

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 38, NR 1, 1992

Skurcz mięśni gładkich	2
Onkogeny i czynniki wzrostowe	6
Receptory jądrowe	12
Neurokininy ssaków	23
Receptory neurokinin	28
Kwas retinowy	32
Butylohydroksyanizol a mutageneza i kancerogeneza	37

oferuje:

odczynniki diagnostyczne
i biochemiczne

(ceny katalogowe)



Boehringer Mannheim GmbH

odczynniki chemiczne

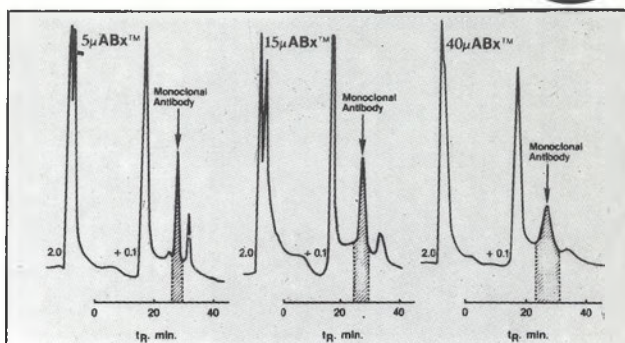
(ceny katalogowe)

Riedel-de Haën

Über 160 Jahre Erfahrung in der Chemie

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

**Jednakowa powierzchnia
wszystkich ziaren
BAKERBOND**

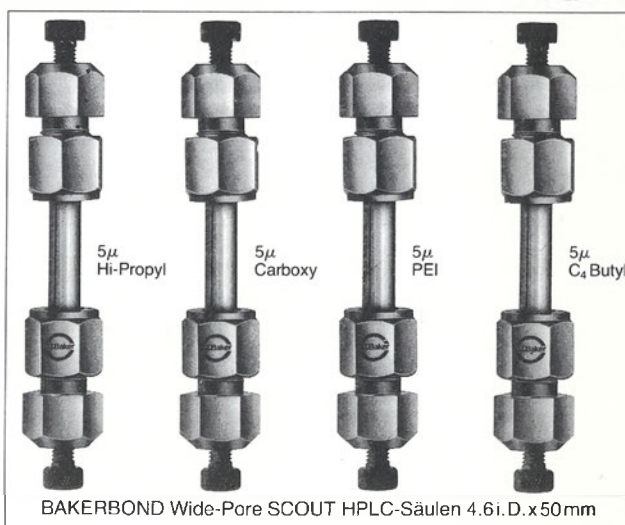


Szeroka gama zastosowań faz BAKERBOND

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

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

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



BAKERBOND Wide-Pore SCOUT HPLC-Säulen 4.6i. D.x 50mm

Wybór metody + krótka analiza HPLC

Za pomocą kolumn z wypełnieniem szerokoporowatym BAKERBOND W-P SCOUT (4.6 x 50 mm) można w krótkim czasie opracować metodę rozdziału oraz przeprowadzić analizę. Kolumna Hi-propylowa ma właściwości uniwersalne i nadaje się do rozdziału wszystkich białek. Przy pomocy kolumny karboksylowej (WCX) można rozdzielać białka o punkcie izoelektrycznym 6-12. Kolumna PEI (WAX) szczególnie dobrze rozdziela białka mające punkt izoelektryczny 7-3. Dla hormonów, stabilnych białek i niskocząsteczkowych peptydów o ilości reszt aminokwasowych < 100 poleca się kolumnę butylową C₄. Każda kolumna ma pojemność 90 mg/g w jednym rozdziale chromatograficznym.

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

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
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 200-381 wewn. 488
JACEK KUŹNICKI
tel. 659-31-43
fax: (22) 22-53-42
BOŻENA SZYMANOWSKA

RECENZENCI ZESZYTU
Referees of this issue
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
LESZEK KACZMAREK
(Warszawa)
JANINA MALEC
(Warszawa)
GRAŻYNA PALAMARCZYK
(Warszawa)
JOLANTA SKANGIEL-
-KRAMSKA
(Warszawa)
KAZIMIERZ LECH
WIERZCHOWSKI
(Warszawa)
ZOFIA ZIELIŃSKA
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA
„POSTĘPÓW BIOCHEMII”
INSTYTUT BIOLOGII
DOŚWIADCZALNEJ
im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel. (22) 22-28-31
fax: (22) 22-53-42
telex: 81-48-92

**SPIS TREŚCI
CONTENTS**

- Współczesne poglądy n. t. Mechanizmów regulacji skurczu mięśni gładkich**
Current views on the regulatory mechanisms of smooth muscle contraction-minireview
RENATA DĄBROWSKA 2
- Onkogeny kodujące elementy układu czynnik wzrostowy/receptor**
Oncogenes Related to Growth Factors and Their Receptors
PAWEŁ GOLIK, MAREK GNIADKOWSKI 6
- Jądrowe receptory jako czynniki regulujące transkrypcję**
Nuclear receptors as transcription factors
WANDA SOKÓŁ-MISIAK 12
- Biosynteza substancji P oraz innych neurokinin ssaków**
Biosynthesis of substance P and other mammalian neurokinins
ELŻBIETA HRABEC, ZBIGNIEW HRABEC,
ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK 23
- Receptory neurokinin. Udział substancji P w procesach zapalnych**
Receptors of neurokinins. Substance P and inflammation
ZBIGNIEW HRABEC, ELŻBIETA HRABEC 28
- Kwas retinowy reguluje procesy wzrostu i różnicowania**
Retinoic acid regulates growth and differentiation
JANINA KWIATKOWSKA 32
- Modyfikacje procesów mutagenozy i kancerogenozy chemicznej przez syntetyczne przeciwutleniacze fenolowe na przykładzie butylohydroksyanizolu**
Modifications of chemical mutagenesis and carcinogenesis by the synthetic phenolic antioxidants represented by butylated hydroxyanisole
KRZYSZTOF DEMKOWICZ-DOBRZAŃSKI,
EWA E. HENNIG 37
- Sprawozdanie z XXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 42
- Wskazówki dla autorów okładka

Do P. T. Autorów

W bieżącym zeszycie piśmiennictwo złożone zostało według starego wzoru — za co Kolegów przepraszamy. Aktualne pozostają odnośne informacje we Wskazówkach dla Autorów.

Bożena Szymanowska

Współczesne poglądy n.t. mechanizmów regulacji skurczu mięśni gładkich*

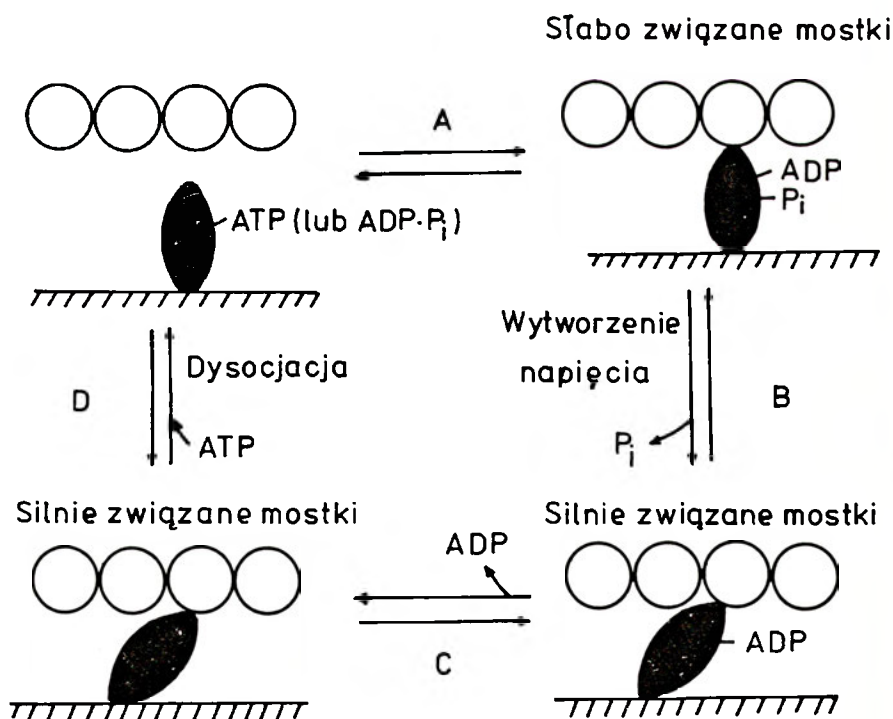
Current views on the regulatory mechanisms of smooth muscle contraction — minireview

RENATA DĄBROWSKA¹

Wykaz stosowanych skrótów: MLCK — kinaza lekkich łańcuchów miozyny

Molekularnym podłożem funkcjonowania mięśni jest, sprzężone z hydrolizą ATP, cyklicznie powtarzające się łączenie protomerów aktyny w filamentach cienkich z globularnymi, enzymatycznie aktywnymi rejonami cząsteczek miozyny (zwanymi główkami**) wysuniętymi na zewnątrz filamentów grubych [1]. Główki miozynowe zależnie od związanego z nimi

nukleotydu wytwarzają na przemian słabo lub silnie związane mostki z filamentami cienkimi [2]. Według uproszczonego schematu ilustrującego zależność pomiędzy wytwarzaniem napięcia przez mięsień a hydrolizą ATP (Ryc. 1), pojedynczy cykl skurczowo-rozkurczowy rozpoczyna się tworzeniem przez miozynę związaną z ATP lub $ADP \cdot P_i$ kompleksu o niskim powinowactwie z aktyną (etap A). Aktywowane przez aktynę odszczepienie P_i powoduje zwiększenie siły



Ryc. 1 Współzależność cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni i hydrolizy ATP. Kółka oznaczają protomery aktynowe w filamencie cienkim; elipsy — główki miozyny wystające z trzonu filamentów grubych.

* zagadnienia dotyczące fosforylacji miozyny i jej reperkusji fizjologicznych omawiano poprzednio w artykułach R. Dąbrowskiej (1986) Post. Biol. Komórki 13: 145-174 i J. Kuźnickiego (1986) Post. Biochem. 32: 19-35.

¹ Prof. dr. Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

wiązania obu białek (etap B). Transformacji tej towarzyszy wytworzenie napięcia między filamentami cienkimi i grubymi (w warunkach izometrycznych) lub przesunięcie względem siebie filamentów (w warunkach izometrycznych).

** O roli główek miozyny w skurczu mięśni mówi artykuł D. Stępkowskiego i D. Szczyńskiej (1989) Post. Biochem. 35: 585—589.

kach izotonicznych). Uwalnianie ADP (etap C) i zastąpienie go przez ATP (etap D) prowadzi w konsekwencji do dysocjacji kompleksu aktomiozynowego, przzerwania połączeń między filamentami i zakończenia cyklu.

Etap A lub B cyklu skurczowo-rozkurczowego podlega zależnej od stężenia jonów Ca^{2+} kontroli poprzez różne, specyficzne dla danego typu mięśnia, mechanizmy regulacji [3, 4].

Dla inicjacji skurczu mięśni gładkich kluczowe znaczenie ma fosforylacja regulujących-lekkich łańcuchów miozyny [5]. Obecne w filamentach cienkich białka wiążące aktynę, takie jak kaldesmon i kalponina, także mogą regulować i/lub modulować oddziaływanie aktyny z miozyną. Analiza zależności pomiędzy systemem regulacji związanym z grubym i cienkim filamentem może prowadzić do wyjaśnienia niektórych właściwości charakterystycznych i specyficznych dla mięśni gładkich, takich jak np. długotrwałe utrzymywanie skurczu przy małym wydatku energii.

Dla powstania teorii regulacji skurczu mięśni gładkich przez fosforylację miozyny fundamentalne znaczenie miała praca Sobieszka [6], który wykazał, że fosforylacji regulujących-lekkich łańcuchów miozyny z mięśni gładkich towarzyszy aktywacja Mg^{2+} -ATPazy miozynowej przez aktynę. Naszym udziałem było natomiast pokazanie, że specyficzny enzym — kinaza lekkich łańcuchów miozyny (MLCK) — katalizujący reakcję fosforylacji wymaga jonów Ca^{2+} i kalmoduliny dla jego aktywacji [7]. W wyniku dalszych, szczegółowych badań nad biochemicznymi i fizjologicznymi aspektami procesu fosforylacji prowadzonych w wielu laboratoriach, możemy obecnie opisać kaskadę reakcji wywołanych zwiększeniem stężenia jonów Ca^{2+} w sarkoplazmie i prowadzących do skurczu komórek mięśnia gładkiego.

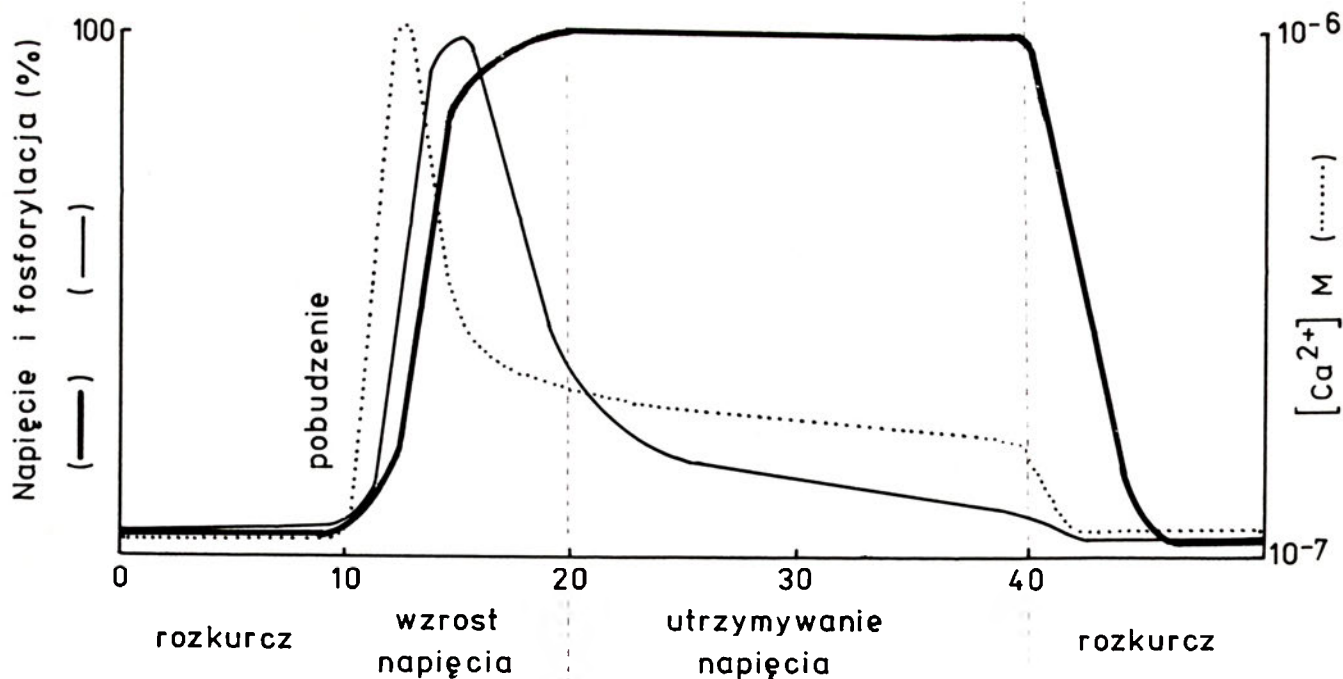
Jony Ca^{2+} potrzebne do inicjacji skurczu mięśni gładkich pochodzą głównie z sarkoplazmatycznego retikulum, z którego są uwalniane w procesie t.zw. sprzężenia mechanochemicznego przy udziale trójfosfoinozytoli [8, 9]. Około 10-krotny wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w sarkoplazmie powoduje wiązanie ich z kalmoduliną, co w konsekwencji wywołuje zmiany konformacyjne prowadzące do ekspozycji hydrofobowego, odpowiedzialnego za oddziaływanie z MLCK, rejonu tego białka [9]. Połączenie z kompleksem Ca^{2+} -kalmodulina powoduje aktywację MLCK. Polega ona na odsunięciu z aktywnego centrum kinazy, zawartej w jej strukturze i hamującej enzym pseudosubstratowej sekwencji aminokwasów, podobnej do sekwencji aminokwasów występującej w rejonie seryny 19, naturalnego jej substratu (regulujących-lekkich łańcuchów miozyny). Aktywna kinaza katalizuje fosforylację seryny 19 dwóch regulujących-lekkich łańcuchów miozyny [10]. Fosforylacja ta wpływa na podstawowe funkcje miozyny *in vitro*: zdolność do tworzenia filamentów i aktywność enzymatyczną. Nieufosforylowana miozyna występuje w konformacji „zwiniętej”, która uniemożliwia tworzenie stabilnych filamentów w obecności Mg-ATP , a także jest enzymatycznie nieaktywna z powodu „uwięzienia” produktów rozkładu ATP w strukturze białka (P_i jest uwalniany z szybkością 0.0002—0.0005/sek) [11]. Fosfory-

lacja, wyprostowując cząsteczkę miozyny, ułatwia tworzenie filamentów i powoduje ok. 500-krotny wzrost aktywności ATPazy aktomiozynowej przez przyspieszenie uwalniania P_i (etap B, Ryc. 1) do wartości 0.3/sek.

Utrwalając filamety zbudowane z nieufosforylowanej miozyny przez przyłączenie specyficznych monoklonalnych przeciwciał blokujących ich depolimeryzację w obecności Mg-ATP , wykazano, że mają one również bardzo niską aktywność ATPazy aktomiozynowej (0.002/sek) [12]. Oznacza to, że fosforylacja miozyny w formie filamentów — t.j. w warunkach nie powodujących dramatycznych zmian konformacyjnych poszczególnych cząsteczek tego białka, które prawdopodobnie są bliskie warunkom panującym w mięśniu *in vivo* [11], również odgrywa rolę głównego regulatora jej aktywności funkcjonalnej. Potwierdzenia tego poglądu dostarczył tzw. test ruchliwości (ang. *motility assay*) pokazujący, że przytwierdzone do nitrocelulozowego podłoża filamety miozyny z mięśni gładkich wymagają fosforylacji by móc w obecności ATP powodować przesuwanie filamentów aktywnych [14].

Fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny jest skorelowana ze wzrostem napięcia powstającego w mięśniu w warunkach izometrycznych [15, 16] (Ryc. 2). Kiedy stężenie jonów Ca^{2+} w sarkoplazmie spada do poziomu pośredniego (pomiędzy stężeniem indukującym skurcz a stężeniem w stanie rozkurczu), nad aktywnością MLCK zaczyna przeważać aktywność niezależnej od stężenia jonów Ca^{2+} fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny, która je defosforyluje. Spadkowi poziomu ufosforylowania lekkich łańcuchów miozyny nie towarzyszy jednakże spadek napięcia mięśni. Zjawisko to wyjaśnia tworzenie tzw. zahaczonych mostków (ang. *latch bridges*) między filamentami grubymi zawierającymi zdefosforylowaną miozynę i filamentami cienkimi [17]. Charakteryzują się one zredukowaną szybkością cyklu skurczowo-rozkurczowego i ponad 300-krotnie zmniejszoną konsumpcją ATP, co pozwala na utrzymanie stanu skurczu mięśni przy bardzo ekonomicznym wydatkowaniu energii. Dalszy spadek stężenia jonów Ca^{2+} do poziomu ok. 0.1 μM powoduje dysocjację zahaczonych mostków i rozkurcz mięśni.

Tworzenie zahaczonych mostków grupa Murphy'ego [15, 16] tłumaczyła istnieniem innego, zależnego od stężenia jonów Ca^{2+} , układu regulacji, komplementarnego do fosforylacji miozyny. Paradoxem było to, że kiedy rozpoczęły się intensywne badania nad identyfikacją takiego układu, grupa ta wycofała się z poprzednich poglądów, wyjaśniając utrzymywanie stanu napięcia mięśni gładkich bardzo powolną defosforylacją miozyny pozostającej w połączeniu z aktyną, a więc wyłącznie w oparciu o teorię fosforylacji [18]. Okazało się jednak, że negowanie potrzeby istnienia dodatkowego mechanizmu regulacji nie jest równoznaczne z jego brakiem. Tym bardziej, że wyniki testu kompetycji — polegającego na pomiarach zależności aktywności ATPazy w surowym preparacie aktomiozyny z mięśni gładkich po dodaniu nadmiaru miozyny z mięśni szkieletowych — od stężenia jonów Ca^{2+} , wskazywały na istnienie



Ryc. 2 Przebieg cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni gładkich.

w mięśniach gładkich zależnego od Ca^{2+} układu regulacji związanego z filamentami cienkimi [19]. Potencjalnymi kandydatami dla wypełnienia tej roli są dwa białka mięśni gładkich: kaldesmon i kalponina, odkryte w latach osiemdziesiątych w pracowniach japońskich. Obydwa wiążą się z kalmoduliną (stąd pierwsza część ich nazwy) i aktyną [20, 21]. Kaldesmon ponadto wiąże się z miozyna mięśni gładkich [22, 23].

Kaldesmon, odkryty przez Sobue i współautorów w 1981 r. [20], jest asymetrycznym białkiem (76 nm × 3 nm) [24], którego masa cząsteczkowa obliczona na podstawie sekwencji aminokwasów wynosi 89 kDa [25]. Metodą ograniczonej proteolizy wykazaliśmy, że białko to przymocowane jest do filamentów aktynowych jego C-końcowym fragmentem, w obrębie którego znajduje się też miejsce wiązania kalmoduliny [26, 27]. Kaldesmon jest oprócz aktyny i tropomiozyny głównym składnikiem filamentów cienkich mięśni gładkich. Stechiometria jego wiązania z cząsteczkami aktyny i tropomiozyny wynosi 1:14:2 [28]. Badania natywnych filamentów cienkich przy pomocy mikroskopu elektronowego i dyfrakcji promieni X wykazały, że kaldesmon podobnie jak tropomiozyna jest ulokowany wzdłuż filamentów aktynowych na całej ich długości [28].

Już wstępne badania wykazały, że wiązaniu kaldesmonu z aktyną towarzyszy hamowanie aktywowanej przez aktynę ATPazy miozynowej i superprecypitacji żelu aktomiozynowego [29]. Hamowanie to jest potęgowane przez tropomiozynę, która wzmacnia wiązanie kaldesmonu z aktyną, a znoszone w obecności jonów Ca^{2+} przez kolmodulinę [30] lub przez zależną od kalmoduliny fosforylację kaldesmonu [31]. Później wykazano, że kaldesmon hamuje również przesuwanie filamentów miozynowych wzdłuż „kablów” aktynowych glonu *Nitella* [32], a także powoduje spadek napięcia glicerynowanych włókien mięśni szkieletowych [33].

Badania nad wpływem kaldesmonu na kompleks aktomiozynowy w roztworze [34], a także we włóknach mięśniowych, [35, 36] pozwoliły wykazać, że białko to osłabia wiązanie między aktyną i miozyna, i prawdopodobnie zapobiega słabemu wiązaniu aktyny z miozyna podczas rozkurczu mięśni gładkich [33] (hamuje etap A, Ryc. 1).

Z drugiej jednak strony, zdolność kaldesmonu do oddziaływania nie tylko z aktyną, ale również z miozyna, doprowadziła do powstania hipotezy dotyczącej jego udziału w utrzymywaniu stanu napięcia mięśni gładkich po defosforylacji miozyny [37]. Według tej hipotezy jest on wynikiem zależnego od jonów Ca^{2+} i kalmoduliny łączenia N-końca kaldesmonu z miozyna i C-końca z aktyną i wytwarzania w ten sposób zahaczonych mostków pomiędzy filamentami cienkimi i grubymi. Dotąd jednak nie ma bezpośrednich dowodów na udział kaldesmonu w tworzeniu takich mostków *in vivo*. Także nie ma danych eksperymentalnych przemawiających za tym, że grube filamenty zawierające zdefosforylowaną miozyna połączone przez kaldesmon z filamentami cienkimi mogą utrzymywać napięcie w mięśniu gładkim.

Nie wyklucza się też możliwości, że kaldesmon pełni funkcję białka strukturalnego, które zapewnia odpowiednią organizację filamentów aktynowych i miozynowych, niezbędną do wytworzenia napięcia mięśnia [38].

Kalponina, odkryta w 1986 r. przez Takahashi i współautorów [21], jest białkiem globularnym o masie cząsteczkowej, wyznaczonej z ruchliwości elektroforetycznej na żelu poliakryloamidowym w obecności SDS, 34 kDa. Jest to białko immunologicznie podobne do troponiny T z mięśni szkieletowych (stąd druga część jego nazwy) i — podobnie jak troponina — jest białkiem silnie zasadowym, posiadającym zdolność wiązania tropomiozyny [39]. Molowe proporcje kalponiny do aktyny i tropomiozyny w filamentach cienkich otrzymanych z hemo-

genatów mięśni gładkich wynoszą odpowiednio 1:10 i 1:1.3 [40], jakkolwiek *in vitro* nasycenie aktyny kalponiną otrzymuje się przy stosunku obu białek równym 1:1 [41].

Kalponina hamuje aktywność ATPazy aktomiozy nowej [41, 42], prawdopodobnie poprzez redukcję szybkości maksymalnej reakcji hydrolizy ATP [40]. Indukowane przez nią hamowanie ATPazy jest neutralizowane w obecności Ca^{2+} przez nadmiar kalmoduliny [41] lub jej fosforylację [42]. Na tej podstawie postuluje się udział kalponiny w regulacji (modulacji) skurcz mięśni gładkich.

Powstaje pytanie, jakie znaczenie fizjologiczne mają dwa podobne, zależne od białek cienkiego filamentu, mechanizmy regulujące oddziaływanie aktyny z miozyną w mięśniu gładkim? Możliwość rozdzielania metodą immunoprecypitacji cienkich filamentów wzbogaconych bądź w kaldesmon, bądź w kalponinę [43], a także wykazane przez nas współzawodnictwo wiązania tych białek z filamentami aktynowymi [41], sugeruje, że występują one w różnych populacjach cienkich filamentów. Dotąd w mięśniach gładkich wyróżniono dwie klasy filamentów cienkich: jedna związana bezpośrednio z aparatem kurczliwym (w tych filamentach występuje kaldesmon) i druga z cytoszkieletem komórki (gdzie brak jest kaldesmonu, a występuje filamina) [24, 44]. Dokładna lokalizacja kalponiny w komórce mięśni gładkich może dać odpowiedź na pytanie, czy filamente cienkie zawierające to białko znajdują się w bliskim sąsiedztwie filamentów miozynowych, a zatem czy kalponina może być regulatorem współdziałania aktyny z miozyną.

Podsumowując: Ustalono w sposób bezsporny udział fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny w inicjacji skurczu mięśni gładkich. Kontrowersyjne są natomiast poglądy dotyczące natury i regulacji długotrwałego skurczu utrzymywanego przez mięsień po defosforylacji miozyny; jedni autorzy tłumaczą jego występowanie wyłącznie w oparciu o teorię fosforylacji, inni rozważają możliwość udziału dodatkowego mechanizmu regulacji włączającego kaldesmon. Kaldesmon i kalponina są prawdopodobnie odpowiedzialne za regulację stanu rozkurczu mięśni.

Artykuł otrzymano 23 lipca 1991 r.
Zaakceptowano do druku 3 września 1991 r.

Piśmiennictwo

1. Dąbrowska R. (1989), W: L. Kuźnicki (red), Komórka, jej budowa i ruch. Ossolineum, Wrocław, str 93—132
2. Taylor E. W. (1979), *CRC Crit. Rev. Biochem.* 4: 103—164
3. Sellers J.R. (1985), *J. Biol. Chem.* 260: 15815—15819
4. Chalovich J.M. (1988), *Cell. Biophys.* 12: 73—85
5. Dąbrowska R. (1989), W: Kotyk A., Skoda J., Paces V., Kostka V. (red), Highlights of Modern Biochemistry, t. 2. VSP Intern. Sci. Publ., Amsterdam, str. 1011—1020
6. Sobieszek A. (1977), *Eur. J. Biochem.* 73: 477—483
7. Dąbrowska R., Aromatorio D., Sherry J.M.F., Hartshorne D.J. (1978), *Biochemistry* 17: 253—258
8. Somlyo A.P., Walker J.V., Goldman Y.E., Trentham D.R., Kobayashi S., Kitazawa T., Somlyo A.V. *Trans. R. Soc. Lond. (Biol)*, 320: 399—414

9. Sommerville L.E., Hartshorne D.J. (1986) *Cell. Calcium* 7: 353—364
10. Pearson R.B., Wetsenthal R.E.H., Means A.R., Hartshorne D.J., Kemp B.E. (1988), *Science*. 241: 970—973
11. Cross R.A., Cross K.E., Sobieszek A. (1986), *EMBO J.* 5: 2637—2641
12. Trybus K.M. (1986), *J. Cell. Biol.* 109: 2887—2894
13. Somlyo A.V., Buttler T.M., Bond M., Somlyo A.P. (1981), *Nature* 294: 567—569
14. Umamoto S., Sellers J. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 14864—14869
15. Dillon P.F., Aksoy M.O., Driska S.P., Murphy R.A. (1981), *Science*. 211: 495—497
16. Aksoy M.O., Mras S., Kamm K.E., Murphy R.A. (1983), *Am. J. Physiol.* 245: C255—C270
17. Murphy R.A., Rembold C.M., Hai C.-M. (1990), W: *Frontiers in Smooth Muscle Research*. Alan Liss Inc., New York, str. 39—50
18. Hai C.-M., Murphy R.A. *Am. J. Physiol.* 255: C85—C94
19. Marston S.B., Travett R.M. (1980), *Biochem. J.* 185: 355—369
20. Sobue K., Muramoto Y., Fujita M., Kakiuchi S. (1981), *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA* 78: 5652—5655
21. Takahashi K., Hiwada K., Kokubu T. (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 20—26
22. Hemric M.E., Chalovich J.M. (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 1878—1885
23. Ikebe M., Reardon S. (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 3055—3058
24. Fürst D.O., Cross R.A., DeMey J., Small J.V. (1986), *EMBO J.* 5: 251—257
25. Bryan J. (1990), *Ann. N. York Acad. Sci.* 259: 100—110
26. Szpacenko A., Dąbrowska R. (1986), *FEBS Lett* 202: 182—186
27. Makuch R., Walsh M.P., Dąbrowska R. (1989), *FEBS Lett.* 247: 411—414
28. Lehman W., Moody C., Craig R. (1990), *Ann. N. York Acad. Sci.* 599: 75—84
29. Sobue K., Morimoto K., Inui M., Kanda K., Kakiuchi S. (1982), *Biomed. Res.* 3: 188—196
30. Dąbrowska R., Goch A., Gałazkiewicz B., Osińska H. (1985), *Biochem. Biophys. Acta* 842: 70—75
31. Ngai P., Walsh M.P. (1987), *Biochem. J.* 244: 417—425
32. Sellers J.R., Shirinsky V. *J. Cell. Biol.* 150: 194a
33. Brenner B., Yu L.C., Chalovich J.M. (1990), *Biophys. J.* 57: 397a
34. Chalovich J.M., Cornelius P., Benson C.E. (1987), *J. Biol. Chem.* 262: 5711—5716
35. Gałazkiewicz B., Borovikov Y.S., Dąbrowska R. (1987), *Biochem. Biophys. Acta* 916: 368—375
36. Nowak E., Borovikov Y.S., Dąbrowska R. (1989), *Biochem. Biophys. Acta* 999: 289—292
37. Walsh M.P., Sutherland C. (1989), W: Hidaka H., Carafoli E., Means A.R., Tanaka T. (red), *Calcium Protein Signaling*. Plenum Publ. Co N. York, str. 337—346
38. Nowak E., Borovikov Y.S., Khoroshev M., Dąbrowska R. (1991), *FEBS Lett* 281: 51—54
39. Takahashi K., Hiwada K., Kokubu T. (1988), *Hypertension* 11: 620—626
40. Nishida W., Abe M., Takahashi K., Hiwada K. (1990), *FEBS Lett* 268: 165—168
41. Makuch R., Birukov K., Shirinsky V., Dąbrowska R. (1991), *Biochem. J.* 280: 33—38
42. Winder S., Walsh M.P. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 10148—10155
43. Lehman W. (1991), *J. Muscle Res. and Cell Motility* 12: 221—224
44. Small J.V., Fürst D.O., DeMey J. (1986), *J. Cell Biol.* 102: 210—220

12th International Symposium on Medical Chemistry,

Basel, Switzerland, 13–17 September 1992

Info: 12th International Symposium on Medical Chemistry, Administrative Secretariat, P O B 141, CH-4007 Basel, Switzerland.

