rautmann G., Magunn B. E., Breathnach R., (1985), *Nucleic Acid Res.*, **13**, 711-726.
59. Giallongo A., Feo S., Moore R., Croce C. M., Showe L. C., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6741-6745.
60. Ledig M., Tholey G., Mandel P., (1985), *Develop. Brain Res.*, **21**, 107-113.
61. Haydon P. G., McCobb D. P., Kater S. B., (1984), *Science*, **226**, 561-564.
62. Kimura S., Hayane T., Kato K., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **799**, 252-259.
63. Kimura S., Uchikawa H., Yamamoto R., Kato K., (1984), *J. Appl. Biochem.*, **6**, 319-324.
64. Kimura S., Uchikawa H., Yamamoto R., Kato K., (1986), *J. Immun. Method.*, **94**, 51-55.
65. Kornblatt M. J., Keller A., Legault - Demare L., (1983), *J. Neurochem*, **41**, 1563-1568.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego jest zainteresowany zakupieniem scenariusza wykładów o określonej tematyce. Materiały powinny uwzględniać najnowsze osiągnięcia z wybranej dziedziny.

Tematy:

1. Organizacja materiału genetycznego
2. Ekspresja genów u eukariotów
3. Rola RNA w systemie białka (mRNA i rRNA)
4. Translacja (struktura rybosomu)
5. Replikacja, reparacja i rekombinacja DNA
6. Wirusy

Maszynopis wykładu ilustrowanego rysunkami, komplet przezroczy ze szczegółowym, oddzielnym opisem prosimy nadsyłać do 1. 12. 1991 r. w sprawach finansowych należy kontaktować się z Zarządem Pol. Tow. Biochemicznego, 00-227 Warszawa, Freta 16.

Zakupione wykłady będą rozpowszechniane w placówkach dydaktycznych, rekomendowane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne.

66. Zeltzer P. M., Marangos P. J., Parma A. M., Sather H., Dalton A., Hammond D., Siegel S. E., Seeger R. C., (1983), *Lancet*, **II**, 361-363.
67. Ishiguro Y., Kato K., Ito T., Nagaya M., Yamada N., Sugito T., (1983), *Pediatrics*, **72**, 696-700.
68. Vinos S. A., Bonnin J. M., Rubinstein L. J., Marangos P. J., (1984), *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **108**, 536-540.
69. Vinos S. A., Marangos P. J., Bonnin J. M., Rubinstein L. J., (1984), *Cancer. Res.*, **44**, 2595-2599.
70. Vinos S. A., Rubinstein L. J., (1985), *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **11**, 349-359.
71. Ariyoshi Y., Kato K., Ishiguro Y., Ota K., Sato T., Suchi T., (1983), *Gann*, **74**, 219-225.
72. Kulig E., Wolny M., (1988), *Int. J. Biochem.*, **20**, 79-85.
73. Esscher T., Steinholtz L., Bergh J., Nou E., Nilsson K., Pahlman S., (1985), *Thorax*, **40**, 85-90.
74. Kitinya J. N., Kingo M., Tanaka K., (1987), *Histol. Histopath.*, **2**, 333-343.
75. Wick M. R., Scheithauer B. W., Kovacs K., (1983), *Am. J. Clin. Pathol.*, **79**, 703-707.
76. Kato K., Ariyoshi Y., Ishiguro Y., Ota K., Suchi T., Sato T., (1983), *Disease Markers*, **1**, 49-54.
77. Nesland J. M., Holm R., Johannessen J. V., Gould V. E., (1986), *J. Pathol.*, **148**, 35-43.
78. Wilander E., Pahlman S., Sällström J., Lindgren A., (1987), *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**, 830-832.
79. Erikstein B., Nesland J. M., Ottestad L., Lund E., Johannessen J. V., (1988), *Histol. Histopath.*, **3**, 97-102.
80. Rode J., Dhillon A. P., (1984), *Histopathology*, **8**, 1041-1052.
81. Kawaguchi K., Koike M., (1986), *Am. J. Clin. Pathol.*, **86**, 70-83.
82. Haas O. A., Chott A., Ladenstein R., Gardner H., (1987), *Cancer*, **60**, 2219-2223.
83. Dauberschmidt R., Marangos P. J., Zinsmeyer J., Bender V., Klages G., Gross J., (1983), *Clin. Chim. Acta.*, **131**, 165-170.
84. Mokuno K., Kato K., Kawai K., Matsuoka Y., Yanagi T., Sobue I., (1983), *J. Neurol. Sci.*, **60**, 443-451.
85. Persson L., Hårdenmark H.-G., Gustafsson J., Rundström G., Mendel - Hartvig I., Esscher T., Pahlman S., (1987), *Stroke*, **18**, 911-918.
86. Sorensen K., Brodbeck U., Norgaard - Pedersen B., (1987), *Clin. Chim. Acta*, **162**, 101-104.
87. Suzuki S., Umeda Y., Kato K., (1980), *J. Biochem.*, **87**, 1587-1594.
88. Lloyd R. V., Warner T. F. C. S., Mervak T., Wilson B. S., Schmidt K., (1984), *Am. J. Surg. Pathol.*, **8**, 607-614.
89. Ishiguro Y., Kato K., Ito T., Hirose M., Nagaya M., (1984), *Gann*, **75**, 53-60.