Onkogeny kodujące elementy układu czynnik wzrostowy/receptor

Oncogenes related to growth factors and their receptors

PAWEŁ GOLIK¹
MAREK GNIADKOWSKI²

Spis treści:

- I. Ogólne informacje dotyczące czynników wzrostowych i ich receptorów
- II. Przegląd onkogenów związanych z czynnikami wzrostowymi i ich receptorami
 - II-1. Onkogeny kodujące czynniki wzrostowe
 - II-2. Onkogeny kodujące receptory czynników wzrostowych

Contents:

- I. General remarks on growth factors and their receptors
- II. Oncogenes related to growth factors and their receptors — a review
 - II-1. Oncogenes encoding growth factors
 - II-2. Oncogenes encoding growth factor receptors

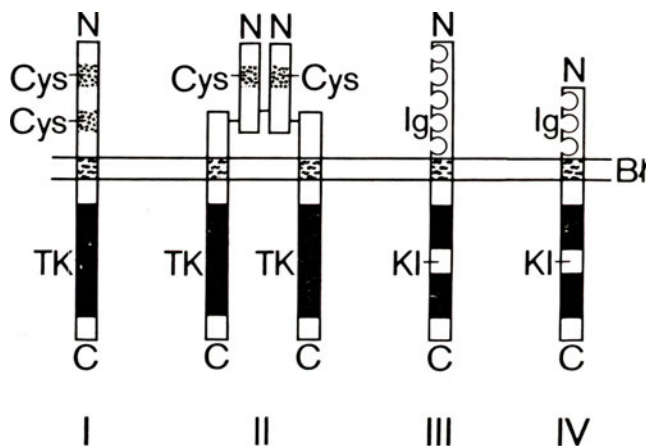
I. Ogólne informacje dotyczące czynników wzrostowych i ich receptorów

Czynniki wzrostowe (ang. *Growth Factors* — *GF*) i ich receptory stanowią jedno z najintensywniej badanych zagadnień biologii molekularnej ostatnich lat. Wiele podstawowych informacji dotyczących układu czynnik wzrostowy/receptor zawartych jest w dostępnej literaturze polskojęzycznej [1-13], stąd nie będą tu omawiane szczegółowo.

Wszystkie omawiane poniżej układy charakteryzują się podobnym mechanizmem działania (nie są tu uwzględnione pewne nietypowe peptydy o charakterze czynników wzrostowych, jak niektóre interleukiny, mające inny mechanizm działania). Ich receptory są to transbłonowe enzymy allosteryczne, wykazujące aktywność białkowych kinaz tyrozynowych [1, 4, 6, 12, 14-19].

Ze względu na strukturę, receptorowe kinazy tyrozynowe podzielono na 4 klasy [14]. Przedstawiono je na Ryc. 1. Z istniejących hipotez dotyczących mechanizmów aktywacji receptorowych kinaz tyrozynowych (hipotezy *flush chain* i *cluster*) [12] obecnie za udokumentowaną uważa się hipotezę agregacji receptorów (*cluster*) [14]. Mechanizm aktywującej kinazę agregacji zależy od struktury samej kinazy i jej ligandu [14]. Mechanizmy aktywacji kinaz należących do poszczególnych klas przedstawia Ryc. 2.

¹ student III roku, ² mgr Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego, Al. Ujazdowskie 4, 00-478 Warszawa, tel. 29-40-11, w. 2, 28



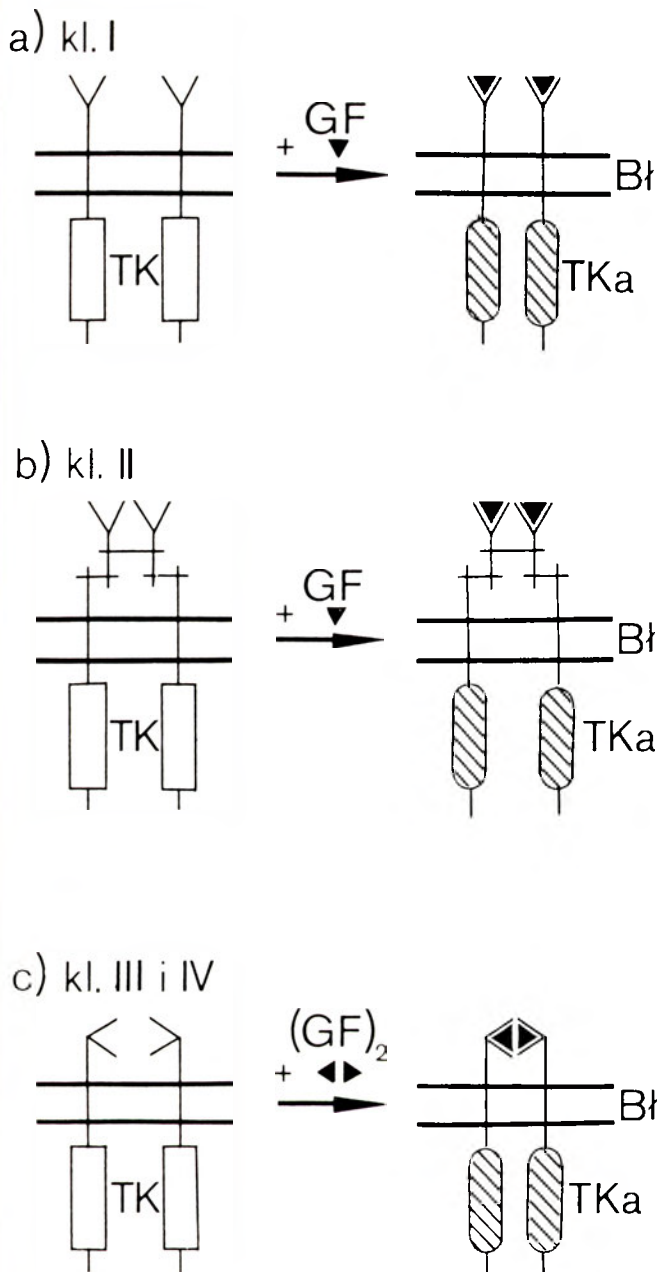
Ryc. 1. Struktury receptorowych kinaz tyrozynowych. Receptory kl. I są monomerami. Domena zewnątrzkomórkowa zawiera fragmenty bogate w cysteinę (Cys), domena kinazowa (TK) jest ciągła. Receptory kl. II (np. insuliny) są heterotetramerami, receptory kl. III i IV w domenie zewnątrzkomórkowej zawierają „kieszonkę” (Ig) podobne do wyst. w cząsteczkach immunoglobulin powtórzone 5 (kl. III) lub 3 (kl. IV) razy; domena kinazowa przedzielona jest wstawką (KI). Bt — błona komórkowa. Wg. [14].

Aktywacja receptora czynnika wzrostowego powoduje w komórce szereg zmian, prowadzących ostatecznie do stymulacji podziału komórki. Zostały one szeroko omówione w pracy [1], nowsze dane szczegółowe można znaleźć w pracach [14-19].

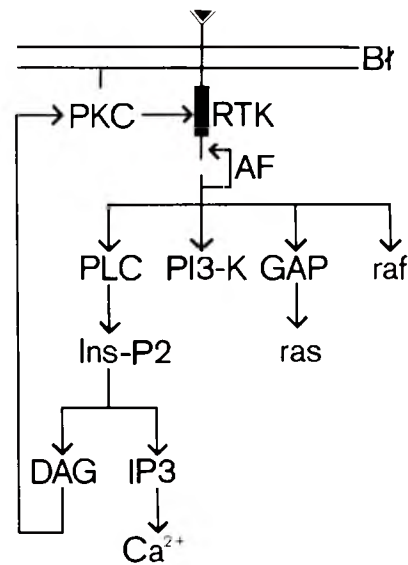
Receptory czynników wzrostowych omawiane w dalszej części pracy działają poprzez aktywację szlaku fosforanów inozytoli [1, 14-19], układu białek G [1, 11, 14-16], oraz kinaz rodziny *raf* [1, 4, 14-16]. Fosforylowane przez nie substraty to najprawdopodobniej: fosfolipaza C, fosfatydyloinozytolo = 3-kinaza, białka aktywujące GTP-azy — GAP i kinazy serynowo-treoninowe z rodziny *raf* [14-19]. Schematycznie przedstawiono te procesy na Ryc. 3. Oczywiście nie

Okulary ochronne firmy PEROCCHI,

niezbędne do pracy przy komputerze, pochłaniają także w 100% promieniowanie UV
Zamówienia przyjmuje firma Perocchi
04-141 Warszawa, skr. poczt. 5
Informacja handlowa:
Warszawa, ul. Francuska 16A, tel. 17-98-05



Ryc. 2. Mechanizmy aktywacji receptorowych kinaz tyrozynowych — hipoteza cluster.
 a) receptory kl. I agregują pod wpływem monomerycznego ligandu (GF), nieaktywna domena kinazowa (TK) przechodzi wówczas w aktywną formę (TKa).
 b) receptory kl. II są zawsze w formie heterotetrameru, związanie ligandu indukuje zmianę konformacji na aktywną.
 c) receptory kl. III i IV są to monomery „spajane” przez dimeryczny ligand - (GF)₂.
 Bł — błona komórkowa. Wg. [14].



Ryc. 3. Schemat szlaku przekazywania odpowiedzi na czynnik wzrostowy. RTK — receptorowa kinaza tyrozynowa, AF — autofosforylacja, raf — cytoplazmatyczne kinazy ser/thr, GAP — białka aktywujące GTP-azy, ras — GTP-azy, PI3-K — fosfatydyloinozytolo 3-kinaza, PLC — fosfolipaza C, Ins-P2 — fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (substrat PLC), DAG — diacylglicerol, IP3 — inozytolotrifosforan, PKC — kinaza białkowa C, Bł — błona komórki. Wg. [1, 14-19].

Tabela 1.

Onkogeny kodujące elementy układu czynnik wzrostowy/receptor — podsumowanie.

ONKOGEN	TYP ¹	CZYNNIK WZROSTOWY	LITERATURA
<i>sis</i>	GF	PDGF (łańcuch B)	13, 20, 21
<i>hst</i> (KS, <i>int-2</i>)	GF	FGF (rodzina)	22
FGF-5	GF	FGF-5	47
<i>erb-B</i>	GFR	EGF (i TGF α)	4, 23—26
<i>fms</i>	GFR	CSF-1 (M-CSF)	27—30
<i>neu</i> (HER-2, <i>c-erbB-2</i>)	GFR	?	31—33
<i>kit</i>	GFR	MGF (SLF, kL)	34—37
<i>Xmrk</i>	GFR	?	38
<i>trk</i>	GFR	NGF	8, 9, 39
<i>trkB</i>	GFR	BDNF, NT-3, NT-4	40, 41
<i>met</i>	GFR ²	HGF ³	42, 43
<i>sea</i>	GFR ²	?	44
<i>ros</i>	GFR ²	?	45
<i>ret</i>	GFR ⁴	?	46, 51
<i>bek</i>	GFR	b-FGF	48
<i>flg</i>	GFR	a-FGF	48
<i>ltk</i>	GFR ²	?	49
<i>erbB-3</i>	GFR	?	50
<i>flt</i>	GFR	?	52, 53

¹ GF — czynnik wzrostowy, GFR — receptor czynnika wzrostowego.

² Jest to rodzina receptorów wykazujących homologię z fragmentami rec. insuliny, o niezupełnie poznanej strukturze

³ Hepatocyte Growth Factor — czynnik wzrostu hepatocytów

⁴ nietypowa struktura, dwie potencjalne domeny transbłonowe

ich komórkowe odpowiedniki oraz rola w organizmie. W dalszej części pracy omówiono te układy, które poznano stosunkowo najlepiej i najczęściej wzmiankowano w najnowszej literaturze. Oczywiście nie sposób omówić tu wszystkich wyizolowanych dotychczas on-

kogenów omawianej grupy, niektóre umieszczono jedynie w tabeli podsumowującej (Tab. 1).

II. Przegląd onkogenów związanych z czynnikami wzrostowymi i ich receptorami.

II-1. Onkogeny kodujące czynniki wzrostowe.

II-1.1 PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) — czynnik wzrostowy z płytek krwi. Onkogen *sis*

PDGF jest jednym z głównych mitogenów surowicy krwi. Produkowany jest głównie przez płytki krwi (trombocyty) i magazynowany w tzw. ziarnach α . Uwalniany jest po aktywacji mechanizmu krzepnięcia krwi. Działa na komórki pochodzenia mezenchymatycznego — głównie fibroblasty, komórki mięśni gładkich i gębowe. Jego rola polega na stymulacji podziałów komórek w procesie regeneracji uszkodzonej tkanki. Jest także atraktantem dla monocytów i neutrofilów. Receptor PDGF należy do klasy III receptorowych kinaz tyrozynowych (patrz Ryc. 1, 2) [13, 20, 21].

Gen kodujący jeden z łańcuchów PDGF (jest on dimerem) był jednym z pierwszych zbadanych protoonkogenów — pierwszym z omawianej grupy. Gdy po raz pierwszy (w 1983 r.) otrzymano i częściowo zbadano budowę PDGF okazało się, że składa się on z co najmniej dwóch łańcuchów peptydowych, których częściowa sekwencja została wkrótce poznana. Po wprowadzeniu tej sekwencji do komputerowej bazy danych okazało się niespodziewanie, że sekwencja jednego z tych łańcuchów jest praktycznie identyczna z sekwencją fragmentów produktu wirusowego onkogeny *v-sis*, pochodzącego z wirusa małpiego mięsaka SSV (*Simian Sarcoma Virus*). Po bliższej analizie okazało się, że produkt onkogeny *v-sis* jest fuzją jednego z łańcuchów PDGF z wirusowym białkiem *env*. Dzięki temu w wyniku intensywnej ekspresji onkogeny białko p28^{sis} dostaje się na błonę komórki (i częściowo na zewnątrz), gdzie może aktywować receptory PDGF. W ten sposób dochodzi do stymulacji w układzie autokrynnym (*autocrine stimulation*) podziałów komórek wrażliwych na PDGF [20, 21].

Podobny mechanizm wykryto także w kilku liniach komórkowych ludzkiego mięsaka — zachodziła tam jednak tylko nadekspresja niezmienionego PDGF — wszystko to były komórki pierwotnie wrażliwe na PDGF. Gen o istotnej homologii do *v-sis* został odnaleziony w ludzkim genomie i według wszelkiego prawdopodobieństwa koduje on jeden z łańcuchów PDGF [20, 21].

II-1.2 Rodzina FGF (*Fibroblast Growth Factors*) — fibroblastowych czynników wzrostowych. Onkogeny *KS*, *hst*, *int-2*

Liczna i niezbyt dobrze zbadana rodzina czynników wzrostowych określaną wspólną nazwą FGF, działa na komórki pochodzenia mezenchymatycznego — głównie fibroblasty. FGF wykazują często działanie synergistyczne z innymi czynnikami wzrostowymi.

Procesem, w którym zdają się głównie uczestniczyć *in vivo* jest angiogeneza — tworzenie naczyń krwionośnych. *In vitro* są silnymi mitogenami dla fibroblastów. Dość dobrze scharakteryzowane są dwa z nich: tzw. kwaśny oraz zasadowy FGF. Ich receptory są kinazami tyrozynowymi klasy IV.

Dokonując transfekcji DNA ludzkiego mięsaka Kaposiego do komórek linii NIH 3T3 (otrzymanych z mysich fibroblastów) otrzymano linie komórek transformowanych, w których zachodziła ekspresja dwu nowych transkryptów. cDNA otrzymano z jednego z nich okazał się być czynnikiem wystarczającym do transformacji komórek NIH 3T3. Sklonowany w ten sposób onkogen nazwano KS (od *Kaposi's Sarcoma*). Po zsekwencjonowaniu okazało się, że znaleziona w cDNA otwarta ramka odczytu koduje produkt białkowy i że wykazuje on istotną homologię ze znanymi ludzkimi FGF, lecz nie jest z nimi identyczny. Liczne testy (w tym analiza aktywności białka KS produkowanego w komórkach *E. coli*) wykazały, że istotnie jest to czynnik wzrostowy, podobny, lecz nie tożsamy ze znanymi FGF. Jest to więc najprawdopodobniej jeden z licznych członków tej rodziny, różny jednak od znanych FGF — kwaśnego i zasadowego (a-FGF i b-FGF). W mRNA onkogeny KS istnieje przy końcu 3' sekwencja AUUU(A) typowa dla nietrwałych mRNA. Tymczasem jednak mRNA onkogeny KS z komórek mięsaka jest trwały — być może nienormalna trwałość przyczynia się do nadekspresji i transformacji [22].

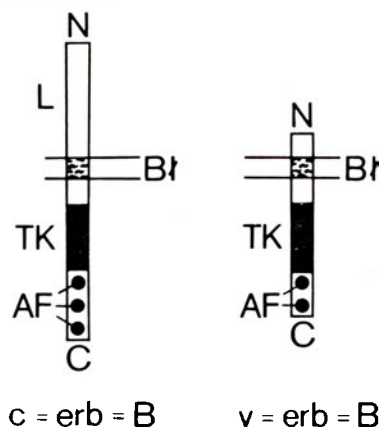
Niezależnie wyizolowany z komórek raka żołądka człowieka onkogen *hst* po zsekwencjonowaniu okazał się być w znaczącym stopniu homologiczny do KS. Podobną homologię wykryto dla onkogeny *int-2*, będącego miejscem integracji wirusa MMTV (*Murine Mammary Tumor Virus*) — wirusa raka piersi u myszy [22]. Wszystko wskazuje na to, że mamy tu do czynienia z dużą rodziną zbliżonych onkogenów, odpowiadającą rodzinie FGF. Bliższych informacji na ich temat jednak brak.

II-2. Onkogeny kodujące receptory czynników wzrostowych

II-2.1 Receptor EGF (*Epidermal Growth Factor*) — nabłonkowego czynnika wzrostowego. Onkogen *erb-B*

EGF jest mitogenem dla komórek o charakterze nabłonkowym, *in vitro* działa na różne komórki pochodzenia epidermalnego. Jego receptor jest tyrozynową kinazą klasy I. Poza EGF, receptor ten wiąże również wydajnie TGF α (*Transforming Growth Factor α*) — transformujący czynnik wzrostowy α [3], co wydaje się grać istotną rolę w procesach proliferacji i odnawiania komórek szpiku, głównie prekursorów erytrocytów [23].

Onkogen *v-erb-B* wyizolowany został z wirusa erythroblastozy kurzej AEV-H (*Avian Erythroblastosis Virus H*), który poza nowotworami związanymi z erythroblastami wywołuje także mięsaki pochodzenia fibroblastowego. Komórkowy odpowiednik tego onkogeny — *c-erb-B* okazał się być tożsamym z genem



Ryc. 4. Porównanie struktury protoonkogenu *c-erb-B-2* i onkogenu *erb-B-2*. AF — miejsca autofosforylacji (reszty Tyr), L — fragment wiążący ligand, poz. ozn. patrz ryc. 1. Wg [25] — uproszczone.

kodującym receptor EGF (a także, jak już wspomniano, TGF α). Porównanie sekwencji produktów *v-erb-B* i *c-erb-B* (Ryc. 4) wskazuje na przyczynę transformujących własności *v-erb-B*. W porównaniu z produktem protoonkogenu brak w nim praktycznie całej domeny odpowiedzialnej za wiązanie ligandu. Brak także jednego z miejsc autofosforylacji na C-końcu. Zmiany te powodują, że *v-erb-B* wykazuje konstytutywną, niezależną od ligandu aktywność kinazy [4, 24, 25, 26].

Przeprowadzona metodą ukierunkowanej mutagenyzy analiza wykazała, że dodatkowa delecja na C-końcu powoduje utratę zdolności do transformowania fibroblastów, przy zachowaniu potencjału onkogenego wobec erytroblastów. C-koniec receptora może więc mieć znaczenie w specyficznym tkankowo wiązaniu substratów [25]. Aktywacja *c-erb-B* może zająć również pod wpływem integracji wirusa ALV (*Avian Leukosis Virus*), wówczas także dochodzi do odcięcia fragmentu N-końcowego, przy niezmięnionej sekwencji C-końcowej. Tak zaktywowany onkogen transformuje jedynie erytroblasty, lecz dodatkowa mutacja na C-końcu może nadać mu zdolność transformowania fibroblastów. Potwierdza to sugerowaną rolę C-końca w rozpoznaniu substratu [25].

Udział genu *erb-B* w onkogenezie został stwierdzony również w pewnych nowotworach ludzkich. W odróżnieniu od poprzedniej sytuacji nie dochodzi tu jednak do jakichkolwiek mutacji w części kodującej białko, a jedynie do blisko pięćdziesięciokrotnej nadekspresji. Nowotwory te związane są z komórkami typu nabłonkowego (karcinoma) lub glejowego [25].

II-2.2 Receptor CSF-1 (*Colony Stimulating Factor 1*) — czynnika stymulującego wzrost kolonii 1. Onkogen *fms*

Wiele czynników wzrostowych bierze udział w regulacji procesów hemopoetycznych — proliferacji i różnicowania prekursorów komórek krwi. Wiele z nich określanych jest jako czynniki stymulujące wzrost kolonii — CSF (*Colony Stimulating Factor*).

CSF-1, zwany również M-CSF stymuluje prekursor linii granulocytarno-monocytarnej do różnicowania

się w kierunku monocytów (makrofagów). Jest mitogenem dla monocytów i ich prekursorów. Receptor CSF-1 jest kinazą tyrozynową klasy III [27].

Oczyszczenie receptora CSF-1 pozwoliło na stwierdzenie znaczącej homologii z produktem onkogenu *v-fms*, pochodzącego z wirusa kociego mięsaka FeSV (*Feline Sarcoma Virus*). Potwierdzają to liczne testy np. immunologiczne oraz testy z użyciem znakowanego CSF-1 [27]. W ten sposób stwierdzono, że komórkowym odpowiednikiem onkogenu *v-fms* — *c-fms* jest gen kodujący receptor CSF-1 [27]. W porównaniu z *c-fms*, który sam nie ma żadnych zdolności transformacji, *v-fms* wykazuje szereg zmian: delecję 50 aminokwasów na C-końcu i zastąpienie ich 11 innymi, a także 9 substytucji [28, 29]. Pierwotnym produktem translacji jest fuzja *gag-fms*, cięta proteolitycznie na białka *gag* i gp120^{*fms*}, glikozylowane następnie do gp140^{*fms*}, które lokalizowane jest w błonie [27]. Badania z użyciem konstruktów genetycznych, stanowiących różne fuzje genów *c-fms* i *v-fms* wykazały, że C-końcowa delecja wystarcza dla uzyskania słabo transformującego białka, dodatkowe dwie substytucje w obszarze domeny wiążącej ligand dają w pełni transformujący fenotyp onkogenu. Można więc sądzić, że delecja na C-końcu znosi regulację negatywną receptora, a mutacje w obrębie części zewnątrzkomórkowej (zakłócają one proces glikozylacji białka) symulują wiązanie ligandu [28, 29].

Odmienny mechanizm stwierdzono badając zdolność transformacji ludzkiego receptora CSF-1 (różni się on nieco od kociego, CSF-1 jest specyficzny gatunkowo). Pojedyncza mutacja w obrębie domeny wiążącej ligand powoduje, że produkt nabiera zdolności do transformacji komórek linii NIH 3T3. Dodatkowa substytucja na C-końcu zwiększa zdolność transformacji, lecz sama nie jest wystarczająca do jej wywołania. Wykluczony jest tu mechanizm autokryny, mysie i ludzki CSF-1 są różne i nie są rozpoznawane przez receptory innego gatunku. W przypadku ludzkiego *c-fms* pojedyncza mutacja może więc symulować wiązanie ligandu. Taki mechanizm sugeruje się dla niektórych białaczek ludzkich [30].

II-2.3 Onkogen *neu* (*c-erb-B-2*, HER-2)

W indukowanych chemicznym mutagenem (etylnitrozomocznikiem) nowotworach tkanki nerwowej (gleju) u szczurów zidentyfikowano onkogen nazwany *neu*, kodujący białko p185^{*neu*}, będące receptorową kinazą tyrozynową. Znalaziono komórkowy protoonkogen *c-neu*, dla produktu którego nie odnaleziono jednak do tej pory ligandu. Białko kodowane przez *c-neu* jest receptorową kinazą tyrozynową klasy I, wykazującą pewną homologię z receptorem EGF. Okazało się też, że sklonowane niezależnie protoonkogeny *c-erb-B-2* i HER-2 (z banku genów człowieka) są tym samym genem co *neu* [31].

Protoonkogen *c-neu* szczura nie ma własności transformujących, transformujący onkogen *neu* różni się od niego tylko jedną punktową mutacją T → A, powodującą substytucję waliny przez glutaminian w pozycji 664 [31]. Zaskakujący jest fakt, że pozycja ta lokalizuje

się w regionie transbłonowej alfa-helisy. Stwierdzono, że pojawienie się glutaminianu — aminokwasu polarnego — w miejsce waliny powoduje agregację receptorów w błonie, co aktywuje kinazę [32]. Tak więc mutacja symulująca wiązanie ligandu nie musi wcale zachodzić w domenie wiążącej ligand.

Stwierdzono także udział onkogeny *neu* w powstawaniu nowotworów u ludzi — głównie raka piersi [33]. Jest to bardzo niebezpieczny nowotwór o wysokiej śmiertelności. W nowotworach ludzkich *neu* nie jest zmutowany, zachodzi jedynie nadekspresja, wywołana amplifikacją genu *c-neu*. Istnieje korelacja pomiędzy stopniem amplifikacji *neu* a prognozą pacjenta — im większy stopień amplifikacji tym mniejsze szanse wyleczenia. Ludzki *c-neu* w odróżnieniu od szczurzego może więc transformować komórki w postaci niezmutowanej [33].

II-2.4 Receptor MGF (*Mast Cell Growth Factor*) — mastocytarnego czynnika wzrostowego. Onkogen *kit*, loci *W*, *Sl*

Onkogen *v-kit* wykryty został jako gen jednej z wielu odmian wirusa FeSV (patrz p. II-2.2). Jego komórkowy odpowiednik *c-kit* koduje receptorową kinazę tyrozynową klasy III. Produkt *v-kit* pozbawiony jest praktycznie całej N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej, co powoduje konstytutywną aktywację kinazy, niezależnie od obecności ligandu [34].

Niespodziewanie onkogen ten okazał się być związany z jednym z najdłużej badanych zaburzeń genetycznych u myszy. Już od lat dwudziestych znane były u myszy dwa wyraźnie związane funkcjonalnie loci: *W* (*White spotting*) i *Sl* (*Steel*). Mutacje w tych genach mają podobny efekt fenotypowy: w stanie homozygotycznym są letalne na skutek poważnych defektów hemopoezy w rozwoju wczesnozarodkowym, heterozygoty wykazują liczne objawy m.in. anemie (w tym makrocytarna), zakłócenia pigmentacji (ubarwienie), bezpłodność itp. Analizując możliwości odwrócenia fenotypu tych mutacji przy pomocy mikroprzeszczepów komórek szpiku stwierdzono, że mutacja *W* dotyczy komórek macierzystych (*stem cells*) różnicujących się w prekursorzy komórek krwi podczas gdy mutacja *Sl* objawia się w sąsiednich, nie podlegających dalszemu rozwojowi komórkach podścieliska (*stromal cells*) szpiku. Można więc było przypuszczać, że komórki podścieliska produkują jakiś czynnik (kodowany przez *Sl*) niezbędny do rozwoju komórkom macierzystym posiadającym produkt *W* [34—36].

Po izolacji genów *v-kit* oraz *c-kit*, okazało się, że locus *W* odpowiada *c-kit*. Ciężkie przypadki mutacji *W* odpowiadają delecji *c-kit*, lżejsze — mutacjom w jego obrębie [34]. Dobrym kandydatem w poszukiwaniach ligandu dla *c-kit* był produkt locus *Sl*. Ostatnie badania wykazały przy pomocy licznych metod biochemicznych, immunologicznych oraz genetycznych, że istotnie locus *Sl* odpowiada za produkcję czynnika wzrostowego będącego ligandem dla *c-kit* [34—37]. Mutacje *Sl* polegają na zakłóceniach w produkcji tego czynnika, mają więc fenotyp podobny jak mutacje *W* upośledzające jego receptor. Tak

zbadany czynnik wzrostowy nazwano MGF (*Mast Cell Growth Factor*) — mastocytarnym czynnikiem wzrostowym. Znany jest również pod nazwami *SLF* (*Steel Locus Factor*) i *kL* (*kit Ligand*). Uczestniczy on w wielu procesach, głównie hemopoetycznych. Jest podstawowym czynnikiem dla różnicowania się prekursorów w kierunku mastocytów. Współdziałając z innymi czynnikami hemopoetycznymi, jak G-CSF, GM-CSF czy interleukina 7 uczestniczy w rozwoju linii prowadzących do neutrofilii i monocytów. Bierze także udział w rozwoju komórek pigmentowych i gonad. Tak szeroki zakres działania MGF tłumaczy plejotropowy efekt mutacji *W* i *Sl* [34—37].

II-2.5 Onkogen *Xmrk*. Locus *Tu*

Niezwykle interesujący z wielu punktów widzenia jest układ odpowiadający za powstawanie czerniaka (melanoma) u ryb z rodzaju *Xiphophorus*. Znane są dwa bardzo do siebie zbliżone genetycznie (dają płodne potomstwo mieszańcowe) gatunki: *Xiphophorus maculatus* (zmienniczek, zwany przez akwarystów platką) oraz *Xiphophorus helleri* (mieczyk posiada wydłużoną dolną część płetwy ogonowej). Typowym ubarwieniem dzikich genotypowo ryb obu gatunków jest szarozielony kolor, widoczny jako wynik występowania w skórze komórek — tzw. mikromelanoforów. U niektórych szczepów *X. maculatus* występują jednak czarne plamy spowodowane obecnością makromelanoforów. O ich występowaniu decyduje dominujący gen *Tu*, mapujący się na chromosomie X (są też znane szczepy, u których występują analogiczne, lecz niealleliczne geny mapujące się na chromosomach X lub Y). Alleli tych nie stwierdzono nigdy u *X. helleri*.

Po skrzyżowaniu *X. maculatus* o fenotypie *Tu* z dzikim *X. helleri* potomstwo ma czarne plamy na skórze, lecz poza tym całe zapada na nowotwór skóry — czerniak. Stwierdzono, że gen *Tu* jest dominującym onkogenem, powodującym zmiany zabarwienia skóry oraz czerniaka. U *X. maculatus* występuje dodatkowo supresor onkogenezy (anty-onkogen) *r*, który jest recesywnym genem autosomalnym. *X. helleri* nie ma alleli *Tu*, ani *r*, stąd potomstwo hybrydowe zapada na czerniaka. Wykonując krzyżówki wsteczne testowe samicy *X. maculatus* *Tu* z samcem *X. helleri*, stwierdzono, że przy obecności allelu *Tu* i jednego tylko allelu *r* tworzy się nowotwór łagodny, przy braku obu alleli *r* — nowotwór złośliwy. Schematy krzyżówek przedstawiono poniżej:

1) P: *Tu/Tu*, *r/r* x *+/+*, *+/+* (+ oznacza brak allelu *Tu* czy *r*)

F1: *Tu/+*, *r/+* — osobniki z łagodną formą czerniaka

2) P: *Tu/+*, *r/+* x *+/+*, *+/+*

F1: *Tu/+*, *+/+* — złośliwy czerniak (przedstawiono tylko 1/4 genotypów F1, 1/2 nie otrzyma allelu *Tu*, 1/4 ma genotyp jak samica P).

Następnie przeprowadzono analizę polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (RFLP) sprzężonych z

locus Tu. Znalaziono marker wykazujący pełne sprzężenie z allelem Tu i przyjęto, że jest on z nim tożsamy. Wykorzystując go jako sondę dla kolejnych analiz stwierdzono, że poza fragmentem związanym tylko i wyłącznie z allelem Tu (brak go u osobników +/+) istnieje drugi fragment homologiczny, obecny w genomie wszystkich, bez wyjątku ryb z rodzaju *Xiphophorus*. Odkryty w ten sposób *locus* nazwano INV, jest on zlokalizowany autosomalnie. Następnie sklonowano geny Tu oraz INV, okazało się, że kodują one receptorową kinazę tyrozynową klasy I. Normalnie ekspresja tej kinazy zachodzi tylko w najwcześniejszych etapach rozwoju (z *locus* INV), później nie jest produkowana.

Dane te pozwalają na wysnucie następującej hipotezy: u wszystkich ryb z rodzaju *Xiphophorus* funkcjonuje receptorowa kinaza tyrozynowa odgrywająca jakąś rolę we wczesnych fazach rozwoju. Jest ona kodowana przez *locus* INV. U *X. maculatus* w niektórych szczepach doszło do translokacji tego genu do obszaru odpowiadającego za pigmentację, położonego na chromosomie X. Dochodzi więc tam do nienormalnej jej ekspresji w komórkach skóry co prowadzi do zakłóceń pigmentacji. Wiąże się to również z potencjałem onkogennym, z tym że u *X. maculatus* jest on zahamowany przez allel *r*, ujawnia się przy braku tego allelu u hybryd. Tak opisany onkogen nazwano *Xmrk* (*Xiphophorus melanoma receptor kinase*). Nie jest znany ligand tego receptora ani jego właściwa rola. Nic też nie wiadomo o funkcjonowaniu antyonkogenu *r*. Układ ten dopiero zaczyna być przedmiotem intensywnych badań ze strony biologii molekularnej, po tym jak klasyczna genetyka pozwoliła na jego odkrycie i opisanie. Badania nad onkogenem *Xmrk* podsumowane są w pracy [38].

II-2.6 Czynniki wzrostowe komórek nerwowych (neurotrofiny): NGF (*Nerve Growth Factor*) — czynnik wzrostu nerwu, BDGF (*Brain Derived Growth Factor*) — czynnik wzrostowy pochodzenia mózgowego, neurotrofiny 3, 4. Rodzina onkogenów *trk*

Tkanka mózgową jest źródłem kilku różnych peptydów wykazujących aktywność mitogenną wobec niektórych komórek (np. komórki gleju) oraz stymulujących wzrost i przeżywanie neuronów (jak wiadomo dojrzałe neurony *in vivo* nie dzielą się) [8, 39, 40, 41]. Wśród tych czynników, od zdolności stymulowania wzrostu i przeżywania neuronów nazwanych neurotrofinami, omówionych m.in. w pracach [8, 9] wspomniane zostały te, których receptory są produktami znanych protoonkogenów.

Rodzina onkogenów *trk* obejmuje szereg transformujących alleli (nazywanych *trk*, *trkA*, *trkB*, *trkC* itd.) kilku genów wyizolowanych z pewnych nowotworów okrężnicy oraz tarczycy [39]. Są to bardzo do siebie zbliżone geny, których produkty są receptorowymi kinazami tyrozynowymi. Ich nietransformujące odpowiedniki — protoonkogeny — ulegają ekspresji praktycznie wyłącznie w komórkach tkanki nerwowej.

Ostatnio prowadzone badania wykazały, że receptory kodowane przez gen *trk* są składnikiem, być może głównym, receptora wiążącego z dużym powinowactwem NGF. Stwierdzono też, że związane NGF indukuje aktywność kinazową tych białek. Wynika z tego, że przynajmniej początkowy fragment drogi odpowiedzi na NGF przypomina odpowiedź na typowe czynniki wzrostowe [39]. Dalsze etapy tej drogi mogą jednak być inne.

Najnowsze doniesienia [40, 41] mówią, że *trkB* koduje receptor uczestniczący w odpowiedzi na BDNF [9], oraz neurotrofiny 3 i 4, lecz nie na NGF. Wiadomo też, że w procesie tym nie musi uczestniczyć drugi, postulowany element odpowiedzi na omawiane czynniki wzrostowe, znany jako receptor o niskim powinowactwie. Ekspresja *trkB* w liniach pochodzenia fibroblastowego wystarcza do uzyskania w nich mitogennej odpowiedzi na neurotrofiny. Badania te mogą przyczynić się do poznania mechanizmów działania czynników wzrostowych w rozwoju i funkcjonowaniu tkanki nerwowej.

* * *

Podziękowanie:

Autorzy dziękują Wojtkowi Wilkowi za wykreślenie rycin.

Artykuł otrzymano 23 lipca 1991 r.
Zaakceptowano do druku 10 grudnia 1991 r.

Piśmiennictwo

1. Klein A., (1987), *Post Biochem* 33: 125—150.
2. Inglot A. D., (1987), *Post Biochem* 33: 151—164.
3. Popik W., (1987), *Post Biochem* 33: 165—181.
4. Kosz-Vnenchak M., Kawecka M., Magielska-Zero D., (1987), *Post Biochem* 33: 183—198.
5. Klein A., (1987), *Post Biochem* 33: 199—201.
6. Kaczmarek L., (1987), *Post Biochem* 33: 425—432.
7. Jagła K., Domaniewski J., (1987), *Post Biochem* 33: 433—450.
8. Sieroń A., Lewin-Kowalik J., (1988), *Post Biochem* 34: 173—182.
9. Farbiszewski R., (1988), *Post Biochem* 34: 261—267.
10. Pietrzykowski Z., (1987), *Post Biochem* 33: 501—514.
11. Kwiatkowska J., (1988), *Post Biochem* 34: 123—130.
12. Kamińska B., (1989), *Post Biochem* 35: 219—230.
13. Czyski J. A., Narczewska B., (1987), *Post Biochem* 33: 515—531.
14. Ulrich A., Schlessinger J., (1990), *Cell* 61: 203—212.
15. Cantley L. C., Auger K. R., Carpenter C., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R., Soltoff S., (1991), *Cell* 64: 281—302.
16. Cross M., Dexter T. M., (1991), *Cell* 64: 271—280.
17. Otsu M., Hiles I., Gout I., Fry M. J., Ruiz-Larrea F., Panayotou G., Thompson A., Dhand R., Hsuan J., Totty N., Smith A. D., Morgan S. J., Courtneidge S. J., Parker P. J., Waterfield M. D., (1991), *Cell* 65: 91—104.
18. Escobedo J. A., Navankasattusas S., Kavanaugh W. M., Milfay D., Fried V. A., Williams L. T., (1991), *Cell* 65: 75—82.
19. Skolnik E. Y., Margolis B., Mohammadi M., Lowenstein E., Fisher R., Drepps A., Ullrich A., Schlessinger J., (1991), *Cell* 65: 83—90.
20. Weiss R., (1983) *Nature* 304: 12.
21. Waterfield M. D., Scrace G. T., Whittle N., Strobant P., Johnsson A., Wasteson A., Westermark B., Heldin C. H., Huang J. S., Deuel T. F., (1983) *Nature* 304: 35—39.

22. Delli Bovi P., Curatola A. M., Kerm F. G., Greco A., Ittmann M., Basilico C., (1987), *Cell* **50**: 729—737.
23. Pain B., Woods T. M., Saez J., Flickinger T., Raines M., Peyrol S., Moscovici C., Moscovici M. G., Kung H. J., Jurdic P., Lazarides E., Samarut J., (1991), *Cell* **65**: 37—46.
24. Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scraze G., Totty N., Stockwell P., Ullrich A., Schlessinger J., Waterfield M. D., (1984) *Nature* **307**: 521—526.
25. Hayman M. J., (1986), *Trends Genet* **2**: 260—262.
26. Newmark P., (1984) *Nature* **307**: 499.
27. Sherr C. J., Rettenmier C. W., Sacca R., Roussel M. F., Look A. T., Stanley E. R., (1985) *Cell* **41**: 665—676.
28. Roussel M. F., Dull T. J., Rettenmier C. W., Ralph P., Ullrich A., Sherr C. J., (1987) *Nature* **325**: 549—552.
29. Woolford J., McAuliffe A., Rohrschneider L. R., (1988) *Cell* **55**: 965—977.
30. Roussel M. F., Downing J. R., Rettenmier C. W., Sherr C. J., (1988), *Cell* **55**: 979—988.
31. Sefton M. (1988), *Trends Genet* **4**: 247.
32. Weiner D. B., Liu J., Cohen J. A., Williams W. V., Greene M. I., (1989), *Nature* **339**: 230—231.
33. Slamon D. J., Godolphin W., Jones L. A., Holt J. A., Wong S. G., Keith D. E., Levin W. J., Stuart S. G., Udove J., Ullrich A., Press M. F., (1989), *Science* **244**: 707—712.
34. Witte O. N., (1990), *Cell* **63**: 5—6.
35. Williams D. E., Eisenmann J., Baird A., Rauch C., Van Ness K., Burgess G. S., Cosman D., Lyman S. D., (1990), *Cell* **63**: 167—174.
36. Copeland N. G., Gilbert D. J., Cho B. J., Donovan P. J., Jenkins N. A., Cosman D., Anderson D., Luman S. D., Williams D. E., (1990), *Cell* **63**: 185—194.
37. Flanagan J. G., Leder P., (1990), *Cell* **63**: 185—194.
38. Wittbrodt J., Adam D., Malitschek B., Maueler W., Raulf F., Telling A., Robertson S. M., Schartl M., (1989), *Nature* **341**: 415—421.
39. Klein R., Jing S., Nanduri V., O'Rourke E., Barbacid M., (1991), *Cell* **65**: 189—197.
40. Klein R., Nanduri V., Shuqian J., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K. R., Reichardt L. F., Barbacid M., (1991), *Cell* **66**: 396—403.
41. Glass D. J., Nye S. H., Hantzopoulos P., Macchi M. J., Squinto S. P., Goldfarb M., Yancopoulos G. D., (1991), *Cell* **66**: 405—413.
42. Bottaro D. P., Rubin J. S., Faletto D. L., Chan A. M., Kmiecik T. E., Vande-Woude G. F., Aaronson S. A., (1991), *Science* **251**: 802—804.
43. Naldini L., Vigna E., Ferracini R., Longati P., Gandino L., Prat M., Comoglio P. M., (1991), *Mol Cell Biol* **11**(4): 1793—1803.
44. Smith D. R., Vogt P. K., Hayman M. J., (1989), *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (14): 5291—5295.
45. Chen J. M., Heller D., Poon B., Kang L., Wang L. H., (1991), *Oncogene* **6**(2): 257—264.
46. Takahashi M., Buma Y., Iwamoto T., Inaguma Y., Ikeda H., Hiai H., (1988), *Oncogene* **3**(5): 571—578.
47. Zhan X., Bates B., Hu X. G., Goldfarb M., (1988), *Mol Cell Biol* **8**(8): 3487—3495.
48. Adnane J., Gaudray P., Dionne C. A., Crumley G., Jaye M., Schlessinger J., Jeanteur P., Birnbaum D., Theillet C., (1991), *Oncogene* **6**(4): 659—663.
49. Ben-Neriah Y., Bauskin A. R., (1988), *Nature* **333**: 672—676.
50. Kraus M. h., Issing W., Miki T., Popescu N. C., Aaronson S. A., (1989), *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(23): 9193—9197.
51. Pasquale E. B., (1990), *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(15): 5812—5816.
52. Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikeda T., Tojo A., Matsushime H., Sato M., (1990), *Oncogene* **5**(4): 519—524.
53. Shibuya M., Matsushime H., Yamane A., Ikeda T., Yoshida M. C., Tojo A., (1989), *Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res Fund* **20**: 103—110.

Jądrowe receptory jako czynniki regulujące transkrypcję

Nuclear receptors as transcription factors

WANDA SOKÓŁ-MISIAK¹

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Eksperymentalna weryfikacja hipotezy, zakładającej, że jądrowe receptory są białkami regulującymi transkrypcję
- III. Znaczenie poszczególnych regionów receptora w procesie indukowania transkrypcji
 - III-1. Domena wiążąca hormon wyznacza moment rozpoczęcia przez receptor aktywności aktywacyjnej lub represyjnej
 - III-2. Poszczególne elementy „palców cynkowych” receptorów jądrowych warunkują prawidłowe rozpoznanie regulatorowych sekwencji DNA
 - III-3. Aktywność domen transaktywacyjnych receptora jest zależna od rodzaju komórek i hipotetycznych białek, produkowanych przez te komórki
- IV. Jądrowe receptory i jądrowe białka FOS i JUN jako selektywne przełączniki indukcji i wygaszania transkrypcji genów w procesie proliferacji i różnicowania się komórek
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Experimental verification of the hypothesis, that nuclear receptor's are the transcription factors
- III. Importance of the particular receptor regions in the transcription inducing process
 - III-1. Hormon binding domain determines the beginning of receptor's activating of repressive action
 - III-2. Particular elements of the „zinc fingers” of nuclear receptor's determine proper recognition of DNA regulator sequences
 - III-3. Activity of receptor's dispersed transactivating domains is dependent on the kind of cells considered and kind of proteins produced by these cells
- IV. Nuclear receptor's, and nuclear FOS and JUN proteins as selective activation/suppression transcription switches in the cell proliferation and differentiation programme
- V. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów:

GR — receptor glukokortykoidów; ER — receptor estradiolu; TR — receptor tyroksyny, homolog białkowego

¹ dr, Zakład Biologii Molekularnej IGHZ PAN, Jastrzębiec, 05-551 Mroków

produktu protoonkogenu *c-erbA*; *V-erbA* — białkowy produkt onkogenu *v-erbA*, homolog białka *C-erbA* które utraciło zdolność do wiązania tyroksyny; RAR — receptor kwasu retinowego; HSP90 — białko szoku cieplnego tworzące kompleks z aporeceptorami hormonów sterydowych; HRE — regulatorowe sekwencje DNA wiążące receptory jądrowe; GRE — regulatorowe sekwencje DNA wiążące receptor glukokortykoidów, progesteronu, androgeny; PRE — GRE — regulatorowe sekwencje DNA wiążące receptor progesteronu; ERE — regulatorowe sekwencje DNA wiążące receptor estradiolu; TRE — regulatorowe sekwencje DNA wiążące receptor tyroksyny, kwasu retinowego i *V-erbA*; MRE — regulatorowe sekwencje DNA wiążące regulatorowe białka, aktywowane pośrednio za pomocą przekaźników „wtórnego obiegu”, sygnałów odbieranych przez receptory powierzchniowych błon komórkowych; PHA-RE — regulatorowe sekwencje DNA typu MRE, wiążące regulatorowe białka aktywowane za pomocą przekaźników „wtórnego obiegu”, szlakiem kinazy C; Kinaza C — kinaza białkowa C zależna od fosfolipazy C sprzężonej z receptorami błon komórkowych, aktywowana przez wtórny przekaźnik DAG lub estry forbolu; DAG — dwuacyloglicerol, jeden z produktów degradacji fosfolipidów inozitolowych powstających pod wpływem swoistej fosfolipazy C; cAMP-RE(CRE) — regulatorowe sekwencje DNA wiążące regulatorowe białka aktywowane za pomocą przekaźników „wtórnego obiegu” szlakiem kinazy A; Kinaza A — białkowa kinaza A aktywowana przez cAMP; JUN - białkowy produkt protoonkogenu *c-jun*, wiązany przez regulatorowe sekwencje typu PHA-RE; FOS — białkowy produkt protoonkogenu *c-fos*, wiązany w postaci heterodimeru JUN-FOS przez sekwencje typu PHA-RE; Wektor *cis* — ekspresyjny wektor do badania w eukariotycznych komórkach aktywności sekwencji regulatorowych DNA (aktywności-*cis*) w procesie regulacji transkrypcji genu zakodowanego w tym wektorze; wektor *trans* — ekspresyjny wektor do badań aktywności regulatorowego białka (aktywności — *trans*) zakodowanego w tym wektorze.

I. Wprowadzenie

Od lat znane jest zjawisko uruchamiania w komórkach organizmów wyższych całej serii wydarzeń przez krótkotrwały pozakomórkowy sygnał, którego efektem jest podział komórek, ich różnicowanie lub wręcz zamieranie. To intrygujące zjawisko pobudzało umysły wielu badaczy do tworzenia hipotez, mających wyjaśnić jego molekularny mechanizm. W przypadku sygnałów, jakimi są hormony sterydowe, te przedwczesne hipotezy utrwaliły fałszywy, lecz przekonujący w swej prostocie obraz mechanizmu przekazywania tego typu sygnałów do układu transkrypcyjnego określonych genów [1]. Podobnie jak białko regulujące transkrypcję genów Prokaryota białkowy receptor hormonów sterydowych miał powodować rozdysocjowanie dwóch nici DNA w regionie rdzenia promotora danego genu umożliwiając tworzenie kompleksu: polimeraza RNA II-rdzeń promotora.

Rozwój technik badawczych umożliwił w latach osiemdziesiątych i identyfikację i lokalizację (odległość od rdzenia promotora genu) regulatorowych sekwencji DNA wzmacniających transkrypcję [2, 3]. Zidentyfikowano dwie niezwykle istotne grupy sekwencji wzmacniających transkrypcję eukariotycznych genów kodujących białka.

Pierwsza grupa, to dobrze scharakteryzowane sekwencje wzmacniające wiążące receptory jądrowe do których należą receptory hormonów sterydowych*

oraz receptory innych lipofilnych związków (tyroksyny, kwasu retinowego, witaminy D). Sekwencje te określono ogólną nazwą HRE (od ang. *hormone responsive element*). Stwierdzono, iż w przypadku różnych genów — których ekspresja kontrolowana jest przez hormony — sekwencje HER położone są w odległości od stu do kilkunastu tysięcy par zasad od miejsca startu transkrypcji. Zastosowanie nowych technik badawczych (sekwencjonowanie DNA, mutageniza DNA *in vitro*, *protection assay*) pozwoliło na ustalenie konsensusowych sekwencji wzmacniających HRE [2], które wiążą:

- a) receptor glukokortykoidów, progesteronu i androgeny (sekwencje GRE, od ang. *glukokortykoid responsive element*; consensus: 5'-AG^oACAnnnTGT^oCT^o-3'; w przypadku wiązania PR nazywane PRE)
- b) receptor estradiolu (sekwencje ERE od ang. *estradiol responsive element*; consensus: 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3')
- c) receptor tyroksyny, kwasu retinowego, witaminy D (sekwencje TRE od ang. *tyroxine responsive element*; consensus: 5'AGGTCATGACCT-3').

Wprowadzenie syntetycznych, konsensusowych sekwencji GRE, ERE, TRE lub ich naturalnych odpowiedników przed rdzeń eukariotycznego promotora genu niewrażliwego na działanie glukokortykoidów, estradiolu lub tyroksyny uwrażliwia ekspresję tego genu na działanie pozakomórkowego sygnału w postaci wymienionych hormonów.

Druga grupa sekwencji wzmacniających to sekwencje nazywane ogólnie MRE, (od ang. *second messenger responsive element*). Sekwencje MRE wiążące różnorodne białka, które dobierają informacje przekazywane — za pomocą przekaźników „wtórnego obiegu” — przez receptory polipeptydowych związków sygnałowych typu czynniki wzrostu, cytokiny. Zlokalizowane w błonach komórkowych receptory — po odebraniu odpowiedniego sygnału — uruchamiają łańcuch reakcji prowadzących między innymi do aktywacji kinazy C lub kinazy A. Gdy przepływ informacji jest zależny od aktywacji (przez wtórny przekaźnik DAG lub estry forbolu) kinazy C, modulowana jest transkrypcja genów posiadających sekwencje PHA-RE (od ang. *phorbol responsive element*). Sekwencje PHA-RE wiążą między innymi dobrze scharakteryzowane białka regulatorowe JUN-FOS.

Sekwencje HRE i MRE regulują transkrypcję różnych lub tych samych genów. W przypadku genów prolaktyny i proliferyny stwierdzono, iż sekwencje GRE i MRE nakładają się na siebie; w konsekwencji transkrypcja tych genów, indukowana przez sygnały typu czynnik wzrostu, może być wygaszana przez inne sygnały, typu hormon sterydowy.

Molekularny mechanizm regulowania transkrypcji przez sekwencje wzmacniające nie jest dotychczas wyjaśniony. Przyjęty jest pogląd, iż wzmacniające

* Zagadnienie to zostało przedstawione w artykule „Sekwencje DNA niezbędne dla regulacji transkrypcji przez hormony glukokortykoidowe w komórkach eukariotycznych” W. Sokół-Misiak na łamach *Post. Biochem.*, 31 (1985), 593—599.

sekwencje oraz wiązane przez nie białka regulatorowe powoduje stabilizację kompleksu inicjującego transkrypcję danego genu [3].

Receptory jądrowe są obecnie najlepiej scharakteryzowanymi białkami regulującymi transkrypcję. Białka te mogą również oddziaływać na procesory posttranskrypcyjne lub posttranslacyjne. Rozwój technik, które umożliwiły testowanie działalności receptorów jądrowych na poziomie transkrypcji oraz ustalenie struktury i funkcji poszczególnych regionów tych białek jest osiągnięciem badań prowadzonych w latach 80-tych [4—8].

II. Eksperymentalna weryfikacja hipotezy, iż jądrowe receptory są białkami regulującymi transkrypcję.

Wykazanie, iż receptory jądrowe, w tym receptory hormonów sterydowych, są białkami regulatorowymi możliwe było dzięki rozwojowi następujących technik: 1. technik mutagenyzy DNA *in vitro** dotyczących wprowadzenia zaprogramowanych zmian w obrębie sekwencji regulatorowych (mutacje typu *cis*) lub w obrębie sekwencji kodujących białka regulatorowe (mutacje typu *trans*).

2. technik szybkiego testowania aktywności-*cis* naturalnych lub syntetycznych sekwencji regulatorowych oraz aktywności-*trans* białkowych produktów genów kodujących białka regulatorowe w eukariotycznych komórkach transfekowanych odpowiednimi wektorami ekspresyjnymi typu *cis* i *trans* [4].

Zastosowanie tych technik umożliwiło precyzyjne powiązanie zmian w budowie regulatorowych sekwencji HRE oraz produktów ekspresji genów kodujących białka receptorów jądrowych ze zmianami w ich funkcji.

Eukariotyczne wektory ekspresyjne stosowane generalnie do badań aktywności-*cis* sekwencji regulatorowych** — nazywane ogólnie wektorami *cis* [4] — są to plazmidy zawierające następujące fragmenty prokariotycznego i eukariotycznego DNA: 1. prokariotyczne sekwencje DNA umożliwiające replikację plazmidowego wektora w komórkach bakteryjnych i klonowanie wektora; 2. miejsce restrykcyjne do wprowadzenia badanego eukariotycznego promotora lub słaby eukariotyczny promotor i miejsce restrykcyjne do wprowadzania sekwencji wzmacniających (np. HRE); 3. sekwencje kodujące kontrolny gen, którym jest

* Ogólna charakterystyka technik mutagenyzy została przedstawiona w artykule „Mutagenyza DNA *in vitro*” M. Mejnartowicz W.J. Krzyżosiaka na łamach *Post. Biochem.*, 36, (1990), 5—16.

** Powiązanie zmian w budowie syntetycznych sekwencji GRE z utratą ich funkcji jako wzmacniaczy transkrypcji zostało przedstawione w reprimie „Introduction of the glucocorticoid binding sequences into the expression vector pΔSVE-CAT and its effect on the CAT gene expression in mammalian cells” W. Sokół-Misiak, W.T. Markiewicz, B. Szydłowska, A. Patrenko, *Acta Polonica Biochimica* (1991) in press.

najczęściej gen bakteryjny kodujący acetylotransferazę chloramfenikolową (CAT), enzym nie występujący w komórkach ssaków; 4. eukariotyczne sekwencje DNA kontrolujące wycinanie intronów oraz terminację transkrypcji genu kontrolnego (Ryc. 1A).

Wprowadzenie do wektora typu *cis* sekwencji wzmacniających (np. GRE) zwiększą intensywność transkrypcji genu CAT w komórkach transfekowanych tym wektorem pod warunkiem, iż w transfekowanych komórkach znajdują się białka regulatorowe rozpoznające te sekwencje.

Wykazanie, iż istotnie dane białko regulatorowe (np. receptor glukokortykoidów) wpływa na transkrypcję genu CAT w wektorze *cis* (zawierającym sekwencje GRE) wymaga zastosowania dodatkowego wektora ekspresyjnego, nazywanego [4] wektorem *trans*. Wektor *trans* (Ryc. 1B) posiada analogiczny fragment DNA bakteryjnego jak wektor *cis*, silny eukariotyczny promotor, eukariotyczne sekwencje warunkujące terminację transkrypcji oraz miejsce restrykcyjne do wprowadzenia naturalnych lub syntetycznych sekwencji kodujących białko regulatorowe lub jego mutanty. Wprowadzenie do wektora *trans* sekwencji kodujących białko danego receptora jądrowego umożliwia syntezę tego białka lub jego mutantów w komórkach ubogich w dany receptor [9—19]. W przypadku najwcześniejszych badań udawadniających, iż receptor glukokortykoidów jest białkiem regulującym transkrypcję, do transfekcji najczęściej używano małpie komórki COS-7 lub ich macierzyste komórki CV-1.

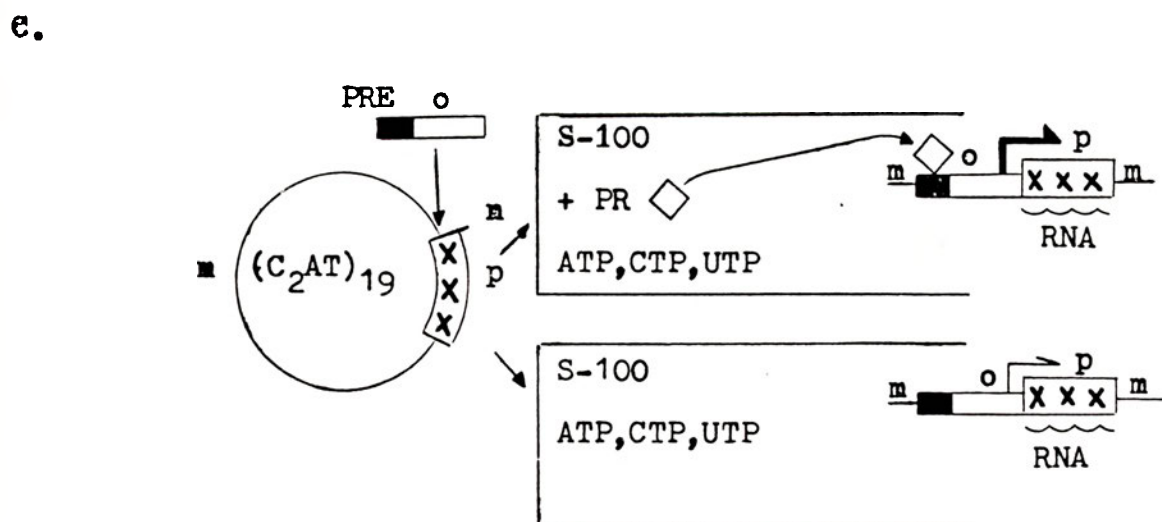
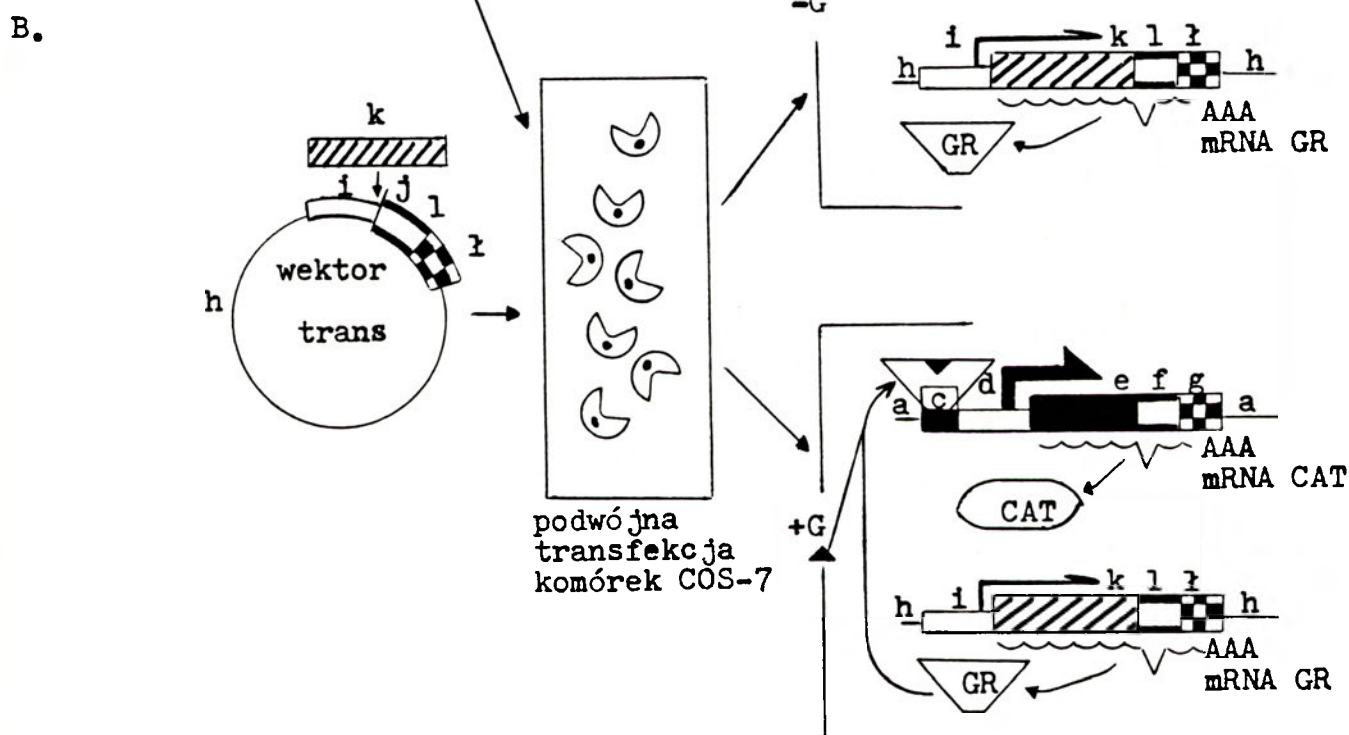
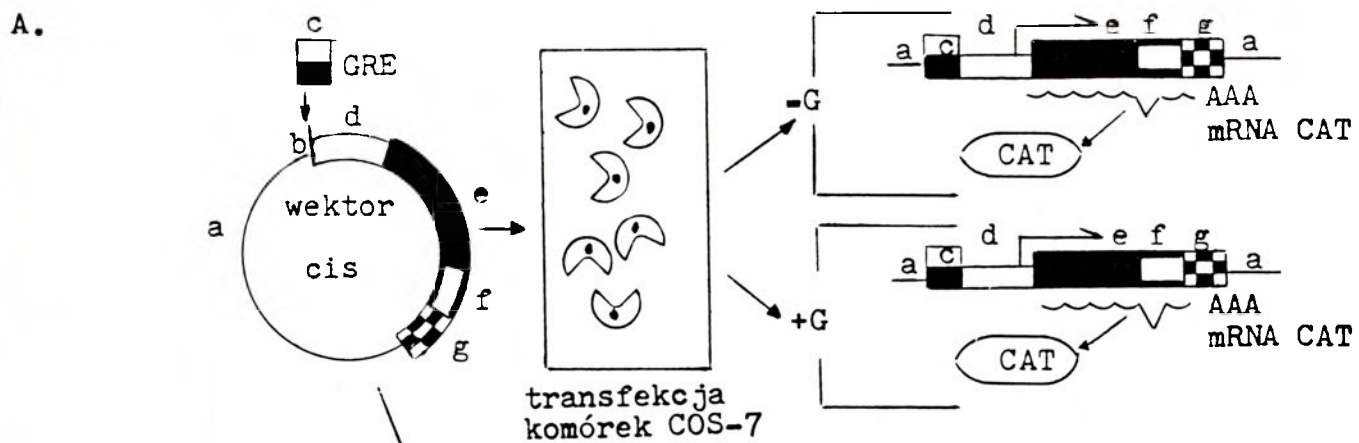
Komórki COS-7 są swoiście odporne na działanie glukokortykoidów, ponieważ nie posiadają własnego,

Ryc. 1. Testowanie aktywności-*trans* receptorów jądrowych w komórkach ssaków (A, B) lub w ekstraktach z jąder komórkowych (C).