## INFORMACJA O PRENUMERACIE „POSTĘPÓW BIOCHEMII”

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1992 roku należy wpłacić na podane poniżej konto bankowe wydawcy:

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
00-227 Warszawa, ul. Freta 16  
370044-1225-139-11

P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie  
Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu razem z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszystkich trzech odcinkach przekazu.

**Prenumerata krajowa dla instytucji:  
270 000 zł**

**Prenumerata krajowa indywidualna:  
120 000 zł**

(50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego)

Instytucje, które dokonały przelewu prosimy o przesłanie na adres redakcji zamówienia (na niektórych przekazach bankowych brak jest dokładnego adresu zamawiającego).

## INTERNATIONAL SOCIETY FOR HEART RESEARCH

Secretary

Jutta Schaper, MD  
Max-Planck-Institute  
Dep. Experimental Cardiology  
Benekestrasse 2  
D-6350 Bad Nauheim  
Tel. (0) 60 32/345-402  
345-426  
Fax (0) 60 32/345-419

## International Congress in Kobe

Japan, May 10-14, 1992.

- International Travel Award for Young Investigators
- The Richard J. Bing Award for Young Investigators (deadline 30th September 1991)

Details about membership of the ISHR, the Travel Award scheme and application forms are available from Professor D.J. Hearse, Secretary General, ISHR, Cardiovascular Research, Rayne Institute, St. Thomas Hospital, Lambeth Palace Road, London, SE1 7EH, United Kingdom

A-1080 WIEN, LAUDONGASSE 40  
PH.: 43 59 08 0, 43 45 00 0  
TLX 114415 CHWIE A  
FAX NR. 43 44 83 26

KONTAKT WARSZAWA  
TEL. 13 92 19

## oferuje:

## PCR-MATE EP

### Wszechstronny i poręczny syntezytor DNA

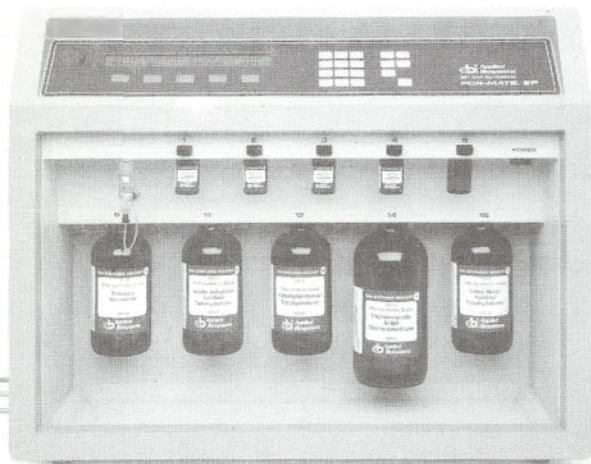
PCR-MATE EP to poręczne urządzenie laboratoryjne firmy Applied Biosystem, w którym połączono chemię, precyzyjny system odmierzania i szerokie oprogramowanie.

Dzięki tym właściwościom urządzenie PCR-MATE EP zapewnia różnorodne możliwości w zakresie syntezy kwasów nukleinowych jak np. uzyskanie:

- prawidłowego DNA
- tiofosforanowych pochodnych (np. anty-sense oligonukleotydów)
- <sup>35</sup>S — tiofosforanowych sond o wysokiej specyficzności
- a nawet syntetyczne RNA

Wraz z rozszerzaniem zakresu Twoich badań PCR-MATE EP łatwo dostosowuje się do Twoich potrzeb!

 **Applied Biosystems**



## Programowany Blok Termiczny

Pomyśl o nim jako o fotokopiarce biologicznej, której użyjesz gdy potrzebujesz wysokiej jakości kopie — przy amplifikacji DNA (np. reakcji łańcuchowej polimerazy) i hybrydyzacji. Taką samą maksymalną odtwarzalność uzyskasz stosując Programowany Blok Termiczny w badaniach z użyciem enzymów restrykcyjnych i hodowli komórkowych

 **LAB-LINE® INSTRUMENTS, INC.**

<http://rcin.org.pl>





# BIO-TELEFONY

(dzwoniąc do firmy nie zapomnij pochwalić się, że numer telefonu znalazłeś w „Postęпах Biochemii”)

AMICON I BIBBY STERILIN- POLTRADE LIMITED jest wyłącznym dystrybutorem na Polskę  
Warszawa  
tel. (022) 23-58-52  
fax: (022) 23-53-06

BIO-RAD -Wiedeń, tel. (222) 82-89-010  
fax: (222) 82-85-629

CALBIOCHEM (Pharm Supply AG) — odczynniki chemiczne, reagenty biochemiczne i immunologiczne  
Warszawa  
tel./fax: 642-87-77

CHEMINST — przedstawiciel APPLIED BIOSYSTEMS,  
SORVALL, GILSON, HAMILTON i in.  
Warszawa, tel. 13-92-19  
Wiedeń  
tel. 43-59-080, 43-45-000  
fax: 43-44-83-26

GIBCO-BRL — Life Technologies  
Warszawa, tel. 25-34-56

RIVER — biuro handlu zagranicznego  
Kraków, tel. (12) 33-66-76 fax (12) 33-66-76

**SIGMA chem. comp., USA E. Merck,**  
**Niemcy - wyspecjalizowany importer odczynników**  
**„Aurum” Sp. z o.o., 01-833, Warszawa, Daniłowskiego 1/25**

**PAMIĘTAJ! Reklama w „Postęпах Biochemii”  
to reklama skuteczna!**