A — ekspresyjny wektor typu *cis*: a — prokariotyczne sekwencje DNA umożliwiające klonowanie wektora, b — miejsce restrykcyjne do wprowadzenia sekwencji wzmacniających (GRE), c — sekwencje wzmacniające (GRE), d — eukariotyczne sekwencje promotorowe, e — sekwencje kodujące kontrolny gen CAT, f, g — eukariotyczne sekwencje DNA regulujące skalanie i terminację transkrypcji. Wprowadzenie sekwencji GRE do ekspresyjnego wektora *cis* nie zmienia intensywności przejściowej transkrypcji genu CAT w transfekowanych tym wektorem komórkach COS, ubogich w receptor glukokortykoidów.

B — ekspresyjny wektor typu *trans*: h — prokariotyczne sekwencje DNA, i — silny promotor eukariotyczny, j — miejsce restrykcyjne do wprowadzenia sekwencji kodujących eukariotyczne białko regulatorowe (cDNA receptora glukokortykoidów), l, l' — eukariotyczne sekwencje DNA regulujące skalanie i terminację transkrypcji. Wprowadzenie sekwencji cDNA(GR) kodujących receptor glukokortykoidów do wektora *trans* oraz transfekacja tym wektorem komórek COS (transfekowanych jednocześnie wektorem *cis* zawierającym sekwencje GRE) powoduje wzrost intensywności transkrypcji genu CAT w komórkach COS hodowanych w obecności glukokortykoidu (G).

C — wektor (C₂AT)₁₉ do testowania aktywności-*cis* sekwencji regulatorowych i aktywności-*trans* białek regulatorowych w ekstraktach białek z jąder komórkowych: m — prokariotyczne sekwencje DNA, n — miejsce restrykcyjne do wprowadzenia badanych sekwencji regulatorowych, o — sekwencje regulatorowe (promotor + sekwencje PRE), p — matryca pozbawiona nukleotydów G (G-free cassette). Miejsce inicjacji transkrypcji może być zaprogramowane w obrębie G-free cassette [22]. Transkrypcja syntetycznej matrycy (G-free cassette) zachodząca w obecności trzech prekursorów RNA (ATP, CTP i UTP) i jest wzmacniana w przypadku wprowadzenia sekwencji PRE do promotora oraz oczyszczonego receptora PR do frakcji S-100, pochodzącej z komórek ubogich w PR. Miejsce startu, kierunek i intensywność transkrypcji zaznaczono strzałką różnej grubości



funkcjonalnie czynnego receptora tego hormonu. Kiedy komórki te transfekowano jedynie wektorem *cis* posiadającym sekwencje GRE, obecność glukokortykoidów w pożywce hodowlanej nie wpływała na transkrypcję genu CAT. Jedynie w przypadku wprowadzenia do komórek wektora *cis* (posiadającego sekwencje GRE) i wektora *trans* (posiadającego sekwencje kodujące receptor glukokortykoidów), obecność glukokortykoidów w pożywce hodowlanej wpływa na transkrypcję genu CAT w wektorze *cis* (Rys. 1A i B).

Odmiennej rodzaj plazmidowych wektorów umożliwia testowanie aktywności-*cis* sekwencji regulatorowych genów ulegających ekspresji jedynie w określonych tkankach oraz aktywności-*trans* białek pochodzących z jąder komórkowych tych tkanek. Najwcześniej skonstruowany wektor p(C₂AT)₁₉ (Ryc. 1C) zawiera jedynie dwa fragmenty DNA: 1. prokariotyczne sekwencje (analogiczne jak w wektorze *cis* i *trans*) 2. syntetyczną matrycę DNA, która jest pozbawiona nukleotydów G. Badany promotor bez lub z sekwencjami wzmacniającymi (np. PRE i GRE) wprowadzony jest przed syntetyczną matrycę (*G-free cassette*). Aktywność-*trans* receptora jądrowego oceniana jest na podstawie intensywności transkrypcji matrycy w obecności ekstraktów z jąder komórkowych (frakcja S-100 lub zestaw bardziej oczyszczonych frakcji) tkanek bogatych lub ubogich w receptor jądrowy (Ryc. 1C). Testowanie aktywności-*trans* receptorów jądrowych w opisanym układzie bezkomórkowym, podjęte były w wielu pracowniach [20—23]. Jednak, jak podkreślają autorzy [22, 23] nawet częściowo oczyszczone receptory hormonów sterydowych tracą zdolność do wiązania hormonu; natomiast uzyskują zdolność do interakcji z DNA w formie aporeceptora.

Zastosowanie różnych technik mutagenyzy pozwoliło na określenie znaczenia poszczególnych regionów receptorów jądrowych w procesie regulacji transkrypcji. Usuwając w obrębie cDNA danego receptora sekwencje kodujące poszczególne regiony tego białka

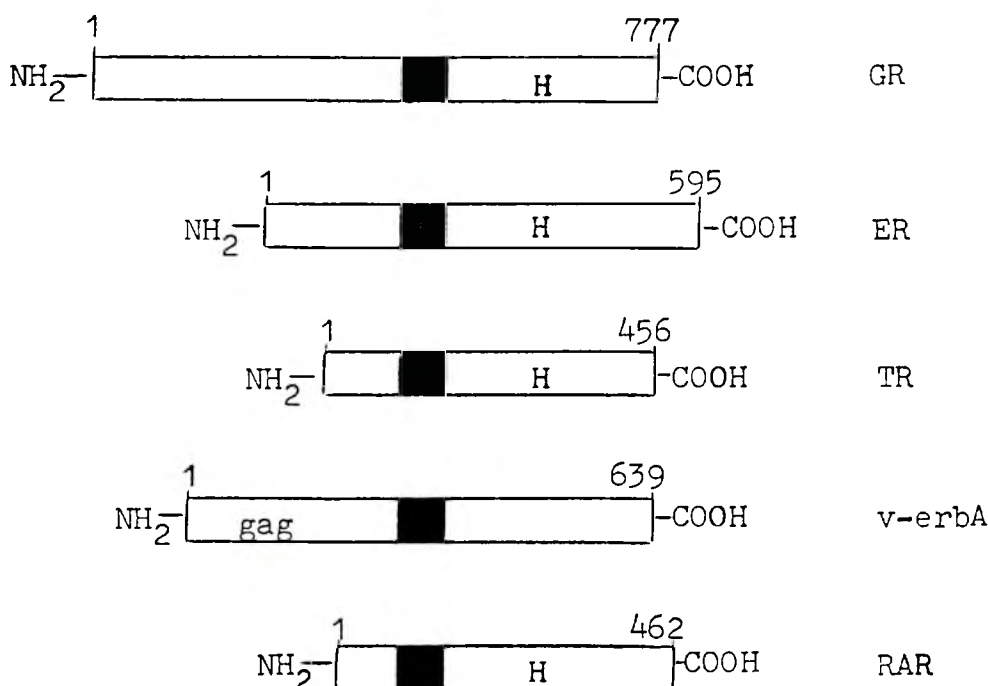
zlokalizowano trzy podstawowe domeny odpowiadające: 1. za wiązanie hormonu; 2. za rozpoznawanie specyficznych sekwencji DNA; 3. za aktywację transkrypcji (Ryc. 3, 4). Stosując metodę wymiany domen wykazano autonomiczny charakter poszczególnych domen receptora.

III. Znaczenie poszczególnych regionów receptora w procesie indukowania transkrypcji

III-1. Domena wiążąca hormon wyznacza moment rozpoczęcia przez receptor działalności aktywacyjnej lub represyjnej

Efekt działania hormonu na intensywność transkrypcji jest bardzo szybki i nie wymaga dodatkowej syntezy białek receptorowych. Białka receptorowe hormonów sterydowych są gromadzone w komórce w formie nieaktywnej jako kompleks z białkiem szoku cieplnego HSP90* [24—27]. Według ostatnich danych Yamamoto [26] białko HSP90, które jest wiązane przez rdzeń domeny wiążącej hormon (Ryc. 3A), współuczestniczy w przyjęciu sygnału hormonalnego przez receptor glukokortykoidów. Autorzy niewykluczają, iż w procesie tym mogą uczestniczyć jeszcze inne białka. Związanie hormonu przez kompleks receptor-HSP90 rozpoczyna serię słabo zdefiniowanych wydarzeń, określonych wcześniej jako transformację receptora [8]. Po związaniu hormonu następuje oddysocjowanie białka HSP90 i fosforylacja receptora [28—30]. Przepuszczalna zmiana konformacji białka umożliwia jego interakcję ze specyficznymi sekwencjami DNA oraz innymi białkami, a przede wszystkim

* Znaczenie białek HSP90 zostało omówione w artykule „Rola białek szoku termicznego” B.Lipińskiej na łamach *Post. Biochem.*, 36, (1990), 32—42.



Ryc. 2. Schemat budowy receptorów jądrowych wiążących glukokortykoidy (GR), estradiol (ER), tyroksynę (TR), kwas retinowy (RAR). Region receptorów wiążących hormon oznaczono literą H, region rozpoznający specyficzne sekwencje DNA zaznaczono przez zaznaczenie. Liczby oznaczające pierwszy i ostatni aminokwas każdego receptora, v-erbA jest przedstawicielem „osieroconych” receptorów, które utraciły zdolność do wiązania hormonu.

z białkami kompleksu inicjacyjnego [22]. W odróżnieniu od aporeceptorów hormonów sterydowych, które mogą występować w cytoplazmie i jądrach komórkowych, aporeceptory tyroksyny i kwasu retinowego są dość silnie związane przez niehistonowe białka chromatyny [5, 6]. Niezwiązany z hormonem receptor (aporeceptor) tyroksyny, podobnie jak białko *V-erbA*, które nie posiada zdolności do wiązania hormonu mogą rozpoznawać sekwencje TRE i działać jako represory transkrypcji [7]. Forman i Samuels [5] starają się wyjaśnić mechanizm zmian funkcji receptora pod wpływem związania hormonu. Autorzy [5] proponują roboczy model „regulatorowego suwaka” (ang. *regulatory zipper model*), w którym łączą trzy właściwości regionu C-końca receptorów (Ryc. 2, 3A, B), a mianowicie: zdolność do wiązania hormonu, zdolności do dimeryzacji i zdolności do transrepresji lub transaktywacji. Bliżej niesprecyzowana konformacja receptora, mająca miejsce po związaniu dimeru przez DNA, może eksponować region

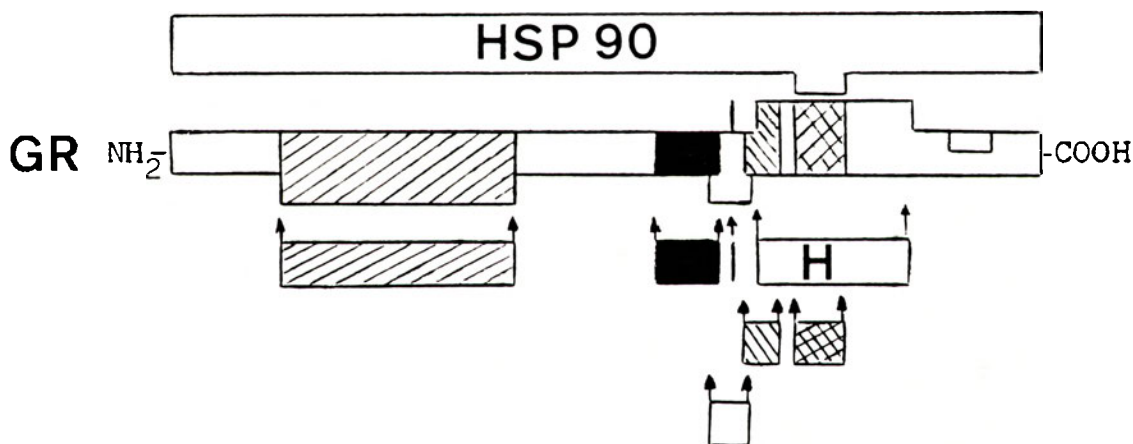
receptora, któremu autorzy przypisują właściwości transrepresji. Uwiarygodnienie tego modelu wymaga dalszych szczegółowych badań.

III-2. Poszczególne elementy „palców cynkowych” receptorów jądrowych warunkują prawidłowe rozpoznawanie regulatorowych sekwencji DNA

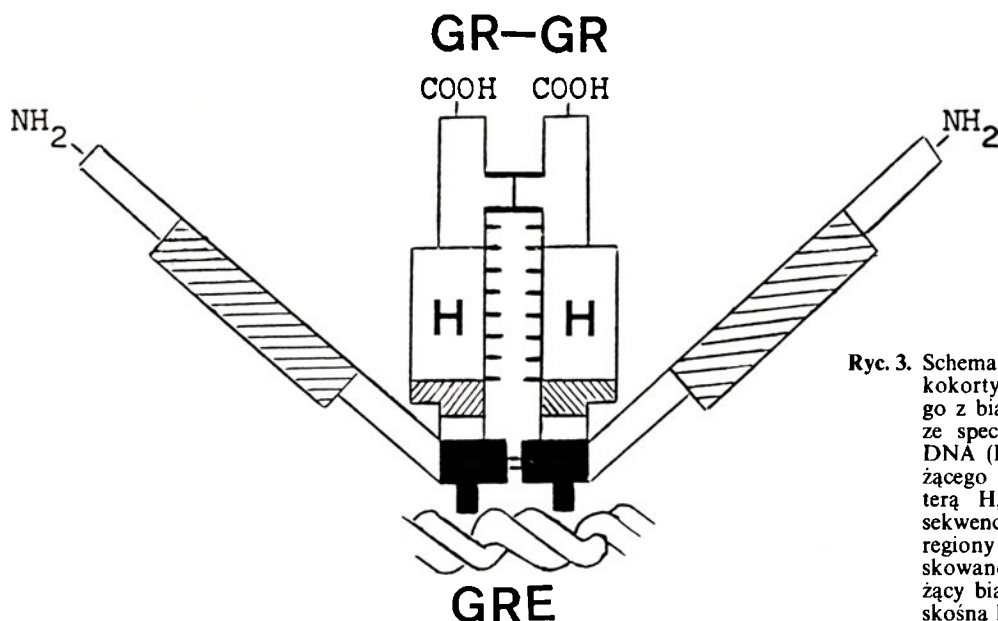
Wszystkie dotąd poznane białka regulatorowe posiadają domenę rozpoznającą specyficzne sekwencje DNA. Domeny te, w zależności od rodzaju białek, mogą tworzyć trzy rodzaje lokalnych struktur przestrzennych typu „helix — turn — helix”, „palec cynkowy” oraz „leucynowy suwak” zakończony zasadowymi aminokwasami, nazywamy ostatnio bardziej trafnie: „zamknięte nożyce”.

Analiza sekwencji aminokwasów receptorów jądrowych wykazała, że domena rozpoznająca specyficzne sekwencje DNA jest bogata w cysteinę. Lokalną

A.



B.



Ryc. 3. Schemat budowy receptora glukokortykoidów (GR) związanego z białkiem HSP90 (A) oraz ze specyficznymi sekwencjami DNA (B). Rdzeń regionu wiążącego hormonu oznaczono literą H, region rozpoznający sekwencję GRE zaczerwniono, regiony transaktywujące zakreskowane poziomo, region wiążący białko HSP90 oznaczono skośną kratką.

III-3. Aktywność rozproszonych domen transaktywacyjnych receptora jest zależna od rodzaju komórek i hipotetycznych białek produkowanych przez te komórki

Wszystkie dotąd poznane białka regulatorowe, oprócz domeny rozpoznającej specyficzne sekwencje DNA, posiadają przynajmniej jedną domenę transaktywującą [38]. Domeny te, zidentyfikowane w białkach regulatorowych drożdży i w receptorze glukokortykoidów, mogą tworzyć alfa helikalną lokalną strukturę o przewodzie ładunków ujemnych. Wysłunęto koncepcję [38—42], iż ujemny ładunek tej domeny umożliwia bezpośredni kontakt tych białek z dodatnio naładowanym regionem białka TFII kompleksu przedinicyjacyjnego i ułatwia tworzenie stabilnego kompleksu inicjacyjnego. Jednak w białku regulatorowym Sp1 stwierdzono występowanie domen aktywujących trzech rodzajów: bogatych w aminokwasy kwaśne, prolinę lub glutaminę. Tworzą one trzy różne lokalne struktury, umożliwiające kontakt białka Sp1 bezpośrednio z białkiem TFIID lub z innymi białkami kompleksu inicjacyjnego. Pośredni kontakt między tymi białkami może zachodzić za pomocą tak zwanych „adaptorów”, którymi mogą być specyficzne białka produkowane w określonym rodzaju komórek [41].

Receptor glukokortykoidów posiada dwie transaktywne domeny [13—15] Tau 1 i Tau 2 i może współdziałać z promotorem typu „TATA-less” [42]. Domena Tau 1, położona jest między aminokwasem 77 a 262, czyli między N-końcem receptorowego białka, a jego domeną odpowiedzialną za interakcję z DNA. Domena Tau 2 położona jest między aminokwasem 526 a 556, a więc w obrębie domeny odpowiedzialnej za wiązanie hormonu przez receptor (Ryc. 3). W obu domenach występuje przewaga ładunku ujemnego reszt aminokwasowych. Duplikacje domeny Tau 2, jak i domeny Tau 1, zwiększają trzykrotnie zdolność ludzkiego receptora glukokortykoidów do transaktywacji.

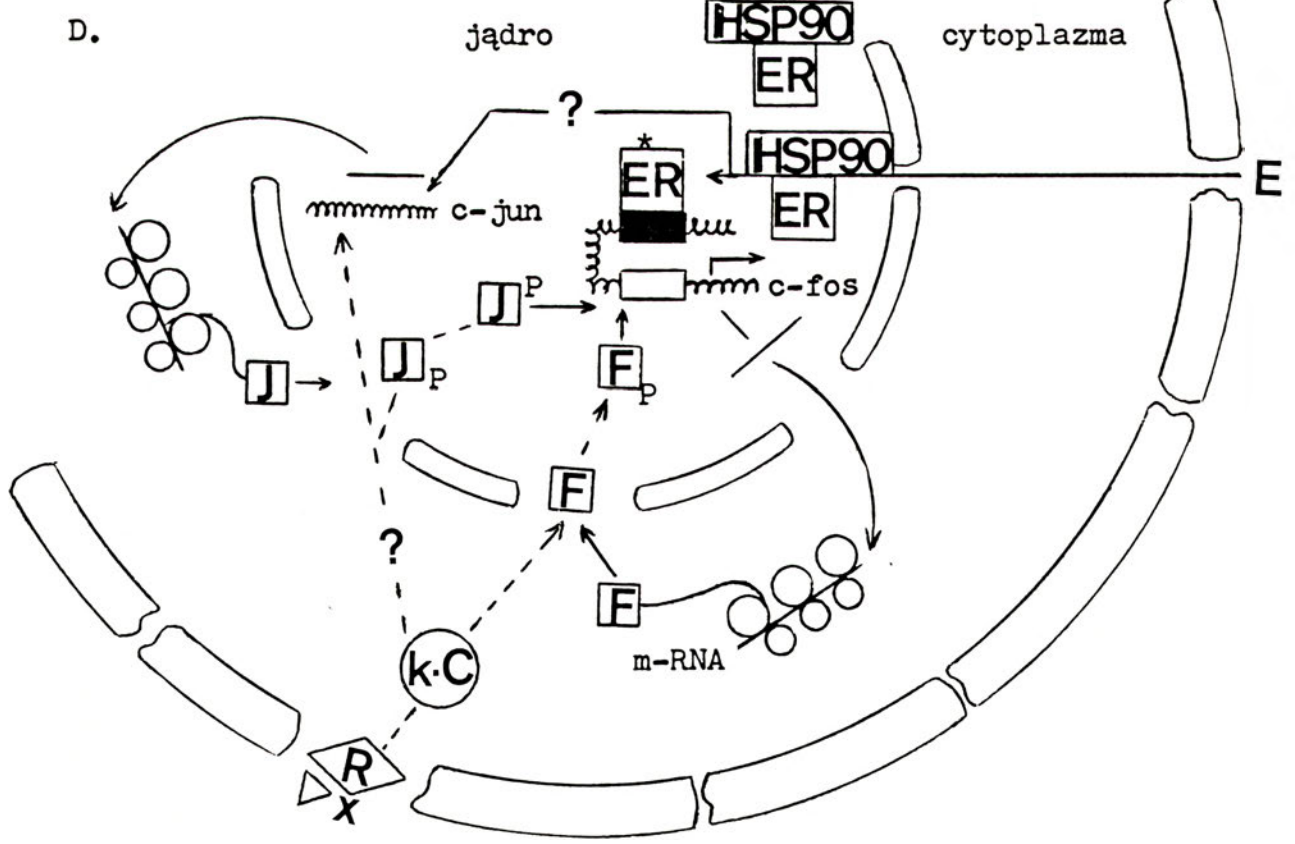
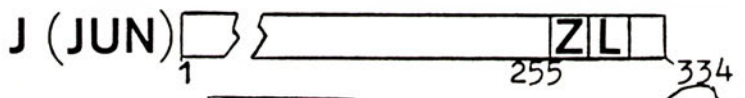
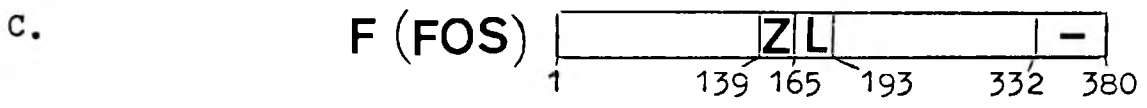
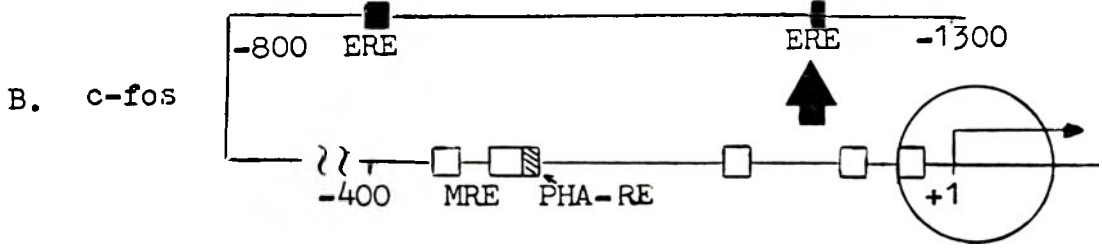
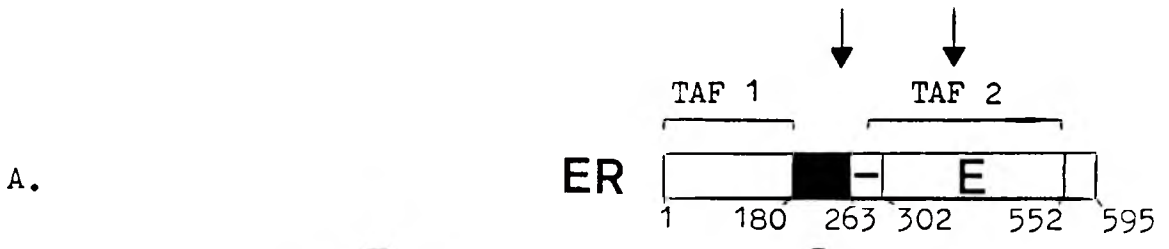
W receptorze estradiolu zidentyfikowano dwie transaktywujące domeny TAF 1 i TAF 2 w obrębie N-końca oraz C-końca tego receptora. Domeny TAF 1 i TAF 2 nie są bogate w kwaśne aminokwasy, glutaminy ani proliny [44—47]. Nie mają więc charakteru transaktywnych domen występujących w innym, dobrze poznanym białku regulatorowym Sp 1 [38, 46]. Stosując metodę wymiany domen wykazano, że transaktywność domeny TAF 1, zlokalizowanej w N-końcu receptora estradiolu, zależna jest od rodzaju komórek. Okazało się również, iż usunięcie 368-miu pierwszych aminokwasów N-końca receptora glukokortykoidów (a więc aminokwasów obejmujących domenę Tau 1) obniża zdolność receptora do aktywacji transkrypcji w komórkach CV-1, natomiast nie ma wpływu na jego zdolność do transaktywacji w komórkach *HeLa* [48]. W przypadku progesteronu, usunięcie N-końca receptora wraz z domeną transaktywacyjną obniża 10-krotnie jego zdolność do transaktywacji w komórkach *HeLa* i eliminuje je całkowicie w komórkach CV-1. Co ciekawsze, słynne w latach 70-tych podjednostki A i B receptora progesteronu, za pomocą których wyjaśniono, a także

utrwalono [1] błędny obraz mechanizmu rozpoznawania przez receptor docelowych genów, to dwie niezależne formy tego receptora [49—51]. Obie formy receptora progesteronu są zdolne do rozpoznawania specyficznych sekwencji DNA za pomocą cynkowych palców. Forma A receptora, wskutek przesunięcia miejsca inicjacji translacji, nie posiada pierwszych 165-ciu aminokwasów N-końca, które obejmują domenę transaktywacyjną jego N-końca. Okazało się również, iż w komórkach CV-1 jedynie forma A receptora jest zdolna do transaktywacji transkrypcji regulowanej przez promotor owalbuminy kurczęcia. Przyczyny takiej zróżnicowanej aktywności domen transaktywacyjnych nie są wyjaśnione. Wysłunęto przypuszczenie, że domena aktywująca N-końca receptora jest w określonych komórkach selektywnie inaktywowana przez białko inhibitorowe; alternatywne przypuszczenie zakłada, że domena ta jest zdolna do interakcji z innymi białkami regulatorowymi, które są produkowane jedynie w danym typie komórek. W komórkach przysadki mózgowej zidentyfikowano specyficzne tkankowo białko regulatorowe, nazywane Pit-1 lub GHF-1, które reguluje podstawowy poziom transkrypcji genu prolaktyny lub hormon wzrostu. Przypuszczalnie, interakcja białka Pit-1 z receptorem estradiolu warunkuje transaktywację genu prolaktyny przez ten receptor [52, 53].

IV. Jądrowe receptory i jądrowe białka FOS i JUN jako selektywne przełączniki indukcji i wygaszania transkrypcji genów w procesie proliferacji i różnicowania się komórek

Zapoczątkowanie pierwszego etapu proliferacji, to znaczy uzyskanie przez komórki stanu „kompetencji do wzrostu”, poprzedza przejściowy wzrost ekspresji genów *c-fos*, *c-jun* i *c-myc*. W większości komórek transkrypcja tych genów jest indukowana przez specyficzne czynniki wzrostu za pomocą przekaźników „drugiego obiegu” [54].

W komórkach epitelialnych żeńskich organów reprodukcyjnych proliferacja komórek indukowana jest przez estradiol. Indukcji tej towarzyszy pojawienie się produktów ekspresji genów *c-fos*, *c-jun* i *c-myc*. W roku 1988 grupa badaczy włoskich rozpoczęła serię badań [55—59] weryfikujących hipotezę, iż receptor estradiolu jest białkiem regulującym transkrypcję tych genów. Badacze ci wykazali [58, 59], iż w obrębie niekodujących sekwencji genu *c-fos* istnieją dwa rodzaje sekwencji ERE wiążących receptor estradiolu. Stwierdzono, iż jedna z sekwencji ERE genu *c-fos* [58, 59] wykazuje aktywność *cis* i warunkuje indukcję transkrypcji tego genu przez estradiol za pomocą domeny TAF-1 i TAF-2 receptora estradiolu (Ryc. 5A, B). Sekwencje MRE genu *c-fos*, a konkretnie sekwencje PHA-RE, położone bliżej kompleksu inicjacyjnego niż sekwencje ERE (Ryc. 5B) wiążą końcowy produkt ekspresji tego genu, a mianowicie regulatorowe białko FOS(F). Białko to wiąże się do sekwencji PHA-RE różnych genów jedynie w postaci heterodimeru utwo-



zzonego z białkiem JUN(J) za pomocą regionu (L) nazywanego leucynowym suwakiem (Ryc. 5C). Białko to może występować w cytoplazmie w postaci kompleksu z inhibitorowym białkiem IP-1; zależna od kinazy C fosforylacja białka IP-1 uwalnia białko JUN [60]. Przypuszczalnie, fosforylacja N-końca białka JUN (region domeny transaktywującej) zwiększa jego zdolność do aktywacji transkrypcji [61]. Defosforylacja aminokwasów leżących blisko aminokwasów zasadowych (Z) domeny „zamknięte nożyce” białka JUN umożliwia rozpoznawanie sekwencji PHA-RE przez dimery JUN-JUN lub JUN-FOS [62]. Natomiast superfosforylacja C-końca białka FOS(F) powoduje, iż heterodimer FOS-JUN działa nie tylko jako aktywator, lecz jako represor transkrypcji [63].

Według badaczy włoskich [55—59] pierwszym i bezpośrednim efektem działania estradiolu — który zapoczątkowuje serię podziałów komórek epitelialnych żeńskich organów reprodukcyjnych — jest indukcja transkrypcji genu *c-fos* oraz (co nie zostało udowodnione) genu *c-jun* (Ryc. 5D). Kumulacja w jądrach komórkowych kompleksu receptor estradiolu — białko HSP90 (Ryc. 5D) umożliwia szybkie przekazanie tego sygnału do sekwencji ERE genu *c-fos*, pojawienie się transkryptu i końcowego produktu tego genu w postaci białka FOS(F). Zwiększenie w komórkach stężenia białek FOS(F) i JUN(J) umożliwia aktywację transkrypcji całej gamy genów regulowanych przez sekwencje PHA-RE (w tym genu *c-fos*), aktywacji indukowanej przez pozakomórkowe sygnały za pomocą przekaźników „drugiego obiegu”. Końcowe produkty ekspresji tych genów umożliwiają przejście komórek z fazy G₁ w fazę S, w której następuje replikacja DNA. Po uzyskaniu przez komórki stanu zwanego „kompetencją do wzrostu” następuje

Ryc. 5. Ogólny schemat działania receptora estradiolu (ER) oraz białek FOS i JUN na przejściową ekspresję genu *c-fos*.

A — budowa receptora estradiolu: strzałkami zaznaczono region, którego delecja znosi proliferacyjne działanie estradiolu; TAF1 i TAF2-regiony aktywujące transkrypcję; E-region wiążący estradiol.

B — budowa sekwencji regulujących genu *c-fos*: ERE-sekwencje wiążące receptor estradiolu (sekwencje ERE wrażliwe na działanie estradiolu zaznaczono grubą strzałką); PHA-RE, MRE-sekwencje wiążące białka aktywowane za pomocą przekaźników drugiego obiegu (sekwencje PHA-RE zaznaczono skośnymi kreskami wiążą dimer JUN-JUN lub JUN-FOS); sekwencje kompleksu inicjacyjnego są wpisane w okrąg.

C — budowa białek regulatorowych FOS (F) i JUN (J): Z — region zasadowych aminokwasów rozpoznający sekwencje PHA-RE; L — region suwaka leucynowego warunkującego tworzenie dimeru JUN-FOS; region C-końca, którego superfosforylacja warunkuje represyjne właściwości białka FOS zaznaczono znakiem minus.

D — uproszczony schemat indukcji przejściowej transkrypcji genu *c-fos* przez estradiol: E — estradiol, wnikający drogą dyfuzji do jąder komórkowych; HSP90ER — kompleks receptora estradiolu (ER) z białkiem szoku cieplnego wiążący estradiol w jądrach komórkowych; ER z gwiazdką — kompleks estradiol-receptor wiązany przez sekwencje ERE genu *c-fos*; mRNA — transkrypt genu *c-fos* pojawiający się w komórce w 30 min. po potraktowaniu komórek estradiolem; F — białkowy produkt ekspresji genu *c-fos*; J — białkowy produkt genu *c-jun*, którego transkrypt pojawia się w 30 min. po potraktowaniu komórek estradiolem; R — receptor sygnału X uruchamiającego „szlak kinazy C”; k-C — początek „szlaku kinazy C” prowadzący do aktywacji (fosforylacja/defosforylacja) białek JUN i FOS. Superfosforylacja białka FOS powoduje autorepresję transkrypcji genu *c-fos* i może być jedną z przyczyn wygaszenia ekspresji genu *c-fos*, (2—4 godz. od momentu traktowania komórek estradiolem).

Przygotowano na podstawie pozycji literaturowej nr 48—57.

wygaszenie transkrypcji genu *c-fos* i innych genów regulowanych przez sekwencje PHA-RE. Może to być spowodowane superfosforylacją C-końca białka FOS i zmianą jego funkcji z aktywatora na represora transkrypcji [63]. Obniżenie w tym okresie koncentracji receptora w jądrach komórkowych skutecznie wyłącza indukcję transkrypcji genu *c-fos* przez estradiol. W komórkach nowotworowych (MCF-7) aktywność receptora estradiolu — jako czynnika aktywującego transkrypcję — może być zredukowana w przypadku superekspresji genów *c-fos* i *c-jun* [64].

Mitogeny efekt działania estradiolu na normalne i nowotworowe nabłonkowe komórki żeńskich organów reprodukcyjnych od dawna łączono z działalnością receptora estradiolu, podobnie jak antyproliferacyjne działanie antyestradiolu. Syntetyczny antyestradiol (tamofiksen) stosowany jest obecnie jako farmakologiczny czynnik antykancerogeny obniżający częstość podziałów komórkowych. Podobnie jak estradiol, tamofiksen wiązany jest przez region C-końca receptora (Ryc. 5A). Delecja tego regionu receptora znosi działanie proliferacyjne estradiolu i antykancerogenne antyestradiolu [65].

Ostatnie lata przynoszą dane, które wskazują, iż w wielu przypadkach receptory jądrowe „wygaszają” aktywację transkrypcji genów, które zawierają sekwencje typu PHA-RE i są transaktywowane przez białka JUN-FOS [33, 34, 36, 37, 66—68]. W przypadku genów proliferyny [37], cytokiny IL-6 [66] i gonadotropiny [68] stwierdzono, iż receptor glukokortykoidów jest związany przez sekwencje określone jako negatywny GRE, które nakładają się na sekwencje typu PHA-RE i cAMP-RE [37, 6, 67, 68]. Na podstawie badań [37] nad modulacją transkrypcji kontrolnego genu regulowanego przez sekwencje GRE-(PHA-RE) proliferyny w modelowym układzie komórkowym (Tabela II) grupa badawcza Yamamoto postuluje mechanizm selektywnie wyłączający lub włączający transkrypcję genów regulowanych przez te sekwencje. Według autorów [37] decyzja o indukcji lub wygaszeniu transkrypcji genu regulowanego przez sekwencje GRE-(PHA-RE) jest w komórce zaprogramowana wcześniej, przed dotarciem hormonu do komórki. Decyzja ta jest uwarunkowana wcześniejszym przygotowaniem w komórkach odpowiedniego zestawu białek regulatorowych.

W przypadku sekwencji regulatorowych genu proliferyny (Tab. 2) silna indukcja transkrypcji pod wpływem sygnału aktywującego kinazę C — zachodzi jedynie przy odpowiednim stężeniu białek FOS i JUN i niskim stężeniu lub całkowitym braku receptora glukokortykoidów. Transkrypcja ta ulega wygaszeniu pod wpływem syntetycznego glukokortykoidu (DEX) jedynie wówczas, gdy odpowiednie stężenie receptora glukokortykoidów umożliwi tworzenie nieaktywnego kompleksu FOS-JUN-GR, wiązane przez sekwencje GRE-(PHA-RE). Natomiast związanie przez te sekwencje kompleksu JUN-JUN-GR potęguje transkrypcję badanego genu w obecności syntetycznego glukokortykoidu (Tab. 2). Wyniki tych badań wskazują, iż białka FOS i JUN mogą działać w komórce jako selektory, dopuszczające do aktywacji (kompleks JUN-JUN) lub wygaszenia (kompleks FOS-JUN)

Tabela 2.

Zaprogramowanie indukcji lub wygaszania transkrypcji genu regulowanego przez sekwencje GRE-(PHA-RE) wrażliwe na działanie glukokortykoidu (DEX wiązany przez receptor GR) oraz na działanie estrów forbolu (PHA aktywujący w komórkach szlak kinazy C i pośrednio białka JUN i FOS) w komórkach ssaków hodowanych *in vitro*

Transfekcja komórek wektorami cis i trans programującymi w komórce rodzaj sekwencji i białek regulatorowych kontrolnego genu		Rodzaj kompleksu białek wiązanych przez sekwencje GRE-(PHA-RE) w transfekowanych komórkach	Transkrypcja genu regulowanego przez sekwencje GRE-(PHA-RE) w transfekowanych komórkach, traktowanych PHA i DEX
Białka regulatorowe	Seqwencje regulatorowe		
JUN + FOS	GRE-(PHA-RE)	JUN-FOS	silna indukcja
JUN + FOS + GR	GRE-(PHA-RE)	JUN-FOS-GR	wygaszanie
JUN	GRE-(PHA-RE)	JUN-JUN	słaba indukcja
JUN + GR	GRE-(PHA-RE)	JUN-JUN-GR	silna indukcja
GR	GRE-(PHA-RE)	słabe wiązanie GR	brak indukcji

Przygotowano na podstawie pozycji literaturowej nr 36.

przez glukokortykoidy transkrypcji genów regulowanych przez nakładające się sekwencje GRE i PHA-RE. Stwarza to możliwość włączania i wyłączania całej serii genów regulowanych przez te sekwencje w zależności od wcześniej zaprogramowanej ekspresji i posttranslacyjnej modyfikacji białek regulatorowych JUN, FOS i GR.

V. Uwagi końcowe

W artykule przedstawiono najnowsze osiągnięcia w dziedzinie badań nad strukturą i funkcją białek regulujących transkrypcję określonych jako receptory jądrowe. Osiągnięcia w tej dziedzinie, dotyczące struktury i funkcji receptorów jądrowych jako wzmacniaczy transkrypcji, były tematem plenarnego wykładu profesora Chambona na ostatnim Zjeździe FEBSu w sierpniu 1990.

Molekularny mechanizm działania receptorów jądrowych jako represorów transkrypcji jest znacznie mniej poznany. Ostatnie badania wskazują na możliwość „porozumienia” (ang. *cross-talk*) między białkami regulatorowymi, które są indukowane przez odrębne systemy sygnałów pozakomórkowych indukujących transkrypcję. Wynikiem tego „porozumienia” — polegającego na tworzeniu różnego rodzaju kompleksów białek regulatorowych i rozpoznawania wspólnych, złożonych sekwencji regulatorowych — jest włączanie i wygaszanie transkrypcji genów biorących udział w realizacji komórkowych programów proliferacji i różnicowania się komórek.

Artykuł otrzymano 27 czerwca 1991 r.
Zaakceptowano do druku dnia 10 grudnia 1991 r.

Piśmiennictwo

1. Paszewski A. (1980), W: Lassota Z. (red.) *Biologia Molekularna*, PNW, Warszawa str. 279—282.
2. Wahli W., Martinez E. (1991), *FASEB J* 5: 2243—2249.
3. Johnson P.F., Mc Knight S.L. (1989), *Annu. Rev. Biochem.* 58: 799—839.
4. Evans R.M., (1988), *Science* 240: 889—895.

5. Forman B.M., Samuels H.H., (1990), *Mol Endocrinol* 4: 1293—1301.
6. Chin W.W., (1991), W: Packer M.G. (red.) *Nuclear Hormone Receptors*, Academic Press, London, str. 79—102.
7. Damm K., Thompson C.C., Evans R.M., (1989), *Nature* 339: 593—597.
8. Bodine P.V., Litwack G., (1990), W: Litwack G. (red.) *Receptor, The Humana Press, Inc. USA.*
9. Umesono K., Evans R.M., (1989), *Cell* 57: 1139—1146.
10. Hollenberg S.M., Weinberger C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B., Rosenfeld M.G., Evans R.M., (1985), *Nature* 318: 635—641.
11. Weinberger C., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G., Evans R.M., (1985), *Nature* 318: 670—672.
12. Weinberger C., Hollenberg S.M., Ong E.S., Harmon J.M., Brower S.T., Cidlowski J., Thompson E.B., Rosenfeld M.G., Evans R.M., (1985), *Science* 228: 740—742.
13. Giguere V., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G., Evans R.M. (1986), *Cell* 46: 645—652.
14. Weinberger C., Giguere V., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G., Evans R.M. (1986), *Cold Spring Harbor Symp Quant Biology* 51: 759—772.
15. Hollenberg S.M., Giguere V., Segui P., Evans R.M., (1987), *Cell* 49: 39—46.
16. Glass C.K., Lipkin S.M., Devary O.V., Rosenfeld M.G., (1989), *Cell* 59: 697—708.
17. Hollenberg S.M., Evans R.M. (1988), *Cell* 55: 899—906.
18. Danielsen M., Northrop J.P., Ringold G.M. (1986), *EMBO J* 5: 2513—2522.
19. Danielsen M., Northrop J.P., Jonklass J., Ringold G.M., (1987), *Molec Endocrinol* 1: 816—822.
20. Corthesy B., Hipskind R., Theulaz I., Wahli W., (1988), *Science* 239: 1137—1139.
21. Kalff M., Gross B., Beato M., (1990), *Nature* 344: 360—362.
22. Klein-Hitpass L., Tsai S.Y., Weigel N.L., Allan G.F., Riley D., Rodriguez R., Schrader W.T., Tsai M.-J., O'Malley B.W., (1990) *Cell* 60: 247—257.
23. Elliston J.F., Fawell S.E., Klein-Hitpass L., Tsai S.Y., Tsai M.-J., Parker M.G., O'Malley B.W., (1990), *Mol. Cell. Biol.* 10: 6607—6612.
24. Pratt W.B., Sanchez E.R., Bresnick E.H., Meshinchis S., Scherrer L., (1989), *Cancer Res.* 49: 2222—2229.
25. Dalman F.C., Bresnick E.H., Patel P.D., Perdew G.H., Watson S.J., Pratt W.B., (1989), *J. Biol. Chem.* 264: 19815—19821.
26. Howard K.J., Holley S.J., Yamamoto K.R., Distelhorst C.W., (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 11928—11935.
27. Renoir J.-M., Radanyi C., Faber L.E., Baulieu E.-E., (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 10740—10745.
28. Dalman F.C., Sanches E.R., Lin A.L.-Y., Perini P., Pratt W.B., (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 12259—12267.
29. Hoesk W., Groner B., (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 5403—5409.
30. Denner A.L., Weigel N.L., Schrader W.T., O'Malley B.W., (1989), *Endocrinology* 125: 3051—3058.
31. Freedman L.P., Luisi B.F., Korszun Z.R., Basarappa R., Sigler P.B., Yamamoto K.R., (1988), *Nature* 334: 543—546.
32. Hård T., Kellenbach E., Boelens R., Maler B.A., Dahlman K., Freedman L.P., Carlsted-Duke J.,

- Yamamoto K.R., Gustafsson J-A., Kaptein R., (1990), *Science* **249**: 157—160.
33. Jonat C., Rahmsdorf H.J., Park K-K., Cato A.C.B., Gebel S., Ponta H., Herrlich P., (1990), *Cell* **62**: 1189—1204.
 34. Yang-Yen H-F., Chambard J-C., Sun Y-L., Smeal T., Schmidt T.J., Drouin J., Karin M., (1990), *Cell* **62**: 1205—1215.
 35. Vinson Ch.R., Sigler P.B., Mc Knight S.L., (1989), *Science* **246**: 911—916.
 36. Diamond M.I., Miner J.N., Yoshinaga S.K., Yamamoto K.R. (1990), *Science* **249**: 1266—1271.
 37. Gaub M-P., Bellard M., Scheuer I., Chambon P. Sassone-Corsi P. (1990), *Cell* **63**: 1267—1276.
 38. Mitchell P.J., Tjian R., (1989), *Science* **245**: 371—378.
 39. Ptashne M., Gann A.A.F., (1990), *Nature* **346**: 329—331.
 40. Latchman D.S., (1990), *Biochem. J.* **270**: 281—289.
 41. Berger S.L., Cress W.D., Cress A., Triezenberg S.J., Guarente L., (1990), *Cell* **61**: 1199—1208.
 42. Lin Y.-S., Green M.R., (1991), *Cell* **64**: 971—981.
 43. Wieland S., Schatt M.D., Rusconi S., (1990), *Nucl. Acid Res.* **18**: 5113—5118.
 44. Lees J.A., Fawell S.E., Parker M.G., (1989), *Nucl. Acid Res* **17**: 5477—5488.
 45. Webster N.J.G., Green S., Jin J-R., Chambon P., (1988), *Cell* **54**: 199—207.
 46. Tora L., White J., Brou Ch., Tasset D., Wester N., Scheer E., Chambon P., (1989), *Cell* **59**: 477—487.
 47. Tasset D., Tora L., Fromental C., Scheer E., Chambon P., (1990), *Cell* **62**: 1177—1187.
 48. Bocquel M.T., Kumar V., Stricker C., Chambon P., Gronmeyer H., (1989), *Nucl. Acid. Res.* **17**: 2581—2595.
 49. Jeltsch J-M., Turcotte B., Garnier J-M., Lerouge T., Krozowski Z., Gronemeyer H., Chambon P., (1990), *J. Biol. Chem.* **265**: 3967—3974.
 50. Kastner P., Krust A., Turcotte B., Stropp U., Tora L., Gronemeyer H., Chambon P., (1990), *EMBO* **9**: 19603—1614
 51. Mukherjee R., Chambon P. (1990) *Nucl. Acid. Res.* **18**: 5713—5716.
 52. Day R.N., Satoshi K., Sakai M., Muramantsu M., Maurer R.A., (1990), *Mol. Endocrinol.* **4**: 1964—1971.
 53. Burside J., Darling D.S., Chin W.W., (1990), *J. Biol. Chem.* **265**: 2500—2504.
 54. Pardee A.B., (1989), *Science* **246**: 603—608.
 55. Persico E., Scalona M., Cicatiello L., Sica V., Bresciani F., Weisz A., (1990), *Biochem. Biophys. Res. Commun* **171**: 287—292.
 56. Weisz A., Cicatiello L., Persico E., Scalona M., Bresciani F., (1990), *Mol. Endo.* **4**: 1041—1050.
 57. Weisz A., Bresciani F., (1988), *Mol. Endo.* **2**: 816—824.
 58. Weisz A., Rosales R., (1990), *Nucl. Acid. Res.* **18**: 5097—5106.
 59. Papa M., Mezzogiorno V., Bresciani F., Weisz A., (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**: 480—486.
 60. Auwerx J., Sassone-Corsi P., (1991), *Cell* **64**: 983—993.
 61. Binetruy B., Smeal T., Karin M., (1991), *Nature* **351**: 122—127.
 62. Boyle W.J., Smeal T., Defize L.H.K., Angel P., Woodgett J.R., Karin M., Hunter T., (1991), *Cell* **64**: 573—584.
 63. Ofir R., Dwarki V.J., Rashid D., Verma I.M., (1990), *Nature* **348**: 80—82.
 64. Doucas V., Spyrou G., Yaniv M., (1991) *EMBO J* **10**: 2237—2245.
 65. Grahm II M.L., Krett N.L., Miller L.A., Leslie K.K., Gordon D.F., Wood W.M., Wei L.L., Horwitz K.B., (1990), *Cancer. Res.* **50**: 6208—6217.
 66. Schüle R., Umesono K., Mangelsdorf D.J., Bolado J., Pike J.W., Evans R.M., (1990), *Cell* **61**: 497—504.
 67. Ray A., La Forge K.S., Sehgal P.B., (1990), *Mol. Cell Biol.* **10**: 5736—5746.
 68. Akerblom I.E., Slater E.P., Beato M., Baxter J.D., Mellon P.L. (1988), *Science* **241**: 350—353.

Biosynteza substancji P oraz innych neurokinin ssaków

Biosynthesis of substance P and other mammalian neurokinins

ELŻBIETA HRABEC^{1*}
 ZBIGNIEW HRABEC^{2**}
 ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa i lokalizacja substancji P
- III. Biosynteza neurokinin
 - III-1. Biosynteza prekursorów neurokinin
 - III-2. Obróbka potranslacyjna prekursorów neurokinin i innych neuropeptydów

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure and localization of substance P
- III. Biosynthesis of neurokinins
 - III-1. Biosynthesis of neurokinin precursors
 - III-2. Posttranslational processing of neurokinins and other neuropeptides

Wykaz stosowanych skrótów:

aa — aminokwasy; α , β , γ -PPT mRNA — mRNA α , β lub γ preprotachykininy; NKA — neurokinina A; NKB — neurokinina B; NP γ — neuropeptyd γ ; NPK — neuropeptyd K; POMC — proopiomelanokortyna; PPT — preprotachykinina; SP — substancja P.

¹dr, ²mgr, ³prof., Zakład Inżynierii Genetycznej P. P. Terpol, ul. P.O.W. 57, 98-200 Sieradz, obecny adres: *I Zakład Biochemii, **II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź.

I. Wstęp

W minionym dziesięcioleciu zidentyfikowano w układzie nerwowym ponad pięćdziesiąt peptydów „kandydujących do roli” neurotransmiterów i neuromodulatorów. Wykazują one zróżnicowane działanie fizjologiczne i farmakologiczne, a także mają różnorodną lokalizację w układzie nerwowym. Zagadnieniom związanym z ich działaniem farmakologicznym, strukturą chemiczną oraz lokalizacją w układzie nerwowym poświęcony został 3-4 numer 31 tomu *Postępów Biochemii* z 1985 r.

Dynamiczny rozwój neurobiologii związany jest nie tylko z identyfikacją kolejnych aktywnych biologicznie peptydów, ale też z poznaniem procesu biosyntezy tych związków na poziomie molekularnym. Postęp w neurobiologii zaobserwowany w ostatnim dziesięcioleciu można w dużej mierze przypisać rozszerzeniu warsztatu metodycznego, głównie o techniki określane mianem inżynierii genetycznej. Są one niezwykle użyteczne dla określenia struktury pierwszorzędowej neuropeptydów. Ponadto, techniki te stały się niedodzwanym narzędziem w eksperymentach, których celem jest poznanie procesu ekspresji tych związków.

II. Budowa i lokalizacja substancji P

Pierwszą opisaną neurokininą (tachykininą) ssaków była substancja P. Stwierdzono, że wywołuje ona skurcz pozanaczyniowych mięśni gładkich oraz obniża ciśnienie krwi [1]. Jest to jedenastopeptyd o następującej sekwencji aminokwasów: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ [2]. Homologii substancji P można odnaleźć także u niższych kręgowców. W tkankach płazów i mięczaków wykryto fizaleminę, kassininę oraz eledoizynę [3].

Obecnie wiadomo, że w tkankach ssaków występuje przynajmniej sześć związków zaliczanych do klasy neurokinin. W roku 1983 wykryto w rdzeniu kręgowym świni neurokininę A (NKA) (neurokinina α , substancja K, neuromedyna L) i neurokininę B (NKB) (neurokinina β , neuromedyna K) [4, 5], a pod koniec lat osiemdziesiątych wykazano istnienie jeszcze trzech neurokinin — neuropeptydu K, neuropeptydu γ i neurokininy A₍₃₋₁₀₎ [6, 7, 8].

Największe ilości substancji P można odnaleźć w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego, w jądrach dróg zstępujących nerwu trójdzielnego i wielu regionach podkorowych mózgowia takich jak: istota czarna, ciała migdałowate i podwzgórze [9].

Badania lokalizacji substancji P w rdzeniu kręgowym, przeprowadzane metodami immunohistochemicznymi, wykazały że znajduje się ona w małych komórkach zwojów korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego oraz w zakończeniach dośrodkowych tych komórek znajdujących się w rogach grzbietowych i odśrodkowych, zlokalizowanych w skórze i innych tkankach [10]. Substancja P jest syntetyzowana w ciałach komórkowych zwojów korzeni grzbietowych, a następnie transportowana do ośrodkowych i obwodowych zakończeń synaptycznych.

III. Biosynteza neurokinin

III-1. Biosynteza prekursorów neurokinin

Struktura pierwszorzędowa substancji P została określona w 1970 roku [2], dopiero jednak, z początkiem lat osiemdziesiątych poznano sposób powstawania tego peptydu.

Wiadomo obecnie, że neurokininy, a także inne neuropeptydy, są syntetyzowane w postaci znacznie większych cząsteczek prekursorowych [6, 7, 11—16]. Wyizolowanie tych prekursorów z komórek nerwowych ssaków, w celu określenia sekwencji aminokwasowej jest jednak praktycznie niemożliwe ze względu na ich szybki obrót metaboliczny. Dane te można jednak obecnie uzyskać w sposób pośredni, przeprowadzając translację wyizolowanych mRNA w układzie bezkomórkowym [17, 18]. Drugą możliwością, pozwalającą na uzyskanie pełniejszych informacji o badanych prekursorach neuropeptydów, jest zastosowanie technik inżynierii genetycznej [19]. Wykorzystując te techniki określono strukturę pierwszorzędową kilku prekursorów neurokinin ssaków [11, 15].

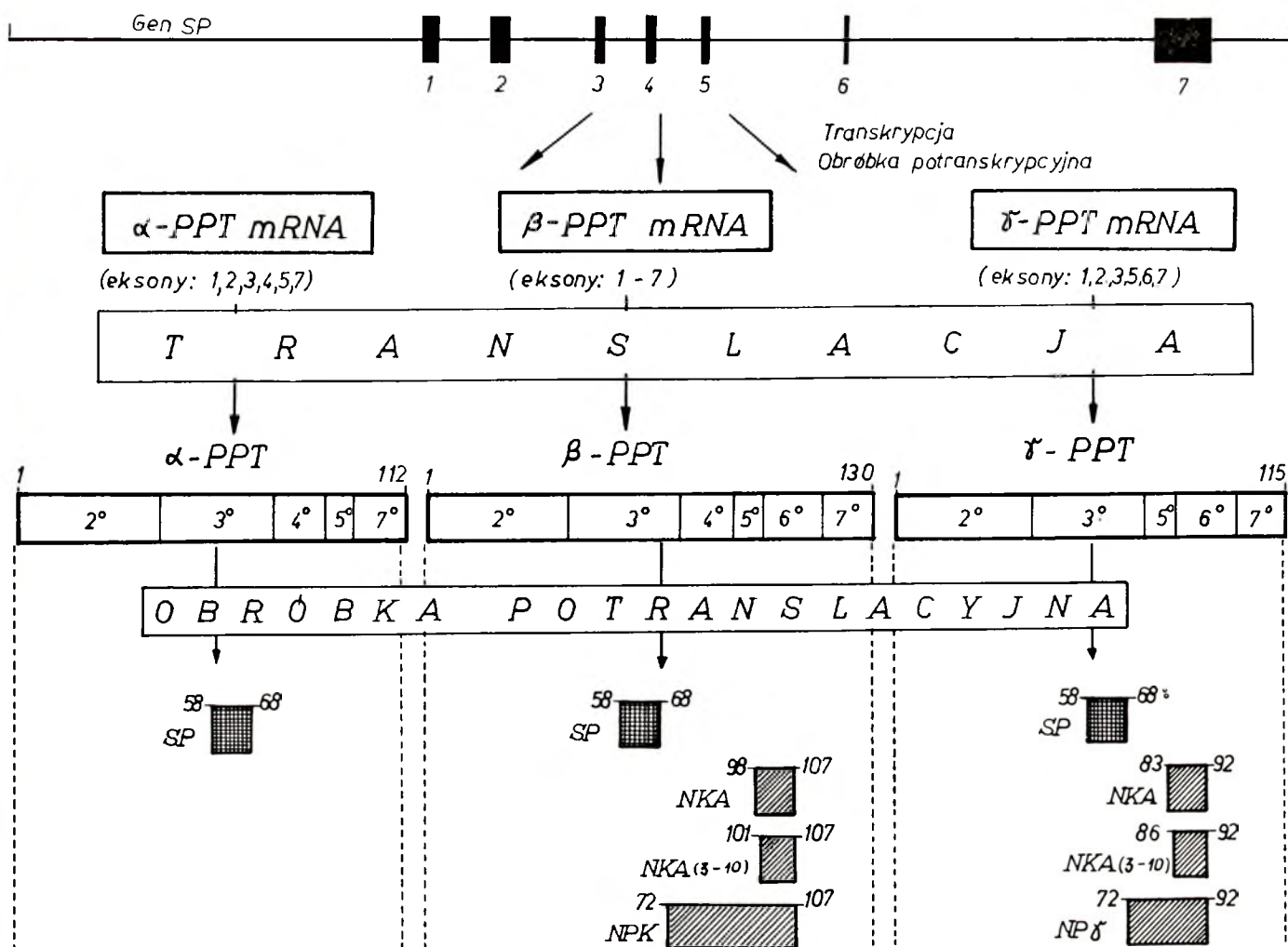
Ponadto, cDNA prekursora neuropeptydu można wprowadzić do wektora ekspresyjnego, na przykład odpowiednio zmodyfikowanego plazmidu. Bakterie transformowane tak zrekombinowanym plazmidem będą syntetyzowały prekursor neuropeptydu, który po wyizolowaniu z komórek prokariotycznych może służyć do dalszych badań.

Autorzy niniejszego opracowania, we współpracy z Zakładem Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi wprowadzili do bakterii *Escherichia coli* szczepu DH5, plazmid pWRSP zrekombinowany pochodzącym z syntezy chemicznej cDNA α -preprotachykininy. Użytkano ekspresję tego genu, a także wyizolowano i oczyszczono produkowaną przez *E. coli* α -preprotachykininę (zgłoszenie patentowe nr P 289367).

W 1983 roku sklonowano DNA kodujący prekursor substancji P z mózgowia wołu [11]. Badania prowadzone przez N a w ę i w s p ó ł a u t o r ó w [11] przyczyniły się nie tylko do określenia sekwencji aminokwasowej prekursora, ale także do odkrycia innych niż substancja P neurokinin występujących u ssaków.

Obecnie wiadomo, że neurokininy ssaków są kodowane przez dwa odrębne geny. Jeden z nich zwany genem SP (gen SP/NKA, gen I PPT, gen A) koduje substancję P, neurokininę A, neuropeptyd K, neuropeptyd γ oraz neurokininę A₍₃₋₁₀₎ [7, 8, 15, 16], natomiast drugi — gen NKB (gen II PPT, gen B) zawiera sekwencję kodującą neurokininę B [20]. Struktura tego genu nie jest przedmiotem niniejszego opracowania.

Gen SP (Ryc. 1.) ma około 1×10^3 par zasad i obejmuje sześć intronów oraz siedem eksonów o długości: 90, 132, 97, 45, 24, 54 i 593 par zasad [14]. W regionie flankującym koniec 5' genu odnaleziono sekwencję ATAATA. Poprzedza ona miejsce inicjacji o 26 par zasad i odpowiada sekwencji typu TATA box, wpływającej na inicjację transkrypcji prowadzoną przez polimerazę II [EC 2.7.7.6.].



Ryc. 1. Schemat ilustrujący transkrypcję genu SP, obróbkę potranskrypcyjną pierwotnego transkryptu, translację oraz obróbkę potranslacyjną PPT. Numerami 1—7 oznaczono eksony. Cyfry z indeksem ° wskazują, z którego eksonu pochodzą poszczególne odcinki PPT. Przy produktach obróbki potranslacyjnej zaznaczono, którym pozycjom w łańcuchu polipeptydowym prekursorów neurokinin odpowiadają poszczególne biologicznie aktywne peptydy.

Ekspresja genu SP prowadzi do powstania pierwotnego transkryptu, z którego w wyniku zróżnicowanej obróbki potranskrypcyjnej mogą powstać trzy rodzaje mRNA: α - β - i γ -PPT mRNA (Ryc. 1.) [11, 14, 15, 21]. α -PPT mRNA jest pozbawiony eksonu 6, w γ -PPT brak eksonu 4, natomiast β -PPT mRNA jako jedyny ma pełen komplet eksonów. Pełną strukturę pierwszorzędową trzech rodzajów mRNA tachykinin z genomu ssaków zainteresowani Czytelnicy odnajdą w pracy Nawy i współautorów oraz Krauzego i współautorów [11, 15].

Najdłuższy, bo zawierający wszystkie eksony — β -PPT mRNA z genomu szczura zbudowany jest z 1034 nukleotydów, z których na fragment podlegający translacji przypada 390 nukleotydów. Nukleotydy występujące bezpośrednio za inicjującym kodem AUG obejmują sekwencję kodującą aminokwasy w większości hydrofobowe. Jest to sekwencja peptydu sygnałowego, odpowiedzialnego za wektorowy transport prekursora do siateczki endoplazmatycznej [22].

Jak wykazano, we wszystkich białkach sekrecyjnych, prekursor białkowy zawiera na N-końcu hydrofobową sekwencję 15-30 aminokwasową, odpowie-

działną za wektorowy transport tych białek do siateczki endoplazmatycznej [22]. Sekwencja sygnałowa jest usuwana z prekursora jeszcze na etapie wydłużania łańcucha polipeptydowego. Mac Donald i współautorzy [23] określili, że sekwencja sygnałowa prekursorów neurokinin kończy się alaniną zajmującą 19 pozycję w łańcuchu polipeptydowym.

Przed kodonem terminacyjnym we wszystkich mRNA preprotachykinin występują kodony czterech następujących po sobie aminokwasów zasadowych — Arg-Arg-Arg-Lys. Dalej, w niepodlegającym translacji 3'-końcowym odcinku mRNA-PPT można odnaleźć sekwencję nukleotydów uważaną za sygnał poliadenylacji — AAUAAA. Poprzedza ona sekwencję poli-A o 16 nukleotydów.

Wykazano, że prekursor neurokinin zawierają sekwencję kilku biologicznie czynnych neuropeptydów (Ryc. 1.). Wyjątkiem jest α -preprotachykinina, zawierająca jedynie sekwencję substancji P (aa 58—68). β -preprotachykinina zawiera sekwencje aż czterech neuropeptydów: substancji P (aa 58—68), neurokininy A (aa 98—107), neurokininy A₍₃₋₁₀₎ (aa 101—107) i neuropeptydu K (aa 72—107). Podobnie, γ -preprotachykinina

zawiera sekwencje substancji P (aa 58—68), neurokininy A (aa 83—92), neurokininy A₍₃₋₁₀₎ (aa 86—92) i neuropeptydu γ (aa 72—92) [8, 15].

Powstawanie z jednego prekursora białkowego kilku związków wykazujących aktywność biologiczną nie jest zjawiskiem wyjątkowym, ograniczonym do neurokinin. Na przykład duży polipeptyd o masie cząsteczkowej 31 000 daltonów — pre-POMC jest jednocześnie prekursorem ACTH oraz β -endorfiny [24, 25].

Stwierdzono, że β -PPT mRNA szczura wykazuje duże strukturalne podobieństwo do β -PPT mRNA wołu. Analiza komputerowa sekwencji tych mRNA wykazała 91% homologii w regionie kodującym białko, 50,4% homologii w niepodlegającej translacji 5'-końcowej części, oraz 64,4% homologii w niepodlegającym translacji 3'-końcowym regionie cząsteczki mRNA. Analizując białkowe produkty translacji β -PPT mRNA badanych zwierząt stwierdzono homologię 93,1% [15]. Różnice gatunkowe dotyczą więc w niewielkim stopniu białkowych produktów ekspresji tego genu, zaobserwowano natomiast, że u różnych zwierząt w tej samej tkance dochodzi do ekspresji różnych PPT mRNA. Na w a i w s p ó ł a u t o r z y [11, 26] wykazali, że w mózgowiu wołu dominuje α -PPT mRNA, podczas gdy w jelicie i w tarczycy przeważa β -PPT mRNA. Z kolei, w mózgowiu i wszystkich badanych tkankach szczura występowanie poszczególnych rodzajów PPT mRNA można uszeregować w następującej kolejności: $\gamma > \beta > \alpha$ [15]. Jeszcze inne wzajemne proporcje pomiędzy PPT mRNA można zaobserwować w tkankach ludzkich. Dominuje β -PPT mRNA, natomiast najmniej jest α -PPT mRNA [27]. Tak więc obróbka pierwotnego transkryptu przebiega w sposób specyficzny dla danego gatunku, a u niektórych gatunków (szczur) jest także zróżnicowana tkankowo. Jak dotąd, mechanizm wyjaśniający zjawisko występowania specyficznych gatunkowo i tkankowo mRNA PPT u ssaków jest nieznan.

Regulacja syntezy neurokinin zachodzi na wielu poziomach obejmujących: aktywację transkrypcji genu SP, obróbkę pierwotnego transkryptu, transport PPT mRNA, wydajność procesu translacji oraz obróbkę potranslacyjną. Jednakże obecnie mechanizmy regulacyjne na poszczególnych etapach są w dalszym ciągu słabo poznane.

Dopamina — główny przekaźnik szlaku łączącego istotę czarną z prądkowiem — odgrywa rolę modulatora wpływając na poziom neuropeptydów obecnych w prądkowiu. Uszkodzenie drogi istota czarna — prądkowie lub zablokowanie receptorów dopaminowych D₂ przy pomocy antagonistów dopaminy powoduje znaczne zmniejszenie ilości substancji P w zakończeniach aksonów łączących istotę czarną z prądkowiem. Wydaje się, że wpływ dopaminy na poziom substancji P dotyczy regulacji ekspresji genu, ponieważ zaobserwowano, że zmiany poziomu substancji P w zakończeniach synaptycznych poprzedzone są zmianami ilości mRNA odpowiedzialnego za syntezę prekursorów substancji P [28—30]. Wykazano także wpływ asparagianinu i glutaminianu na poziom mRNA preprotachykinin (PPT) w neuronach prądkowia [31].

III-2. Obróbka potranslacyjna prekursorów tachykinin i innych neuropeptydów.

Pionierskie prace Steinaera i współautorów [32] doprowadziły do sformułowania hipotezy, w myśl której hormony peptydowe są wycinane z białek prekursorowych w miejscu występowania par aminokwasów zasadowych, lub w niektórych przypadkach, pojedynczych aminokwasów zasadowych. Jeśli jest to pojedynczy aminokwas zwykle jest nim arginina, a znacznie rzadziej lizyna [33].

Wyniki dalszych badań doprowadziły do rozszerzenia tej hipotezy na wiele innych peptydów i białek nie będących hormonami. Na podstawie analizy sekwencji wielu prekursorów neuropeptydów można wnioskować, że pary aminokwasów zasadowych działają jako sygnał kierujący uwalnianiem związków aktywnych biologicznie. Wydaje się także, że preferowanym miejscem rozszczepienia jest wiązanie Lys-Arg lub Arg-Arg a znacznie rzadziej wiązanie Lys-Lys czy Arg-Lys [33]. Nie stwierdzono natomiast istotnych homologii sekwencji w otoczeniu miejsca przecięcia probiałka, gdy znajduje się ono w pobliżu pary aminokwasów zasadowych.

Proteazy uczestniczące w obróbce potranslacyjnej prekursorów neurokinin ssaków nie są dostatecznie poznane i w chwili obecnej trudno przesądzić czy rozpoznają jedynie miejsce cząsteczki, w którym znajdują się aminokwasy zasadowe, czy również sekwencje otaczające ten punkt. Wydaje się jednak, że ta grupa enzymów nie wykazuje zbyt dużej specyficzności substratowej. Stwierdzono bowiem, że w przypadku obcych genów wprowadzonych do linii komórkowych, w których normalnie nie ulegają one ekspresji, produkty ekspresji przechodziły prawidłową obróbkę potranslacyjną. Na przykład, enzymy proteolityczne komórek guza przysadki (linia AtT 20) dokonywały prawidłowego rozszczepienia proneuropeptydu Y, choć nie jest on produkowany w tych komórkach [33].

Wyizolowanie enzymów uwalniających neurokininy, czy też inne biologicznie aktywne peptydy z ich prekursorów jest zadaniem niezwykle trudnym. Szczególnie kłopotliwe jest oddzielenie właściwych enzymów rozpoznających pary aminokwasów zasadowych od wielu aktywności proteolitycznych, głównie pochodzenia lizosomalnego. Badania nad konwersją kilku prohormonów do ich aktywnych produktów przyczyniły się do odkrycia i scharakteryzowania przynajmniej jednego enzymu zdolnego do rozszczepiania tych probiałek a różniącego się do lizosomalnych proteaz wewnątrzkomórkowych. Enzym ten jest proteazą tiolową z optimum działania w pH około 5,0. Związaną jest z błoną pęcherzyków wydzielniczych i przypomina katepsynę B, ale ma od niej znacznie większą specyficzność substratową [34].

Enzymem uczestniczącym w wycinaniu aktywnych peptydów z ich białkowych prekursorów jest także glikoproteina o masie cząsteczkowej 70 000. Odnaleziono ją w pęcherzykach wydzielniczych pośredniego oraz nerwowego płata przysadki mózgowej wołu. Optimum działania tego enzymu przypada w niskim pH. Jego aktywność hamuje pepstatyna A — inhibitor proteinaz aspartylowych [34].

W kolejnym etapie obróbki potranslacyjnej flankujące peptyd z obu stron reszty aminokwasów zasadowych są usuwane w wyniku działania karboksylaminopeptydazy. Karboksypeptydazę zdolną do pełnienia takiej funkcji odnaleziono w wielu tkankach endokrynych. Jest to metaloproteaza działająca w pH 5.0—6.0. Karboksypeptydaza z pęcherzyków wydzielniczych jest aktywowana przez jony Co^{2+} , co odróżnia ją od podobnego enzymu lizosomalnego. Aktywność tego enzymu można zahamować poprzez zastosowanie czynników chelatujących a także poprzez zablokowanie centrum aktywnego guanidynoetylem kwasu bursztynowego. Enzym występuje w dwu formach: związanej z błoną, o masie cząsteczkowej około 52 000, oraz rozpuszczalnej o masie 50 000 daltonów. Formę rozpuszczalną enzymu otrzymano w stanie homogennym. Określono także jego sekwencję [34]. Pod względem struktury pierwszorzędowej enzym ten wykazuje pewne podobieństwo do karboksypeptydazy A [EC 3.4.17.1] (20% homologii) i karboksypeptydazy B [EC 3.4.17.2] (17% homologii).

W pęcherzykach wydzielniczych wykryto także aminopeptydazę. Jest to związana z błoną metaloproteaza o optimum pH w szerokich granicach 5.5—7.5. Jakkolwiek enzym w sposób specyficzny odcina reszty aminokwasów zasadowych od N-końca cząsteczek, jego udział w procesie obróbki potranslacyjnej neuropeptydów nie został jak dotąd dostatecznie udokumentowany.

Wydaje się, że o specyficzności procesu obróbki potranslacyjnej prebiałek decyduje wiele czynników. Pierwszym z nich jest specyficzność peptydaz katalizujących reakcje proteolizy. Drugim jest sposób połańdowania cząsteczki prebiałka, a trzecim modyfikacje łańcuchów bocznych aminokwasów, takie jak glikozylacja czy fosforylacja, powodujące, że pewne wiązania peptydowe stają się mniej lub bardziej podatne na działanie peptydaz [33].

Wiele bioaktywnych peptydów izolowanych z mózgowia i tkanek wydzielniczych ma grupę α -amidową na C-końcu [35, 36]. Uważa się, że obecność grupy α -amidowej jest niezbędna dla ujawnienia pełnej aktywności biologicznej peptydów. Analizując sekwencje prekursorów wielu związków aktywnych biologicznie (w tym neurokinin), zaobserwowano że po aminokwasie który w czynnym biologicznie peptydzie jest amidowany następną resztą jest glicyna. Wydaje się, że sekwencja X-Gly-Z-Z, (gdzie Z oznacza Arg lub Lys) jest wspólnym sygnałem dla proteolizy i amidacji. Enzym przeprowadzający reakcję α -amidacji zidentyfikowano w pęcherzykach wydzielniczych płata przedniego, pośrodkowego oraz części nerwowej przysadki. Wymaga on obecności miedzi oraz tlenu w środowisku i jest stymulowany kwasem askorbinowym [36, 37].

Artykuł otrzymano 5 grudnia 1991 r.
Zaakceptowano do druku 19 grudnia 1991 r.

Piśmiennictwo

1. von Euler U.S., Gaddum J.H., (1931), *J. Physiol.*, **72**: 74—87.
2. Chang M.M., Leeman S.E., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**: 4784—4790.

3. Erspamer V., (1981), *Trends Neurosci.*, **4**: 267—269
4. Kimura S., Okada M., Sugita Y., Kanazawa I., Munekata E., (1983), *Proc. Jpn. Acad.*, ser. B **59**: 101—104.
5. Kangawa K., Minamino N., Fukuda A., Matsuo H., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**: 533—540.
6. Deacon C.F., Conlon J.M., (1987), *Neurochem Int.*, **10**: 559—564.
7. Kage R., Mc Gregor G.P., Thim L., Conlon J.M., (1988), *J. Neurochem.*, **50**: 1412—1417.
8. Mac Donald M.R., Takeda J., Rice C.M., Krause J.E., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**: 15578—15592.
9. Nicoll R.A., Schenker C., Leeman S.E., (1980), *Annu Rev Neurosci* **3**: 227—268
10. Hökfelt T., Kellerth J.O., Nilsson G., Pernow B., (1975), *Science* **190**: 889—890.
11. Nawa H., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Nakanishi S., (1983) *Nature* **306**: 32—36.
12. Nyberg F., Le Greves P., Terenius L., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **82**: 3921—3924.
13. Kream R.M., Schoenfeld T.A., Manusco R., Cleaney A.N., El-Bermani W., Macrides F., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4832—4836.
14. Krause J.E., Carter M.S., Xu Z.S., Mac Donald M.R., (1986), *Proceedings of Substance P and Neurokinins 5—7* Springer-Verlag, Nowy Jork.
15. Krause J.E., Chirgwin J.M., Carter M.S., Xu Z.S., Hershey A.D., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 881—885.
16. Krause J.E., Mac Donald M.R., Takeda Y., (1989) *Bio. Essays*, **10**: 62—69.
17. Roberts B., Paterson B.M., (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2330—2334
18. Pelham H.R.B., Jackson R.J., (1976) *Eur. J. Biochem.* **67**: 247—256
19. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, Nowy Jork.
20. Bonner T.I., Affolter H.-U., Young A.C., Young W.S., (1987), *Mol Brain Res* **2**: 243—249.
21. Kawaguchi Y., Hoshimaru M., Nawa H., Nakanishi S., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**: 1040—1046.
22. Walter P., Gilmore R., Blobel G., (1984), *Cell* **38**: 5—8.
23. Mac Donald M.R., Mc Court D.W., Krause J.E., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**: 15176—15183.
24. Crine P., Gianoulakis C., Seidah N.G., Gossard F., Pezzala P.D., Lis M., Chretien M., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4719—4723
25. Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakaura M., Chang A.C.Y., Cohen S.N., Numa N., (1979), *Nature* **287**: 423—437.
26. Nawa H., Kotani H., Nakanishi S., (1984) *Nature* **312**: 729—734.
27. Helke C.J., Krause J.E., Mantyh P.W., Couture R., Bannon M.J., (1990), *FASEB J* **4**: 1606—1615.
28. Bannon M.J., Elliot P.J., Bunney E.B., (1986) *Mol. Brain. Res.* **3**: 184—186.
29. Cruz C.J., Beckstead R.M., (1989), *Neurosci* **30**: 331—338.
30. Young W.S., Bonner T.I., Brann M.R. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9827—9831.
31. Somers D.L., Beckstead R.M., (1990) *Mol. Brain. Res.* **8**: 143—158.
32. Steiner D.F., Cunnigham D., Spiegelman L., Aten A., (1967), *Science* **157**: 697—700.
33. Darby N.J., Smyth D.G., (1990) *Biosci. Rep.* **10**: 1—13.
34. Andrews P.C., Brayton K., Dixon J.E., (1987), *Experientia* **43**: 784—790.
35. Mains R.E., Eipper B.A., Glembotski C.C., Doros K.M., (1983), *Trends Neurosci* **6**: 229—235.
36. Glembotski C.C., (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**: 13041—13048.
37. Eipper B.A., Mains R.E., Glembotski C.C., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 5144—5148.

**33rd International Conference
on the Biochemistry of Lipids,
Lyon-Villeurbanne, France,
7-10 September 1992**
Info: 33rd ICBL, INSATECH,
INSA Bât 705, 20, Avenue A Einstein,
69621 Villeurbanne cedex, France.

Receptory neurokinin. Udział substancji P w procesach zapalnych

Receptors of neurokinins. Substance P and inflammation

ZBIGNIEW HRABEC^{1*}
ELŻBIETA HRABEC^{2**}

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Receptory neurokinin
 - II-1. Struktura pierwszorzędowa receptorów
 - II-2. Własności funkcjonalne receptorów
- III. Rola substancji P w procesach zapalnych

Contents:

- I. Introduction
- II. Receptors of neurokinins
 - II-1. Primary structure of receptors
 - II-2. Functional properties of receptors
- III. Role of substance P in inflammatory processes

Wykaz stosowanych skrótów:

CHAPS — siarczan-3-[(3-cholamidopropyl)dimetyloamino]-1-propanu; DG — diacyloglicerol; IP₃ — inozytolotrisfosforan; NKA — neurokinina A (neurokinina α , substancja K, neuromedyna L); NKB — neurokinina B (neurokinina β , neuromedyna K); NK-1 — receptor substancji P; NK-2 — receptor neurokininy A; NK-3 — receptor neurokininy B; PIP₂ — fosfatydyloinozytolodifosforan; TNF — czynnik nekrozy nowotworów.

I. Wstęp

W zeszycie 3-4 31 tomu *Postępów Biochemii* (1985) ukazał się cykl artykułów poświęcony peptydom ośrodkowego układu nerwowego. Zawarte są w nim także informacje dotyczące struktury, roli biologicznej i rozmieszczenia substancji P oraz innych neurokinin (tachykinin) ssaków. Jednak od tego czasu zasób informacji o tych neuropeptydach uległ znacznemu poszerzeniu. Posługując się metodami inżynierii genetycznej, osiągnięto zasadniczy postęp w badaniach receptorów neurokinin. Pojawiły się także doniesienia świadczące o tym, że peptydy te spełniają funkcje nie tylko neurotransmiterów, lecz są mediatorami lokalnej odpowiedzi zapalnej organizmu.

II. Receptory neurokinin

Z początkiem lat osiemdziesiątych w tkankach ssaków wykryto receptory neurokinin, określone jako SP-P i SP-E. Receptor SP-P wiąże substancję P i fizaleminę z wysoką stałą powinowactwa, a z recepto-

mgr¹, dr², Zakład Inżynierii Genetycznej P.P. Terpol, ul. P.O.W. 57, 98-200 Sieradz, obecny adres: *II Zakład Biochemii, **I Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź.

rem SP-E silnie wiążą się kassinina i eledoizyna (substancja P była wówczas jedyną znaną neurokininą ssaków) [1]. Najpóźniej odkryty receptor, oznaczony symbolem SP-N, preferencyjnie wiąże neurokininę B [2, 3].

W 1986 roku dokonano nowej klasyfikacji receptorów neurokinin, określając je jako NK-1 (receptor substancji P, SP-P), NK-2 (receptor neurokininy A, SP-E) oraz NK-3 (receptor neurokininy B, SP-N) (Montreal Substance P Symposium, czerwiec 1986). Przy badaniu powinowactwa receptorów do poszczególnych neurokinin niezwykle pomocne okazało się zastosowanie analogów neurokinin znakowanych radioaktywnym jodem. Stwierdzono w ten sposób, że zarówno substancja P jak i fizalemina nie wykazują dużego powinowactwa do receptora neurokininy A (NK-2). Z drugiej strony, NKA, NKB i kassinina silnie wiążą się z receptorem NK-2, lecz mają małe powinowactwo do receptora substancji P (NK-1) [4-7].

Analiza konformacji SP, NKA i NKB wykazała, że neurokininy mają różną strukturę drugorzędową, jednakże C-końcowa sekwencja -Phe-Phe(Val)-Gly-Leu-Met-NH₂, tworząca część α -helisy jest podobna u wszystkich neurokinin. Ten fragment cząsteczki jest prawdopodobnie odpowiedzialny za wiązanie neurokinin z receptorami. Wydaje się więc, że neurokininy A i B, posiadające swe własne receptory, mogą w wyższych stężeniach wiązać się z receptorem substancji P [8].

W roku 1988 odkryto czwarty rodzaj receptora neurokinin (NK-4); występuje on w tchawicy świnki morskiej, ale jego endogenny ligand jest nieznan [9].

II-1. Struktura pierwszorzędowa receptorów

Pomimo że receptor substancji P (NK-1) odkryto w roku 1982, zasób informacji dotyczących jego struktury molekularnej był do niedawna niezwykle skąpy. W 1987 roku Dam i współautorzy wyznaczyli masę cząsteczkową tego receptora określając ją na 46 000 daltonów [10]. Otrzymanie receptora NK-1 w formie rozpuszczalnej przy użyciu niejonowego detergentu CHAPS (siarczan-3-[(3-cholamido-propyl)-1-dimetyloamino]-1-propanu) pozwoliło określić jego

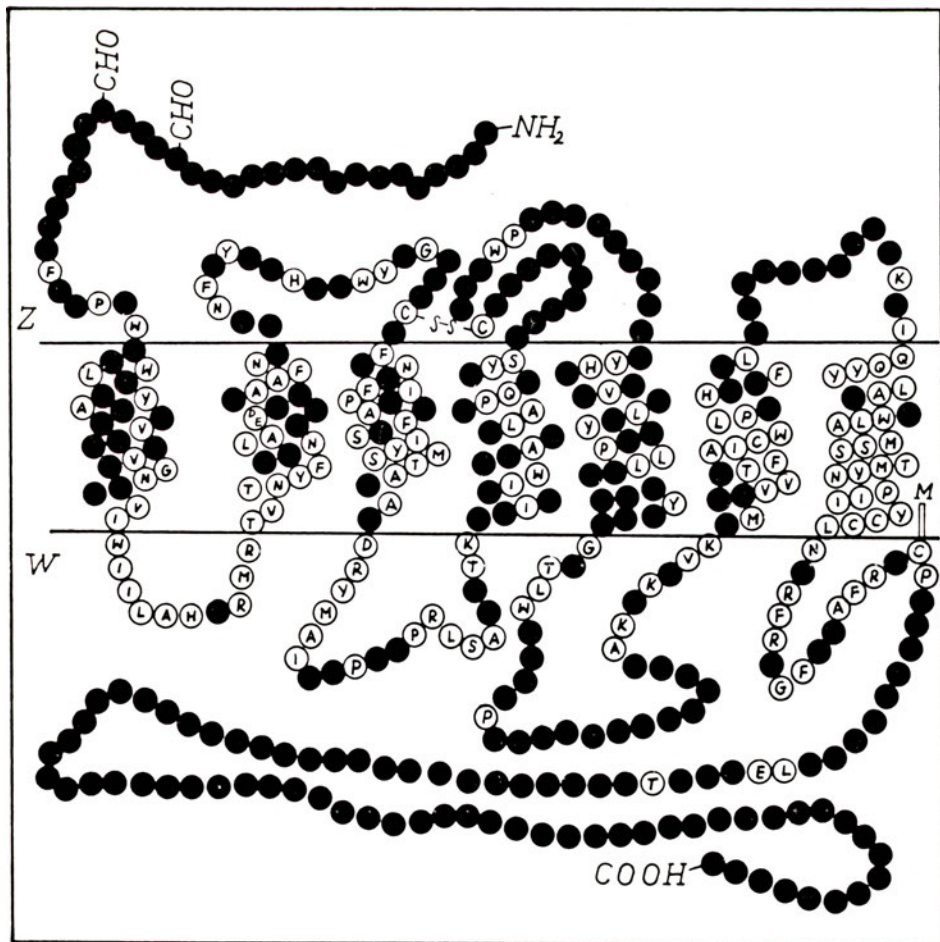
przybliżoną masę cząsteczkową na 55 000—60 000 daltonów [11]. Różnica rzędu 10 000 daltonów wynika z odmiennych metod stosowanych do znakowania receptorów oraz z zastosowania w eksperymentach materiałów pochodzących z różnych zwierząt (szczur i było domowe).

Obecnie, badania dotyczące struktury molekularnej receptorów neurokinin zaawansowane są w znacznym stopniu. Pod koniec lat osiemdziesiątych i na początku lat dziewięćdziesiątych, stosując metody inżynierii genetycznej określono strukturę pierwszorzędową trzech receptorów neurokinin (NK-1, NK-2 i NK-3) [12-16].

Otrzymane wyniki dowodzą, że receptory neurokinin są pojedynczymi polipeptydami składającymi się z około 400 aminokwasów (NK-1 — 407, NK-2 — 390 i NK-3 — 452). Należą one do rodziny receptorów zawierających siedem segmentów śródłonowych (seven-transmembrane segments). Do rodziny tej zaliczane są także: cholinergiczne receptory muskarynowe (M_1 i M_2), receptory adrenergiczne (β_1 i β_2), receptory serotoniny, receptor dopaminy (D_2) oraz podobne do rodopsyny barwniki wzrokowe [17-21]. Receptory tworzące tę rodzinę pofalowane są w taki sposób, że przechodzą przez błonę komórkową siedmiokrotnie (Ryc. 1.). N-końcowy odcinek cząsteczki receptora znajduje się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej; kolejno po nim następują: odcinek śródłonowy, pętla wewnątrzkomórkowa, ponownie odcinek śródłonowy, kolejna pętla zewnątrzkomórkowa i następny odcinek śródłonowy, po czym sekwencja ta powtarza

się. C-końcowy odcinek receptora znajduje się w przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Pętle wewnątrzkomórkowe receptorów neurokinin zawierają niewiele aminokwasów fosforylowanych przez kinazy białkowe, natomiast liczne reszty serylowe i treonylowe występują w obrębie wewnątrzkomórkowego odcinka C-końcowego. W regionie N-końcowym znajdują się potencjalne miejsca glikozylacji receptorów. Miejsce wiązania ligandów z receptorami nie jest znane, ale na podstawie badań porównawczych można przypuszczać, że znajduje się ono w siódmym odcinku śródłonowym, trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej lub szóstym odcinku śródłonowym [22].

Najbardziej konserwatywnymi odcinkami receptorów neurokinin są α -helikalne regiony śródłonowe (54—66% homologii). Zwłaszcza siódmy segment śródłonowy jest wyjątkowo konserwatywny, gdyż prawie wszystkie aminokwasy (poza dwoma) są identyczne we wszystkich trzech receptorach neurokinin. Niektóre aminokwasy występujące w receptorach neurokinin są identyczne we wszystkich receptorach zawierających siedem segmentów śródłonowych [15]. Dotyczy to np. dwóch reszt cysteilowych tworzących mostek dwusiarczkowy, zlokalizowanych w drugiej i trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej. Reszta cysteilowa znajdująca się w wewnątrzkomórkowym odcinku C-końcowym ulega palmitylacji, co powoduje „zakotwiczenie” tego odcinka receptora w błonie komórkowej [23]. Konserwatywnymi odcinkami receptorów są także druga i trzecia pętla wewnątrzkomórkowa (Ryc. 1.).



Ryc. 1. Schemat struktury receptorów neurokinin. Aminokwasy identyczne we wszystkich trzech receptorach oznaczono białymi kółkami, czarne kółka oznaczają aminokwasy niekonserwatywne. Z — przestrzeń zewnątrzkomórkowa, W — przestrzeń wewnątrzkomórkowa, CHO — potencjalne miejsca glikozylacji, M — miejsce palmitylacji.

Receptor substancji P (NK-1) i receptor neurokininy A (NK-2) są bardzo podobne. Struktura receptorów substancji P i neurokininy A jest homologiczna w 83%. Domeny: zewnątrzkomórkowa i cytoplazmatyczna wykazują najmniej homologii (odpowiednio: 57% i 51%). Największe podobieństwo między tymi receptorami można zaobserwować w dwu regionach: drugiej pętli wewnątrzkomórkowej i szóstym segmencie śród-błonowym (95% homologii) [14].

Największe różnice strukturalne między receptorem substancji P (NK-1) a receptorem neurokininy A (NK-2) dotyczą drugiej i trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej, choć w C-końcowym odcinku trzeciej pętli osiem aminokwasów oraz kodujące je nukleotydy są identyczne w obu receptorach. Odcinek ten stanowi prawdopodobnie obszar interakcji receptorów z konserwatywnym C-końcowym regionem neurokinin, gdy pozostałe aminokwasy drugiej i trzeciej pętli pełnią rolę czynnika selekcyjnego przy wiązaniu ligandu [14]. Inną, istotną strukturalną cechą różniącą oba receptory jest znacznie większa liczba reszt serylowych i treonylowych obecnych w cząsteczce receptora substancji P (NK-1), w porównaniu z receptorem neurokininy A (NK-2). Znajdują się one głównie w trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej i C-końcowej domenie cząsteczki, a fosfosorylacja tych aminokwasów związana jest z odczulaniem receptora. Zjawisko takie zaobserwowano także w przypadku receptora β_2 -adrenergicznego [14].

Porównując sekwencję receptora NK-2 z innymi receptorami zawierającymi siedem segmentów śród-błonowych, zaobserwowano, że największe podobieństwo wykazuje on do białek podobnych do rodopsyny. Stopień homologii pomiędzy receptorem NK-2 a innymi białkami receptorowymi zawierającymi siedem segmentów śród-błonowych jest następujący: NK-2 : M_1 — 38%, NK-2 : M_2 — 34%, NK-2 : β_1 — 39% i NK-2 : rodopsyna — 46%.

II-2. Własności funkcjonalne receptorów

Analiza struktury pierwszorzędowej, receptorów neurokinin wykazała ich znaczną homologię z receptorami związanymi funkcjonalnie z białkami G. Stwierdzono ponadto, że wiązanie substancji P przez rozpuszczony przy pomocy detergentu (CHAPS) receptor było hamowane przez GTP [11]. Inhibicję wiązania ligandu z receptorem NK-1 przez GTP, obserwowano także w innych układach eksperymentalnych, na przykład badając wiązanie znakowanej substancji P z frakcją błonową kory mózgowej szczura czy błonami gruczołów ślinowych [24, 25].

**International Symposium on
Engineering Antibodies for Therapy,
Cardiff, UK, 10-11 September 1992**
Info: Dr J E Liddell, Dept of Biochemistry,
University of Wales, College of Cardiff,
P O B 903, Cardiff CF1 1ST, UK.

Nukleotydy guanylowe regulują powinowactwo receptorów związanych funkcjonalnie z białkami wiązającymi GTP (białka G) powodując dysocjację kompleksów agonista-receptor-białko G i tworzenie kompleksów agonista-receptor. Mechanizm molekularny polega prawdopodobnie na zmianach konformacyjnych w cząsteczce receptora pod wpływem GTP i jego analogów [26]. Wyniki otrzymane przez Nakatę i współautorów [27] pozwalają sądzić, że receptor substancji P (NK-1) występuje w wielu stanach konformacyjnych, charakteryzujących się różnym powinowactwem do związków agonistycznych.

Stwierdzenie wpływu GTP na wiązanie substancji P nie określa jednak układu enzymatycznego związane go funkcjonalnie z tym receptorem. Nie zaobserwowano wpływu substancji P na inhibicję czy aktywację cykazy adenylanowej, lecz istnieją dowody, że receptor NK-1 związany jest z innym układem enzymatycznym. Jest nim fosfolipaza C powodująca hydrolizę fosfatydyloinozytolodifosforanu (PIP_2) i utworzenie z niego dwu związków pełniących funkcję drugiego przekazywacza: diacyloglicerolu (DG) i inozytolotrifosforanu (IP_3). Substancja P stymuluje obrót metaboliczny fosfatydyloinozytoli w mózgowiu, gruczołach ślinowych i jelicie cienkim szczura [28-31]. Fakty te świadczą, że receptor NK-1 jest związany funkcjonalnie z fosfolipazą C.

Receptor NK-2 jako jedyny spośród receptorów neurokinin wykazuje aktywność mitogenną [32]. Skłoniło to badaczy do poszukiwania homologii w strukturze pierwszorzędowej tego receptora i zidentyfikowanych onkogenów. Okazało się, że wykazuje on uderzające podobieństwo do onkogeny *c-mas* [33]. Wyniki badań Jacksona i współautorów [34] wskazują, że produkt onkogeny *c-mas* zlokalizowany w genomie ludzkim na chromosomie szóstym) jest receptorem angiotensyny. Angiotensyna podnosi ciśnienie krwi poprzez zwiększenie siły skurczów serca i zwężenie tętniczek. Peptydowi temu przypisuje się udział w etiologii samoistnego nadciśnienia tętniczego. W związku z tym, poznanie receptora angiotensyny po raz pierwszy daje możliwość farmakologicznej manipulacji produktem onkogeny.

Stopień homologii pomiędzy onkogenem *c-mas* a receptorem NK-2 wynosi 44%. Przypuszcza się także, że podobnie jak receptor NK-2, onkogen *c-mas* związany jest funkcjonalnie z fosfolipazą C powodującą rozpad fosfatydyloinozytoli [22].

Wiadomo obecnie, że układ immunologiczny i neuroendokryny związane są ze sobą funkcjonalnie. Układ immunologiczny i związki przez niego wytwarzane modulują działanie części endokryny ośrodkowego układu nerwowego, a hormony peptydowe układu nerwowego i ich receptory, stanowią składniki systemu immunologicznego. Komórki obu systemów syntetyzują wspólne hormony i posiadają na swej powierzchni receptory dla tych związków. Uważa się, że na poziomie molekularnym układ immunologiczny ma zdolność reagowania podobnie do układu neuroendokryny [35].

III. Rola substancji P w procesach zapalnych

Substancja P jest uważana za neurotransmitter, a jontoforetyczne podanie jej do różnych obszarów mózgowia dowodzi, że działa ona jako transmitter pobudzający. Podobnie jak endogenne związki opiatowe związana jest prawdopodobnie z przewodzeniem bólu [36].

Substancja P spełnia szereg warunków stawianych mediatorom lokalnej odpowiedzi zapalnej. Powoduje rozszerzenie naczyń, zwiększa przepuszczalność ich ścian, wpływa na zlepianie się granulocytów i monocytów ze śródbłonkiem naczyń oraz powoduje degranulację komórek tucznych [37]. Reaguje ona także z receptorem chemotaktycznym granulocytów obojętno-chłonnych, powoduje ich orientację i działa na nie chemotaktycznie [38]. Neuropeptyd ten wykazuje także wpływ chemotaktyczny na monocyty ludzkie już przy stężeniu 10^{-13} M [39]. Sprzyja ponadto wbudowaniu [3 H]-tymidyny w DNA ludzkich limfocytów T [40]. Sugeruje się, że substancja P jest neurotransmitterem uwalnianym z zakończeń nerwów obwodowych w odpowiedzi na lokalne uszkodzenie tkanek [37]. Wykazano ponadto, że neuropeptyd ten jest syntetyzowany i wydzielany przez granulocyty kwasochłonne i makrofagi. Tak więc neurony nie są jedynym źródłem jego pochodzenia [41, 42].

Wykazano udział substancji P w patogenezie niektórych chorób u zwierząt i ludzi. Zwiększone stężenie substancji P w płynach ustrojowych i tkankach dotkniętych chorobą, zdolność zmieniania przez związki działające antagonistycznie w stosunku do substancji P niektórych reakcji immunologicznych, oraz zmiany liczby receptorów substancji P zachodzące podczas procesów chorobowych, świadczą o udziale tego neuropeptydu w etiologii i patogenezie zaburzeń o podłożu zapalnym. Wiele danych wskazuje na udział substancji P w reakcjach nadwrażliwości w skórze i płucach oraz w przewlekłych procesach zapalnych, takich jak zapalenie stawów czy zapalenie jelit.

W doświadczeniach prowadzonych na szczurach stwierdzono, że wywołane sztucznie podaniem adiuwantu zapalenie stawów nasila się po podaniu substancji P [43]. Badania *in vitro* wykazały, że substancja P stymuluje uwalnianie prostaglandyny E_2 i kolagenazy z synowocytów (komórki wydzielające maź stawową) oraz pobudza je do proliferacji [44]. Ponadto stwierdzono, że makrofagi ze zmienionych chorobowo stawów pod wpływem substancji P syntetyzują interleukinę-1 i czynnik nekrozy nowotworów (a-TNF — *tumor necrosis factor*) [45]. Uwolnienie substancji P z zakończeń nerwowych znajdujących się w płucach może spowodować zaostrenie astmy oskrzelowej. Przykładem udziału substancji P w patogenezie astmy jest odruchowy mechanizm aksonalny [46]. Prawdopodobny jest także udział neuropeptydów takich jak substancja P w patogenezie zapalnych chorób jelit [47, 48]. Podczas badania chirurgicznie pobranych wycinków jelita od pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i chorobę Crohna, wykazano znacznie wyższy poziom substancji P w warstwie śluzówkowej i podśluzówkowej jelita, niż

u osobników zdrowych [47]. Badania receptorów substancji P, neurokininy A i neurokininy B w wycinkach jelita pacjentów cierpiących na te choroby wykazały, że gęstość receptorów substancji P (NK-1) jest bardzo duża w tętniczkach, żyłkach i grudek limfatycznych, natomiast receptory neurokininy A (NK-2) i neurokininy B (NK-3) występowały w bardzo małej ilości [48]. Wyniki te dowodzą, że substancja P jest włączona w patogenezę zapalnych chorób jelit oraz wskazują drogi nowych możliwości terapeutycznych przy użyciu np. antagonistów substancji P.

Artykuł otrzymano 5 grudnia 1991 r.

Zaakceptowano do druku 19 grudnia 1991 r.

Piśmiennictwo

1. Lee C-M., Iversen L.L., Hanley M.R., Sandberg B.E.B. (1982), *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharm.*, **318**: 281—287.
2. Laufer R., Wormser U., Friedman Z.Y., Gilan C., Choev M., Selinger Z., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7444—7448.
3. Lee C-M., Campbell N.J., Williams B.J., Iversen L.L., (1986), *Eur. J. Pharm.*, **130**: 209—217.
4. Quirion R., Dam T-V (1985), *Neuropeptides*, **6**: 191—204.
5. Torrens Y., Lavielle S., Chassaing G., Marquet A., Glowinski J., Beaujourn J.C., (1984), *Eur. J. Pharm.*, **102**: 381—382.
6. Cascieri M.A., Liang T., (1984), *Life Sci.*, **35**: 179—184.
7. Buck S.H., Burcher E., Shults C.W., Lovenberg W., O'Donohue (1984), *Science*, **226**: 987—989.
8. Cotrait M., Hospital M., (1986), *Int. J. Prot. Pept. Res.*, **28**: 450—455.
9. McKnight A.T., Maguire J.J., Varney M.A., Williams B.J., Iversen L.L. (1988), *Regul. Pept.* **22**: 126—131.
10. Dam T-V., Escher E., Quirion R., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**: 297—303.
11. Nakata Y., Tanaka H., Morishima Y., Segawa T., (1988), *J. Neurochem.*, **50**: 522—527.
12. Masu Y., Nakayama K., Tamaki H., Harada Y., Kuno M., Nakanishi S., (1987), *Nature*, **329**: 836—838.
13. Yokota Y., Sasai, Tanaka K., Fujiwara T., Tsuchida K., Shigemoto R., Kakizuka A., Ohkubo H., Nakanishi S., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**: 17649—17652.
14. Hershey A.D., Krause J.E., (1990), *Science*, **247**: 958—962.
15. Shigemoto R., Yokota Y., Tsuchida K., Nakanishi S., (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**: 623—628.
16. Sasai Y., Nakanishi S., (1989), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 695—702.
17. Kubo T., Fukuda K., Mikami A., Maeda A., Takahashi H., Mishina M., Haga T., Haga K., Ichiyama A., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Numa S., (1986), *Nature*, **323**: 411—416.
18. Lefkowitz R.J., Caron M.G., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**: 4993—4996.
19. Kobilka B.K., Frielle T., Collins S., Yang-Feng T., Kobilka T.S., Francke U., Lefkowitz R.J., Caron M.G., (1987), *Nature*, **329**: 75—79.
20. Bunzow J.R., Van Tol H.H.M., Grandy D.K., Albert T., Salon J., Christie M., Machida C.A., Neve K.A., Civelli O., (1988), *Nature*, **336**: 783—787.
21. Nathans J., Hogness D.S., (1983), *Cell* **34**: 807—814.
22. Hanley M.R., Jackson T., (1987), *Nature*, **329**: 766—767.
23. O'Dowd B.F., Hnatowitch M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**: 7564—7569.
24. Cascieri M.A., Liang T., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**: 5158—5164.
25. Lee C-M., Javitch J.A., Snyder S.H., (1983), *Mol. Pharm.*, **23**: 563—569.
26. Limbird L.E., (1981), *Biochem. J.*, **195**: 1—9.
27. Nakata Y., Hiraoka C., Segawa T., (1988), *Eur. J. Pharm.*, **152**: 171—174.
28. Watson S.P., (1984), *Biochem. Pharm.*, **33**: 3733—3737.
29. Hanley M.R., Lee C-M., Jones L.M., Michell R.H., (1980), *Mol. Pharm.*, **18**: 78—83.
30. Watson S.P., Downes C.P., (1983), *Eur. J. Pharm.*, **93**: 245—253.
31. Catalan R.E., Martinez A.M., Aragones M.D.,

- Miguel B.G., Robles A., (1988), *Eur. J. Biochem.*, **172**: 547—552.
32. Hanley M.R., (1985), *Nature*, **315**: 11—13.
33. Young D., Waitches G., Birchmeier C., Fasano O., Wigler M., (1986), *Cell*, **45**: 711—719.
34. Jackson T.R., Blair L.A., Marshall J., Goedert M., Hanley M., (1988), *Nature*, **335**: 437—440.
35. Weigent D.A., Blalock J.E., (1987), *Immunological Rev.*, **100**: 79—108.
36. Hokfelt T., Ljungdahl A., Terenius L., Elde R., Nilsson G., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3081—3085.
37. Payan D.G., Levine J.D., Goetzel F.J., (1984), *J. Immunol.*, **132**: 1601—1603.
38. Marasco W.A., Showell H.J., Becker E.L., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**: 1065—1072.
39. Ruff M.R., Wahl S.M., Pert C.B., (1985), *Peptides* **6**: 107—111.
40. Payan D.G., Brewster D.R., Goetzel E.J., (1983), *J. Immunol.*, **131**: 1613—1615.
41. Aliakbar J., Sreedharn S.P., Turck C.W., Goetzel E.J., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **148**: 1440—1446.
42. Pascual D.W., Bost K.L., (1990), *Immunology*, **71**: 52—56.
43. Levine J.D., Clark R., Devor M., Helms C., Moskowitz M.A., (1984), *Science*, **226**: 547—549.
44. Lotz M., Carson D.A., Vaughn J.H., (1984), *Science*, **235**: 893—895.
45. Lotz M., Vaughn J.H., Carson D.A., (1988), *Science*, **241**: 1211—1221.
46. Barnes J.P., (1986), *Lancet*, **1**: 242—245.
47. Koch T.R., Carney J.A., Go V.L.W., (1987), *Dig. Dis. Sci.*, **32**: 369—376.
48. Mantyh C.R., Gates T.S., Zimmerman R.P., Welton M.L., Passaro E.P., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3235—3239.

Kwas retinowy reguluje procesy wzrostu i różnicowania*

Retinoic acid regulates growth and differentiation

JANINA KWIATKOWSKA¹

Spis treści:

- I. Losy kwasu retinowego w organizmie
- II. Aktywność biologiczna kwasu retinowego
- III. Wpływ kwasu retinowego na transkrypcję genów
- IV. Jądrowe receptory kwasu retinowego (RAR)
- V. Komórkowe białka wiążące kwas retinowy (CRABP)

Contents:

- I. Retinoic acid metabolism
- II. Biological activity of retinoic acid
- III. The effect of retinoic acid on gene transcription
- IV. Nuclear retinoic receptors (RAR)
- V. Cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in cytosol

Wykaz stosowanych skrótów:

CAT — transkarbamoilaza asparaginianowa; CRABP — komórkowe białko wiążące kwas retinowy w cytosolu; RA — kwas retinowy; RAR — jądrowy receptor kwasu retinowego; RARE — element wrażliwy na receptor kwasu retinowego; RBP — białko wiążące retinol.

I. Losy kwasu retinowego w organizmie

Powszechnie i od dawna wiadomo, że witamina A reguluje wzrost i różnicowanie wielu tkanek zwierzę-

* Artykuł stanowi rozwinięcie wykładu: „Udział kwasu retinowego w różnicowaniu komórek” wygłoszonego w ramach sympozjum „Molekularna regulacja procesów wzrostu i różnicowania komórek somatycznych” podczas XXVII Zjazdu P.T. Biochem. w Lublinie, 20 września 1999.

¹ Prof. dr hab., Zakład Biochemii Akademii Medycznej, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

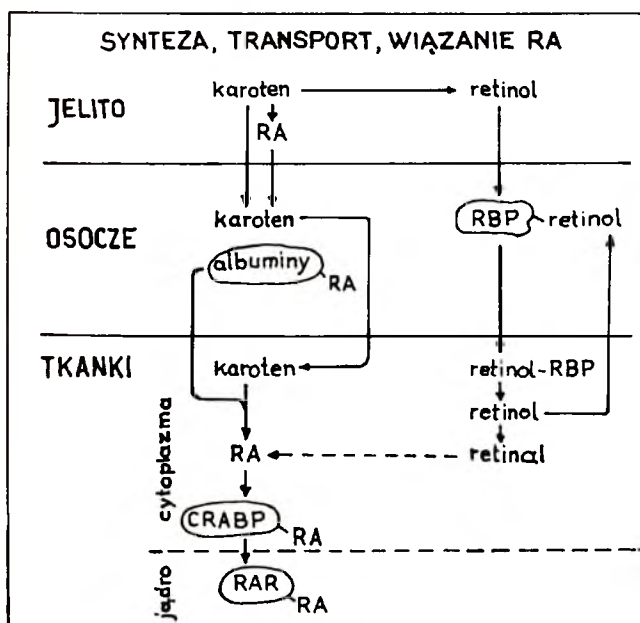
cych i ludzkich, a jej niedobory prowadzą do poważnych zaburzeń tych procesów. Mechanizmy tej regulacji były jednak do ostatniej dekady mało znane. Dziedzina ta pozostawała niejako w cieniu intensywnych badań, które doprowadziły do wyjaśnienia roli witaminy A i retinalu w procesach widzenia. Nie było nawet wiadomo, który z retinoidów, występujących w organizmie jest czynnikiem wzrostowym. Dopiero w 80-tych latach okazało się, że jest nim kwas retinowy (RA), o którym sądzono, że jest tylko końcowym produktem utleniania witaminy A, wydalany z ustroju i nie pełniącym żadnej funkcji fizjologicznej. Wzór kwasu retinowego przedstawia rycina 1.



Rys. 1. Kwas retinowy. I — grupy metylowe.

Obecnie uważa się, że w organizmie istnieją dwie odrębne pule retinoidów: retinol/retinal oraz kwas retinowy. Karoten, który stanowi główne źródło retinoidów w pożywieniu, nie przekształca się w jelitach całkowicie w retinol, ale jest częściowo transportowany w niezmienionej postaci do wątroby, płuc, nerek i innych narządów. Tak w jelitach, jak i innych tkankach 17—54% karotenu może przechodzić w kwas retinowy. Drogi transportu retinolu i RA w

osoczu są różne: ten pierwszy wiąże się ze swoistą glikoproteina, drugi zaś jest transportowany przez albuminy [1]. Inne też białka wiążą oba retinoidy w cytosolu: RBP (*Retinol Binding Protein*) łączy się wybiórczo z retinolem i jego estrami, a CRABP (*Cellular Retinoic acid Binding Protein*) — z kwasem retinowym. Ze wszystkich znanych retinoidów tylko RA ma swoiste receptory jądrowe (RAR — *Retinoic Receptor*). Różnice w gospodarce obu retinoidów przedstawiono na rycinie 2.



Rys. 2. Losy kwasu retinowego w organizmie. RA — kwas retinowy; RBP — białko wiążące retinol; CRABP — komórkowe białko wiążące kwas retinowy; RAR — receptor kwasu retinowego.

II. Aktywność biologiczna kwasu retinowego

Wzmoczone zainteresowanie kwasem retinowym datuje się od czasu, gdy doniesiono, że może on mieć działanie przeciwbiałaczkowe i przeciwnowotworowe. RA, podawany pacjentom z białaczką premieloblastyczną wywoływał, jak informowano, długotrwałe remisje i wyleczenia [2, 3], stymulował też cytotoksyczne działanie limfocytów, podnosił przeciwnowotworową aktywność makrofagów i monocytów, a także hamował wzrost niektórych nowotworów [4, 5]. Obecnie wiemy już, że kwas retinowy jest ważnym morfogenem komórek w życiu płodowym i pozapłodowym.

Zaobserwowano, że po wprowadzeniu znakowanego RA ciężarnym myszom, już od pierwszych dni rozwoju gromadzi się on w komórkach płodu, pochodzących z płytki nerwowej. Od 11 dnia znajduje się go w szczególnie wysokich stężeniach w mózgu tylnym i śródmózgowiu. Początkowo obszar głowy pobiera znacznie więcej RA niż tułów, potem rośnie zawartość w załęczkach kończyn [6]. RA w stężeniu 6×10^{-5} M pobudza różnicowanie i hamuje proliferację ludzkich podniebiennych płodowych komórek mezenchymalnych w hodowli. Podobne działanie wywiera też na

komórki 56-dniowych płodów ludzkich [7]. W płodach myszy RA reguluje chondriogenne różnicowanie komórek mezenchymalnych w czasie rozwoju kończyn, a u amfibii — w trakcie ich regeneracji [8].

Kwas retinowy wywiera wpływ na dzielące się i różnicujące komórki także w dorosłych organizmach, przyczyniając się do zachowania równowagi między procesami proliferacji i różnicowania. Należy jednak podkreślić, że korzystne działanie wymaga ściśle określonych stężeń, musi trwać określony czas i odbywać się w odpowiednich fazach wzrostu organizmu. Zmiana tych warunków może prowadzić do niekształceń tkanek i narządów, deformacji kończyn i kości, rozszczepów podniebienia, defektów pracy serca itp. Duże dawki RA i witaminy A mogą jednak pobudzać wzrost niektórych nowotworów [6, 7].

W wielu publikacjach można znaleźć potwierdzenie hamującego wpływu RA na rozplę komórek prawidłowych i nowotworowych. Działanie takie obserwowano w hodowlach wielu linii komórkowych, a także w doświadczalnych nowotworach u zwierząt, np. płodowej teratokarcinoma F9, karcinoma F6 i P3-13 myszy, melanoma, raku piersi itp. [2, 5, 7]. Wiąże się ono z opóźnieniem, wydłużeniem lub hamowaniem faz cyklu komórkowego. W komórkach NHIK 3025 wydłuża się faza G1, a w komórkach jajnika, adipocytach 3T-3 i melanoma S-91 jest ona całkowicie hamowana. W komórkach mezenchymalnych kwas retinowy blokuje fazę G2, a w komórkach raka piersi — fazę S. Trzeba tu dodać, że oprócz zahamowania proliferacji komórek, przeciwnowotworowe działanie RA może mieć też inny mechanizm. Stwierdzono, że RA pobudza uwalnianie TNF (Czynnik Nekrozy Nowotworów) z monocytów, aktywuje przeciwnowotworowe działanie limfocytów i leukocytów [4].

Kwas retinowy stymuluje różnicowanie komórek wielu typów. Wspomniano już o jego działaniu na dojrzewanie premyeloblastów. W hodowlach ludzkich komórek białaczkowych HL-60 i erytroleukemii Frienda kwas retinowy indukuje różnicowanie premyeloblastów do granulocytów i monocytów. W mysiej linii ML-1 RA pobudza utworzenie granulocytów, ale przejście w makrofagii i monocyty wymaga dodatkowego kalcydiolu [9]. RA jest niezbędny w różnicowaniu osteoblastów, keratynocytów nabłonka, fibroblastów i spermatocytów [5, 10, 11, 12]. Pod wpływem kwasu retinowego komórki teratokarcinoma F9 przechodzą w prymitywne formy endodermopodobne, a do dalszego ich różnicowania potrzebna jest dodatkowo obecność cAMP. Wielu autorów wyraża pogląd, że RA działa szczególnie aktywnie na mało zróżnicowane komórki, we wczesnych stadiach różnicowania [5].

III. Wpływ kwasu retinowego na transkrypcję genów

Pobudzanie różnicowania przez RA wiąże się z jego wpływem na transkrypcję genów kodujących takie białka, których pojawienie się lub znaczne zwiększenie syntezy towarzyszy różnicowaniu. Wykazano przy

tym, że zachodzi istotnie stymulacja syntezy mRNA, bez wpływu na jego czas przeżycia. W makrofagach i komórkach mieloidowych RA indukuje transkrypcję genu transglutaminazy. Ilość mRNA wzrasta 10 do 20-krotnie, a enzymu — 100-krotnie [13]. W preosteoblastach RA pobudza syntezę fosfatazy alkalicznej i cykazy adenylanowej, a w fibroblastach i keratynocytach nabłonka — kolagenu IV [10, 14, 15]. W hodowlach fibroblastów nerkowych NRK kwas retinowy wyraźnie przyspiesza i wzmacnia transkrypcję genu EGF. Wykazano, że wzrasta ilość mRNA oraz samego czynnika wzrostowego. Jest to działanie wybiórcze, gdyż jak stwierdzono, RA nie wykazywał żadnego wpływu na ekspresję genów tubuliny, fibronektyny i innych białek [16].

Wielu informacji o działaniu RA dostarczają badania przeprowadzane na hodowlach komórkowych mysiej teratokarcinoma F9. Komórki te, podobne do komórek wewnętrznej masy wczesnego płodu myszy, można utrzymywać *in vitro* w postaci homogennej populacji. Po 2—3 dobach po podaniu RA obserwuje się w nich indukcję ekspresji genów kolagenu I i IV, lamininy, aktywatora plazminogenu, receptora parathormonu, β -adrenergicznego oraz białka G_s . Jak widać, RA reguluje syntezę białek strukturalnych i regulatorowych [5, 14, 17, 18]. W różnicujących się komórkach mysiej płodowej karcinoma F6 DC-13 kwas retinowy indukuje syntezę dwu glikolizowanych białek błonowych, LAMP-1 i LAMP-2 [19].

Wszystkie niżej wymienione białka, oraz kodujące je mRNA pojawiają się w komórkach co najmniej po upływie 48 godz. po podaniu RA. Natomiast bardzo szybko, bo już po kilku godzinach daje się zauważyć 35-krotny wzrost zawartości cząsteczek mRNA o wielkości 2,2—2,4 kilozasad. Nie ustalono jeszcze, jakie białko koduje ów mRNA, ale przypuszcza się, że może ono grać rolę w kontroli ekspresji genów białek, pojawiających się po 48 godz. [15].

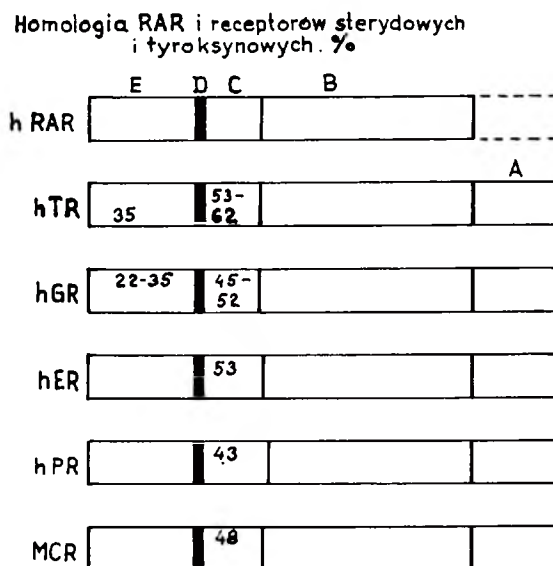
RA może powodować także supresję transkrypcji niektórych genów, np. sulfotransferazy cholesterolowej i keratyn K1 i K10 w keratynocytach ludzkich, czy antygeny powierzchniowego SSEA-1 i białka G_i w teratokarcinoma F9 [11, 5].

IV. Jądrowe receptory kwasu retinowego (RAR)

Wyraźny wpływ, wywierany przez RA na ekspresję genów nasuwał przypuszczenie, że mechanizm działania RA może być podobny do mechanizmu działania steroidów i tyroksyny, a w takim razie mogą w nim brać udział receptory jądrowe. Receptory takie zostały istotnie odkryte w 1987 r. Gen receptora kwasu retinowego (RAR) został znaleziony w kartotece genowej komórek ludzkiej wątroby, nerek, płuc, jąder i innych tkanek. Posłużono się przy tym, jako sondą, odcinkiem mRNA receptora glukokortykoidów, kodującym domenę wiążącą DNA. Produkt białkowy wyodrębnionego w ten sposób genu miał masę cząsteczkową około 50 kDA i silnie wiązał RA [20].

Receptory jądrowe RA wykazują duże podobieństwo strukturalne do receptorów tyroksyny i hormo-

nów sterydowych. Podobnie jak w tych ostatnich wiążąca ligand domena E znajduje się w RAR na C-końcu łańcucha polipeptydowego. Dalej ku N-końcowi mieści się niewielka łącznikowa domena D, następnie domena C, wiążąca DNA i domeny A i B, lub tylko B (przypuszczalnie regulatorowe). Tak w RAR, jak i receptorach steroidów i tyroksyny, domena C składa się z 66—72 reszt aminokwasowych. Mieszczą się w niej dwie konserwatywne reszty Cys, oraz dwa tzw. palce cynkowe, bogate w lizynę. Obecność motywów zwanych palcami cynkowymi jest charakterystyczna dla białek wiążących się z DNA. Domena C RAR wykazuje około 50% homologii strukturalnej z domenami C receptorów hormonów sterydowych i tyroksyny (patrz schemat na rycinie 3).



Rys. 3. Homologia receptorów kwasu retinowego, steroidów i tyroksyny (w %). A, B, C, D, E — domeny receptorów; hRAR — ludzki receptor kwasu retinowego; hTR — ludzki receptor tyroksyny; hGR — ludzki receptor glukokortykoidów; hER — ludzki receptor estrogenów; hPR — ludzki receptor progesteronu; MCR — receptor mineralokortykoidów.

Chimera genowa, w której odcinek genu receptora estrogenów, kodujący domenę E zastąpiono odpowiednim odcinkiem genu RAR kodowała białko, które podobnie jak receptor estrogenów indukowało syntezę transkarbamoylasy asparaginowej (CAT), ale wiązało silnie RA i działało aktywnie w kompleksie z nim. W dobrze znanym układzie indukcji syntezy CAT wykazano, że transaktywacja receptora przez RA zachodzi już w stężeniach liganda rzędu 10^{-9} /M, a optymalnie przy stężeniu liganda rzędu 10^{-8} /M. Jest to zakres stężeń równy temu, w jakim RA działa jako morfogen, np. w rozwoju kończyny płodu, czy różnicowaniu komórek teratokarcinoma F9. W takim też zakresie stężeń przejawia się wpływ RA na transkrypcję. Efekt retinolu był widoczny dopiero w 100-krotnie wyższych stężeniach [21].

Jądrowe receptory RA występują w kilku izoformach. W tkankach ludzi i myszy występują trzy główne typy RAR: α , β i γ , przy czym α — w postaci kilku podtypów. Łańcuchy polipeptydowe tych trzech ty-

pów zbudowane są z 466 reszt aminokwasowych. Domeny C, wiążące DNA wykazują 97% wzajemnej homologii, a domeny E — 75%. Wydaje się, że geny tych trzech podtypów pochodzą z wspólnego genu-przodka [8, 12, 22]. Poszczególne typy RAR różnią się między sobą powinowactwem do RA. Można przypuszczać, że mają też nieco odmienne funkcje, na co wskazuje ich różne rozmieszczenie w tkankach i odmienne proporcje ilościowe w różnych fazach rozwoju płodu [23]. W nie zróżnicowanym załączku kończyn płodu myszy do 10 dnia geny RAR α i RAR γ są transkrybowane równomiernie w całym zawiązku, a gen RAR β — tylko w regionach obwodowych. Po 12 dniu, w stadium przedchrząstkowej blastemy, RAR β występuje tylko w części środkowej, a w stadium kostnienia i formowania palców — tylko w mezenchymalnym regionie międzypalcowym. W tym stadium rozwoju RAR α znajduje się w mięśniach i skórze, a RAR γ — w nabłonku, skórze i chrząstkach. Wydaje się, że RAR γ pełni funkcję w chondrogeniezie i różnicowaniu skóry, a RAR β — w obumieraniu komórek [24]. U *Naphthalmus viridiscens*, po amputacji kończyn obserwowano wzmożone wyrażanie się genów wszystkich trzech typów RAR w regionie regeneracji [25]. W hodowlach keratynocytów znaleziono jedynie RAR α i RAR β , brak zaś RAR γ [11]. Ten ostatni znaleziono w skórze dorosłych osobników [12, 26]. W komórkach Sartoliego w jądrach wykryto mRNA RAR α i RAR β . W 8-mym dniu spermatogenezy ilość mRNA RAR α wzrasta 7-krotnie, można więc sądzić, że receptor ten odgrywa główną rolę przed pojawieniem się dojrzałych spermatocytów [12].

Napływają doniesienia o występowaniu innych typów RAR. W genomie łożyska ludzkiego znaleziono gen kodujący RAR ϵ . Gen ten jest wyrażany w wielu tkankach typu nabłonkowego. W genomie komórek raka wątroby jest on zlokalizowany w pobliżu obszaru integracji wirusa *hepatitis B* i może być przez ten wirus aktywowany. Masa cząsteczkowa RAR ϵ wynosi 50 kDa, zbudowany jest z 448 reszt aminokwasowych. N-końcowy odcinek jest krótszy niż w innych typach i nie zawiera domeny A. Domena C wykazuje 97% homologii z głównymi typami RAR i 55% — z receptorami tyroksyny i estrogenu. Homologia domeny E z innymi typami RAR dochodzi do 88%. RAR ϵ występuje też w tkankach szczura [27].

W liniach komórkowych wątroby i nerek ludzkich znaleziono nowy typ RAR-X, zbudowany z 462 reszt aminokwasowych. Domena C jest homologiczna z RAR α w 61%, a domena E — jedynie w 22%. Wydaje się, że RAR-X należy zakwalifikować do innej rodziny receptorów RA niż główne typy. Wykazuje natomiast około 50% homologii domeny C z receptorami glukokortykoidów i tyroksyny [22].

W komórkach ludzkiej linii komórek raka piersi znaleziono RAR_{bc}. Jest on zbudowany z 432 reszt i nie ma domeny A. Domena C jest w 62% homologiczna z receptorem tyroksyny, w 59% — z receptorem estrogenów, w 48% — mineralokortykoidów, 45% — glikokortykoidów i 43% — progesteronu [21].

Kwas retinowy wiąże się receptorami kowalencyjnie, za pomocą wiązania tioestrowego. Dawcą reszty retinylowej jest retinyl-CoA [37].

Ekspresja genów, kodujących RAR może być pod kontrolą kwasu retinowego, a ściślej — jego kompleksu z odpowiednim receptorem. RA indukuje syntezę RAR β i RAR ϵ w komórkach wątroby i teratocarcinoma F9. W tych komórkach transkrypcja genu RAR α jest konstytutywna i nie zależy od RA [23]. Inaczej w komórkach jąder — tam retinoidy pobudzają ekspresję genu RAR α . Poziom mRNA tego receptora wzrasta 3-krotnie pod wpływem RA, przy niezmięnionej zawartości mRNA RAR β [12]. Także w keratynocytach ludzkich nie obserwowano indukcji syntezy RAR β przez kwas retinowy [11, 26].

Analizując budowę promotora sklonowanego ludzkiego genu RAR β , indukowanego przez RA stwierdzono, że element wrażliwy na ten ligand (RARE, *Retinoic Acid Receptor-specific Element*) jest zlokalizowany w regionie przyległym do bloku TATA. Element ten jest aktywowany przez endogeny kompleks RAR β -RA. Nie reaguje na receptor tyroksyny, a z kompleksem RAR γ -RA wiąże się wprawdzie silnie, ale jest przezeń bardzo słabo aktywowany. Wyraźnie więc daje się zauważyć selektywność odbioru sygnału przez RARE, nie zależną od strukturalnych podobieństw receptorów, ani nawet od zdolności ich wiązania. W sekwencji nukleotydowej RARE widać powtarzającą się symetrię. Jej zachowanie jest niezbędne dla wrażliwości na RAR β -RA, co może sugerować, że kompleks ten wiąże się w postaci dimeru, podobnie jak receptory steroidów [28].

W przypadku indukcji transkrypcji innych genów, np. aktywatora plazminogenu, RAR-RA może przyłączać się w regionie bliskim do bloku GC promotera, w pobliżu miejsca, gdzie wiąże się czynnik transkrypcyjny SP1 [18].

V. Komórkowe białka wiążące kwas retinowy (CRABP) w cytosolu

Odkrycie receptorów jądrowych było wielkim krokiem naprzód w rozumieniu działania RA jako morfogenu. Dawniej już jednak było wiadomo, że istnieją także cytoplazmatyczne receptory, tzw. CRABP. Są to niewielkie białka, zbudowane z około 130 reszt aminokwasowych, strukturalnie podobne do białek wiążących kwasy tłuszczowe. Nie wykazują żadnej homologii z RAR [20]. W mysich płodach, w ludzkich keratynocytach i komórkach mieloidowych synteza CRABP jest indukowana przez RA [6, 11, 13, 24], a w macicy myszy — przez RA i przez progesteron [29]. W czasie rozwoju płodu myszy rozmieszczenie CRABP zmienia się. Do 12 dnia CRABP znajduje się w warstwie ektodermalnej, a później — w obwodowych warstwach chrząstek, nie występuje natomiast w mięśniach i naskórku [24]. W nie zróżnicowanych keratynocytach ludzkich znaleziono jedynie ślady CRABP, ale w trakcie różnicowania poziom CRABP wzrastał gwałtownie [11].

Uważa się, że CRABP uczestniczy w transporcie i magazynowaniu RA, jednak pełne znaczenie roli receptorów cytosolowych nie jest wyjaśnione. Początkowo sądzono, że zadaniem CRABP jest przenoszenie reszt retinylowych do jądra i przekazywanie ich re-

ceptorom jądrowym. Okazało się jednak, że niektóre komórki, wrażliwe na RA, np. białaczkowe HL-60 w ogóle nie mają CRABP. Być może, wiążąc RA, CRABP kontrolują ilość wolnych reszt retinylowych, zdolnych do przechodzenia do jądra i w ten sposób zmniejszają dostępność tych reszt dla RAR. Przy niewłaściwym stosunku CRABP do RAR, a także przy wysokich stężeniach RA, przekraczających pojemność CRABP, może dochodzić do nadmiernego wpływu RA na proliferację i różnicowanie, co prowadzi do efektów teratogennych, deformacji i kancerogenezy [6, 11, 30].

Niektórzy badacze uważają, że w działaniu RA na procesy wzrostu i różnicowania pośredniczą powierzchniowe gangliozydy, m.in. neolaktogangliozydy. Mutanty komórek HL-60, które utraciły wrażliwość na RA mają uderzająco niski poziom tych gangliozydów. Oczyszczone gangliozydy powierzchniowe hamują proliferację. Niewiele jednak da się powiedzieć o mechanizmach powiązania RA — gangliozydy [30].

Jak widać z tego krótkiego przeglądu, w ostatnich latach dowiedziano się bardzo wiele o drogach działania kwasu retinowego na procesy wzrostu i różnicowania, wiele jednak pozostaje nadal do zbadania i wyjaśnienia.

*Artykuł otrzymano 5 grudnia 1991 r.
Zaakceptowano do druku 9 grudnia 1991 r.*

Piśmiennictwo

1. Napoli J. L., Race K. R. (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**: 17372—17377.
2. Wathne K. O., Norum K. R., Smeland E., Blomhoff R. (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**: 8691—8695.
3. Takahashi N., Breitman T. R. (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**: 5159—5163.
4. Turpin J., Mehta K., Blick M., Hester J. P., Lopez-Berenstein G. (1990), *J. Leukocyte. Biol.*, **48**: 444—450.
5. Galvin-Parton P. A., Watkins D. C., Malbon C. C. (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**: 17771—17779.
6. Dencker L., Annerwall E., Busch C., Eriksson U. (1990), *Development.*, **110**: 343—352.
7. Watanabe T., Willis D. W., Pratt R. M. (1990), *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **36**: 311—325.
8. Brockes J. (1990), *Nature.*, **345**: 766—767.
9. Haškovec C., Lemež P., Neuwirtowa R., Wilhelm J., Jarolim P. (1990), *Neoplasma.*, **37**: 565—572.
10. Rodan S. B., Wesolowski G., Hilton D. J., Nicola N. A., Rodan G. A. (1990), *Endocrinology.*, **127**: 1602—1608.
11. Jettan A. M. (1990), *J. Invest. Dermatol.*, **95**: Suppl 44S—46S.
12. Kim K. H., Griswold M. D. (1990), *Mol. Endocrinol.*, **4**: 1679—1688.
13. Chiocca E. A., Davies P. J. A., Stein J. P. (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**: 11584—11589.
14. Wang S. Y., Roguska M. A., Gudas L. J. (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**: 15556—15564.
15. La Rosa G. J., Gudas L. J. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 329—333.
16. Thompson K. L., Rosner M. R. (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**: 3230—3234.
17. Chan S. D. H., Strewler G. J., Nissenson R. A. (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**: 20081—20084.
18. Darrow A. L., Rickles R. J., Pecorino L. T., Strickland S. (1990), *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 5883—5893.
19. Amos B., Lotan R. (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**: 19192—19198.
20. Giguere V., Ong E. S., Seigi P., Evans R. M. (1987), *Nature*, **330**: 624—629.
21. Petkovich M., Brand N. J., Krust A., Chambon P. (1987), *Nature*, **330**: 444—450.
22. Mangelsdorf D. J., Ong E. S., Dyck J. A., Evans R. M. (1990), *Nature*, **345**: 224—229.
23. de Thé H., Marchio A., Tiollais P., Dejean A. (1989), *EMBO J.*, **8**: 429—433.
24. Dolle P., Ruberte E., Kastner P., Petkovich M., Stoner C. M., Gudas L. J., Chambon P. (1989), *Nature*, **342**: 702—705.
25. Giguere V., Ong E. S., Evans R. M., Tabin C. (1989), *Nature*, **337**: 566—569.
26. Zelent A., Krust A., Petkovich M., Kastner P., Chambon P. (1989), *Nature*, **339**: 714—717.
27. Benbrook D., Lenhardt E., Pfahl M. (1988), *Nature*, **333**: 669—672.
28. Hoffmann B., Lehmann J. M., Zhang X., Hermann T., Husmann M., Graupner G., Pfahl M. (1990), *Mol. Endocrinol.*, **4**: 1727—1736.
29. Clawriter J., Trout W. E., Burke M. G., Araghi S., Roberts R. M. (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**: 3248—3255.
30. Kitagawa S., Nojiri H., Nakamura M., Galagher R. E., Saito M. (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**: 16149—16154.

"Bioinorganic and Biotechnological Aspects of Environmental Chemistry"

Florence, 23 - 29 August 1992

The European Environmental Research Organization (EERO) conference 1992 will deal with microbiological pathways of degradation, characterization of the enzymes involved, and on the role of metal ions in the function and inhibition of these processes.

For further information please contact:

**Prof. Ivano Bertini, Department of Chemistry, University of Florence
Via G. Capponi 7, 50121 Florence, Italy
Tel.: (055) 2757549, Fax: (055) 2757555, E-mail: Bertini at Ifichim.**

Modyfikacje procesów mutagenезy i kancerogenезy chemicznej przez syntetyczne przeciwutleniacze fenolowe na przykładzie butylohydroksyanizolu

Modifications of chemical mutagenesis and carcinogenesis by the synthetic phenolic antioxidants represented by butylated hydroxyanisole

KRZYSZTOF DEMKOWICZ-DOBRAŃSKI¹
EWA E. HENNIG²

Spis treści:

- I. Metabolizm i toksyczność BHA
- II. BHA jako związek hamujący kancerogenезę i mutagenезę chemiczną
 - II-1. Zapobieganie aktywacji metabolicznej prokancerogenu przez BHA
 - II-2. Bezpośrednie interakcje pomiędzy kancerogenem a BHA
 - II-3. Podwyższanie metabolicznej detoksykacji kancerogenu przez BHA
- III. Kancerogenne działanie BHA

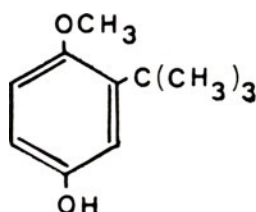
Contents:

- I. Metabolism and toxicity of BHA
- II. BHA as an inhibitor of chemical carcinogenesis and mutagenesis
 - II-1. BHA prevention of the metabolic activation of procarcinogen
 - II-2. Direct interaction of BHA with carcinogen
 - II-3. The increase of detoxification pathways by BHA
- III. Carcinogenic properties of BHA

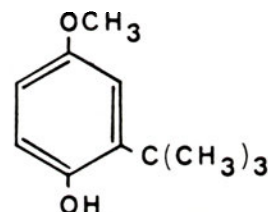
Wykaz stosowanych skrótów:

BHA — 2(3)-tert-butyl-4-metoksyfenol; BP — benzo(a)piren; EDBP — 9-10-epoksy-7,8-dihydrokso-7,8,9,10-tetrahydro-benzo(a)piren; HE — hydrolaza epoksydowa; OMF — oksydazy o mieszanej funkcji; RCh — dehydrogenaza NAD(P)H-chinon; SAG — S-arylotransferaza glutationowa.

Do związków, które mogą obniżać rakotwórcze działanie kancerogenów chemicznych zalicza się związki przeciwutleniające o bardzo różnej budowie chemicznej. Wśród nich ważną grupę stanowią syntetyczne, alkilowane pochodne fenolowe, a w tej liczbie butylohydroksyanizol (BHA), którego handlowe preparaty składają się z dwóch strukturalnych izomerów (Ryc. 1), a także butylohydroksytoluen, hydroksyanizol, butylohydrochinon, 4-metoksyfenol i 2,6-di-tert-butylfenol. Badania ostatnich lat dowiodły jednak, że niektóre z tych związków — a w tej liczbie



2-BHA



3-BHA

Ryc. 1. Struktura chemiczna 2- i 3-tert-butyl-4-metoksyfenolu (butylohydroksyanizolu)

BHA — mogą wywoływać efekt wręcz odwrotny: wywoływać nowotwory i podnosić działanie nowotworowe innych chemicznych kancerogenów.

Jak dotąd BHA jest ciągle stosowany jako dodatek konserwujący do żywności, ponieważ zapobiega autoutlenianiu nienasyconych kwasów tłuszczowych. Jego działanie polega na wychwytywaniu i neutralizacji wolnych rodników, tworzących się w tym procesie [1]. Szacuje się, że dzienne spożycie BHA wynosi mniej niż 0,4 mg/kg masy ciała [2].

I. Metabolizm i toksyczność BHA

W badaniach z użyciem frakcji mikrosomalnej wątroby szczurów i myszy stwierdzono powstawanie dwóch głównych metabolitów: 3-tert-butyl-4,5-dihydroksyanizolu i tert-butylhydroksychinonu. BHA jest głównie usuwany z moczem w postaci glukuronidów. Stwierdza się również mniejsze ilości związku sprzęganego z glutationem, w postaci siarczanów, jak i w formie niezmetabolizowanej [3].

Dopiero w połowie lat osiemdziesiątych zaczęły ukazywać się doniesienia wskazujące na toksyczne działanie BHA. Stwierdzono, że podawanie paszy

^{1,2} dr n.farm.; Akademia Medyczna, Zakład Badania Środowiska, 02-097 Warszawa ul. Banacha 1

Tabela 1.

Obniżanie przez BHA toksyczności ostrej związków chemicznych

związek toksyczny	gatunek	badany parametr	piśmiennictwo
dimetylobenzo(a) antracen	mysz	śmiertelność	10
	szczur	martwica nadnerczy	10
octan metyloazoksymetylu	mysz	martwica nadnerczy	11
	mysz	martwica wątroby	11
4-acetamidofenol	mysz	uszkodzenie wątroby	12–14
butylohydroksytoluen	mysz	uszkodzenie płuc	15
bromobenzen	mysz	śmiertelność	13
	mysz	uszkodzenie wątroby	13
czterochlorek węgla	mysz	śmiertelność	14
	mysz	uszkodzenie wątroby	14
dietylonitrozoamina	szczur	śmiertelność	16
2-acetyloaminofluoren	szczur	przednowotworowe zmiany w wątrobie	17
metanosulfonian etylu	mysz	śmiertelność	18
alkaloidy pirolizydynowe z <i>Senecio longilobus</i>	mysz	śmiertelność	19
alkaloidy pirolizydynowe z <i>Senecio jacobaea</i>	szczur	śmiertelność	20
	szczur	patologiczne zmiany w wątrobie	21

zawierającej 1–2% BHA powodowało wzrost aktywności mitotycznej oraz hiperplazję nabłonka przedżołądka gryzoni [4]. Podawany *per os* myszom ($DL_{50} \approx 2$ g/kg) wywoływał hipertrofię i hiperplazję wątroby, czemu towarzyszył wzrost syntezy DNA, RNA i białka [5, 6]. Obserwowano także, że BHA szczepiony szczurom dootrzewnowo ($DL_{50} \approx 1$ g/kg) w dawce powyżej 384 mg/kg powoduje krwotoki płucne [7]. Wykazano jego cytotoksyczność dla komórek chemicznych V-79, komórek ludzkich linii P388 i KB oraz izolowanych hepatocytów szczurzych [8, 9].

Wymienione dotąd niekorzystne skutki podawania BHA mają miejsce przy stosowaniu tego związku w wysokich stężeniach. W mniejszych stężeniach wykazuje on działanie wręcz odwrotne, obniżając toksyczność ostrą wielu związków chemicznych (Tab. 1).

II. BHA jako związek hamujący kancerogenezę i mutagenezę chemiczną

W 1972 roku Wattenberg i współautorzy zapoczątkowali serię badań nad przeciwnowotworowym działaniem BHA [10]. W większości tego rodzaju doświadczeń stwierdzono, że BHA hamuje procesy kancerogenezy chemicznej jeśli jest podawany przed lub równoległe z kancerogenem (Tab. 2). Zwykle przeciwutleniacz podawany był zwierzętom w paszy (0,5–0,75%) od ok. 1 tygodnia przed aż do zakończenia ekspozycji na kancerogen. Na podstawie powyższych badań stwierdzono, że BHA obniża właściwości nowotworowe głównie kancerogenów wymagających aktywacji oraz, że droga podania kance-

Tabela 2.

Hamowanie procesów kancerogenezy chemicznej przez BHA podawany równocześnie lub krótko przed kancerogenem

kancerogen	gatunek	narząd, tkanka	piśmiennictwo
benzo(a)piren	mysz	przedżołądek	10, 22, 23
	mysz	płuca	24–26
7, 8-dihydroksyBP	mysz	płuca, przedżołądek, tkanki limfoidalne	23
7, 12-dimetylobenzo(a)-antracen	mysz	przedżołądek	10
	mysz	płuca	24
	mysz	skóra	27
dibenzo(a, h)antracen	szczur	gruczoł sutkowy	10, 28
	mysz	płuca	24
dietylonitrozoamina	mysz	płuca	29
7-hydroksymetylo-12-metylobenzo(a)-antracen	mysz	płuca	24
aflatoksyna B ₁	szczur	wątroba	30
N-nitrozodimetyloamina	mysz	płuca	31
octan metyloazoksymetylu	mysz	płuca	32, 33
azoksymetylu	mysz	jelito	32–34
tlenek 4-nitrochinoliny	mysz	płuca	29
uretan	mysz	płuca	24, 25
azaseryna	szczur	trzustka	35
ciprofibrat	szczur	wątroba	36

Tabela 3.

Hamowanie procesów kancerogenezy chemicznej przez BHA podawany po zakończeniu narażenia na kancerogen

kancerogen	gatunek	narząd	piśmiennictwo
dichlorowodorek 1, 2-dimetylohydrazyny	mysz	jelito grube	37
benzo(a)piren	mysz	płuca	25
dietylonitrozoamina	szczur	wątroba	38
	chomik	wątroba	39
dibutylnitrozoamina	chomik	wątroba	39
2, 2'-diokso-N-nitrozo dipropyloamina	chomik	trzustka, wątroba	40
N-etylo-N-hydrokso- etylonitrozoamina	szczur	wątroba	41
dimetylobenzo(a)antracen	szczur	gruczoł sutkowy	28

rogu i przeciwutleniacza nie musi być taka sama.

Przedstawione zależności czasowe podania kancerogenu i przeciwutleniacza sugerują, że działanie BHA dotyczy wczesnych etapów kancerogenezy, związanych z inicjacją nowotworową. W ostatnich latach ukazały się jednak prace wskazujące, że przeciwutleniacz ten hamuje procesy nowotworzenia, także gdy jego podawanie w diecie zostanie rozpoczęte już po zakończeniu ekspozycji na kancerogen (Tab. 3).

Stwierdzono, że oprócz właściwości przeciwnowotworowych BHA może również wykazywać działanie hamujące mutagenność wielu związków chemicznych *in vitro* [42] lub *in vivo* [43].

Powyższe wyniki wskazują, na złożoność działania przeciwnowotworowego i przeciwmutagennego BHA. Poddawanych jest pod dyskusję [44] kilka niezależnych mechanizmów działania tego przeciwutleniacza, które zostaną omówione poniżej.

II-1. Zapobieganie aktywacji metabolicznej prokancerogenu przez BHA

Oksydazy o mieszanej funkcji (OMF) to enzymy powodujące — w większości wypadków — aktywację prokancerogenu do rakotwórczego metabolitu. Wpływ BHA na aktywność OMF jest niejasny i różny w zależności od układu badawczego. BHA podawany w diecie, w zależności od użytego substratu, obniża, nie zmienia lub podwyższa aktywność OMF [45—47].

Również analiza ilości cytochromu P-450 nie dostarcza jednoznacznych informacji; podawanie zwierzętom BHA w paszy obniża [45], nie zmienia [47] lub podnosi [48] zawartość cytochromu P-450. Brak korelacji pomiędzy zmianami ilości cytochromu P-450 a aktywnością OMF sugerują, że BHA zmienia ilościowo różne formy cytochromu P-450. Wskazuje na to dodatkowo kilka faktów: a) odmiennie widma spektralne kompleksu cytochromu P-450 z izocyjanidem etylu [49]; b) wzrost wrażliwości na hamowanie aktywności cytochromu P-450 wywołane α -naftoflawnem [49]; c) zmiany w metabolizmie benzo(a)pirenu (BP) [26, 27, 47]; d) obniżenie wiązania metabolitów BP z DNA i z innymi wielkocząsteczkowymi składnikami komórki *in vitro* i *in vivo* [26, 27, 45, 47, 48].

Sądzi się, że zmiany w metabolizmie BP mogą być jedną z przyczyn obniżenia wiązania się reaktywnych

metabolitów BP z DNA. Z kolei wielkość wiązania BP z DNA dobrze koreluje z obniżeniem przez BHA ilości nowotworów płuc i przedłożadka myszy wywołanych podaniem BP [48]. Generalnie można stwierdzić, że BHA obniża całkowity metabolizm BP [26, 27, 47] oraz powoduje procentowy wzrost ilości metabolitów BP nie wykazujących rakotwórczych właściwości [50].

Na zmianę metabolizmu prokancerogenów, prócz zmian ilościowych form cytochromu P-450, mogą mieć wpływ inne modyfikacje w obrębie układu OMF. Reduktaza NADPH-cytochrom P-450 nie tylko może redukować cytochrom P-450, ale także pewne metabolity prokancerogenów, np. chinony BP [51]. Podawanie BHA zwierzętom zwiększa aktywność tej reduktazy, a także dodatkowo ilość cytochromu b_5 [52].

Nie można również wykluczyć wpływu bezpośredniej interakcji BHA z cytochromem P-450 na metabolizm związków rakotwórczych. Wielu autorów [26, 42, 44, 53, 54] zakłada, że BHA może wiązać się z cytochromem P-450 lub z kompleksem cytochrom P-450 substrat, powodując obniżenie szybkości lub zmianę rejonu hydroksylacji ksenobiotyku. Przemaszają za tym następujące fakty: a) BHA i jego metabolity są obecne we frakcji mikrosomalnej hepatocytów mysich po długoterminowym podawaniu [50]; b) BHA tworzy z cytochromem kompleks dający widmo spektralne typu I [53]; c) BHA *in vitro* kompetencyjnie i niekompetencyjnie hamuje aktywność OMF [54]; d) BHA *in vitro* hamuje niekompetencyjnie metabolizm 7,8-dihydrokso BP [55] natomiast nie ma wpływu na wiązanie rakotwórczego epoksydiolu BP (EDBP) z DNA *in vitro* [56—56]; e) BHA obniża *in vitro* mutagenne właściwości BP [42] oraz wiązanie BP z DNA [53].

Przedstawione tu wyniki na przykładzie BP sugerują, że BHA może modyfikować aktywację prokancerogenu w dwojaki sposób: bądź poprzez bezpośrednie oddziaływanie na cytochrom P-450 bądź pośrednio, poprzez selektywną modyfikację elementów systemu OMF.

Phytochemical Society of Europe Meeting on „Seed Storage Compounds: Biosynthesis, Interactions and Manipulation”,
Bristol, UK, 7-9 September 1992
Info: Professor P R Shewry,
Long Ashton Research Station,
Long Ashton, Bristol BS18 9AF, UK.

II-2. Bezpośrednie interakcje pomiędzy kancerogenem a BHA

Jak wspomniano wcześniej, BHA zapobiega autooksydacji kwasów tłuszczowych wychwytyjąc i neutralizując wolne rodniki tworzące się w tym procesie [1]. Nie można więc wykluczyć, iż związek ten może reagować z innymi wolnymi rodnikami, wykazującymi właściwości rakotwórcze.

Wykazano, że BHA może wchodzić w interakcje z rodnikami 6-fenoksy BP [57] oraz tworzyć kompleksy z metyloazoksymetanołem [58]. Z drugiej strony, BHA nie ma właściwości zapobiegania wiązania się EDBP z DNA co mogłoby sugerować, że interakcja bezpośrednia między tymi związkami nie jest możliwa [56]. Gdyby mechanizm wyłapywania wolnych rodników przez BHA lub tworzenia kompleksów z kancerogenem miał istotny wpływ na jego właściwości antynowotworowe, związek ten wykazywałby niespecyficzne działanie przeciwnowotworowe. Tak jednak nie jest, mimo że stwierdza się obecność tego związku w narządzie lub tkance podlegającej procesowi kancerogenezy chemicznej.

II-3. Podwyższanie metabolicznej detoksykacji kancerogenu przez BHA

Karmienie zwierząt BHA powoduje indukcję aktywności wielu enzymów zlokalizowanych głównie w wątrobie, ale również w innych narządach i tkankach [44].

S-arylotransferazy glutationowe (EC.2.5.1.18.) (SAG) katalizują reakcje wiązania wielu elektrofilowych i lipofilowych związków z glutationem. Reakcja ta jest uważana za jedną z głównych dróg prowadzących do wydalania ksenobiotyków, a zarazem za sposób ochrony komórki przed uszkodzeniami wywołanymi związkami elektrofilowymi. BHA podwyższa aktywność SAG w stosunku do różnych substratów w różnych tkankach od 2 do 11 razy [59, 60]. Sparnins i Wattenberg [60] wykazali zależność pomiędzy wzrostem aktywności SAG a spadkiem ilości nowotworów przedłożądka myszy, wywołanych BP. Stwierdzono również, że BHA powoduje wzrost zawartości zredukowanego glutationu w różnych tkankach zwierząt doświadczalnych, czemu towarzyszy wzrost aktywności reduktazy glutationowej (EC.1.6.4.2.) i dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (EC.1.1.1.43.) [6].

Drugim enzymem, którego aktywność jest indukowana w różnych tkankach przez BHA jest dehydrogenaza NAD(P)H-chinon (EC.1.6.99.2.) (RCh). BHA podawany w diecie indukuje aktywność tego enzymu od 5 do 10 razy w cytozolu i mikrosomach wątroby myszy i szczurów. Wzrost aktywności RCh powodujący powstawanie hydrochinonów, które mogą być wydalane z organizmu w postaci glukuronidów, wydaje się być czynnikiem podwyższającym detoksykację [62].

Podawanie zwierzętom BHA powoduje istotny wzrost aktywności cytozolowej dehydrogenazy UDP-glukozowej (EC.1.1.1.22.) oraz mikrosomalnej UDP-glukuronylotransferazy (EC.2.4.1.17.). Wzrost aktyw-

ności tych enzymów powoduje np. wzrost sprzęgania fenoli, chinonów i dihydrodioli BP z kwasem glukuronowym [62].

Ostatnim z omawianych enzymów, których aktywność indukuje BHA, jest hydrolaza epoksydowa (EC.4.2.1.63.) (HE). Wzrost aktywności tego enzymu w zależności od substratu, gatunku zwierzęcia i badanego narządu może wahać się od 2 do 11 razy [62]. W zależności od kancerogenu rola HE może być różna. W przypadku jednak, gdy ostatecznym kancerogenem jest metabolit będący substratem HE, działanie BHA można traktować jako wzmagające detoksykację.

III. Kancerogenne działanie BHA

Oprócz szeregu badań nad ewentualnymi właściwościami toksycznymi, BHA poddawany był także ocenie działania mutagennego i kancerogennego. Wielokrotnie wykazywano brak jego właściwości mutagennych w różnych testach krótkoterminowych, w tym w teście Amesa zarówno z użyciem systemu aktywacji metabolicznej jak i bez [43]. Doniesienia o ewentualnym mutagennym działaniu BHA i jego metabolitów są nieliczne i słabo udokumentowane [63].

Przez wiele lat uważano BHA za związek także niekancerogeny. Wskazywały na to liczne badania, w których przeciwutleniacz ten nie wykazywał kancerogennego działania w: żołądku świń, psów, chomików, szczurów i myszy, a także płucach myszy i przelyku psów [25, 64, 65].

W świetle powyższych badań zaskakujące okazały się obserwacje Ito i wsp. [66]. Zmieniając nieco stosowane dotąd warunki doświadczenia (wyższe dawki BHA oraz wydłużony czas obserwacji) wykazali oni, że BHA wywołuje hiperplazję, brodawczaki i raka przedłożądka u szczurów F-344. Kolejne prace tego zespołu, jak i innych autorów potwierdziły te obserwacje zarówno na szczurach, chomikach jak i myszach [67–69]. Za kancerogenne działanie BHA w przedłożądku chomików odpowiedzialny był 3-izomer [69]. Ponadto Sakai i współautorzy stwierdzili, że 3-BHA i jego metabolit *tert*-butyl-1,4-benzochinon wykazują właściwości transformujące w stosunku do komórek BALB/3T3.

Wraz z doniesieniami o rakotwórczych właściwościach BHA ukazały się prace wskazujące na promocyjne działanie tego związku. Obserwowano je, gdy BHA podawany był w diecie (1–2%), po fazie inicjacji nowotworowej wywołanej różnymi związkami chemicznymi (Tab. 4). Należy przy tym zauważyć, że w analogicznych układach doświadczalnych BHA może nie zwiększać ilości nowotworów indukowanych tymi samymi związkami w innych tkankach lub nawet ją obniżać [68, 74, 73].

Mechanizm kancerogennego i promocyjnego działania BHA nie jest dotąd poznany. Wykazano, że przeciwutleniacz ten działa na nabłonek przedłożądka bezpośrednio, bez aktywacji metabolicznej. Działanie to nie zależy od jego wiązania się z DNA i RNA [75]. Stwierdzono jednak, że 3-BHA *in vivo* wiąże się selektywnie z białkami mikrosomalnymi przedłożądka, a także z komórkowymi tiolami [76]. Sugeruje się ponadto, że nowotworowe działanie BHA może być

Tabela 4.
Promocyjne działanie BHA

kancerogen	gatunek	narząd	piśmiennictwo
N-butylo-N-(4-hydroksybutylo)nitrozoamina	szczur	pęcherz moczowy	38, 68, 71
metylonitrozomocznik	szczur	przedzółądek	68
	szczur	pęcherz moczowy	68, 72
N-etylo-N-hydroksyetylonitrozoamina	szczur	nerki	68, 71
N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna	szczur	przedzółądek	68
N-dietylonitrozoamina	mysz	wątroba	73
N, N-dibutylnitrozoamina	szczur	przedzółądek	74
		pęcherz moczowy	
N-nitrozopirolidyna	mysz	pluca	31

wynikiem oddziaływania tego związku na lipidy błonowe [9]. Ostatnio stwierdzono, że BHA znacznie obniża wzajemną wymianę cząsteczek chemicznych pomiędzy komórkami wątroby szczura. Jest to fakt znaczący zważywszy, że inhibicja biochemicznej wymiany informacji pomiędzy komórkami jest charakterystyczna dla związków o właściwościach promocyjnych [77].

Rakotwórcze i promocyjne właściwości BHA obserwowane są, gdy stosuje się wysokie dawki przeciwutleniacza w diecie (1–2%). Natomiast działanie prewencyjne BHA ma miejsce w znacznie niższych stężeniach (0,2–0,75%). Ponadto właściwości przeciwnowotworowe BHA obserwowane są głównie, gdy podawany jest on przed lub równoległe z kancerogenem, podczas gdy działanie promocyjne wymaga podania przeciwutleniacza po fazie inicjacji nowotworowej. Powyższe fakty sugerują, że możemy uniknąć negatywnych skutków działania BHA w procesach kancerogenezy chemicznej, na rzecz niewątpliwych korzyści płynących z jego działania prewencyjnego. Tym bardziej, że codzienne spożycie przeciwutleniaczy jest bardzo niskie w porównaniu z dawkami stosowanymi przez toksykologów. Należy sądzić, że dopiero całkowite poznanie mechanizmów działania BHA zarówno w kierunku przeciwnowotworowym, jak i kancerogennym rozstrzygnie o możliwości przyszłego stosowania tego związku w praktyce.

Artykuł otrzymano 13 listopada 1991 r.

Zaakceptowano do druku 18 grudnia 1991 r.

Piśmiennictwo

- Stuckey B.N., (1972) W: Furia T.E. (red.) Handbook of Food Additives. CRC Press, Cleveland, Ohio, str. 185–223.
- Kirkpatrick D.C., Lauer B.H., (1986), *Food Chem. Toxicol.*, **24**: 1035–1037.
- Cummings S.W., Ansari G.A.S., Guengerich F.P., Crouch L.S., Prough R.A., (1985), *Cancer Res.*, **45**: 5617–5623.
- Altman H.J., Grunow W., Mohr U., Richter-Raichhelm H.B., Wester P.W., (1986), *Food Chem. Toxicol.*, **24**: 1183–1189.
- Branen A.L., (1975), *J. Am. Oil Chem. Society*, **52**: 59–63.
- De Long M.J., Prochaska H.J., Talalay P., (1985), *Cancer Res.*, **45**: 546–551.
- Takahashi O., Sakamoto Y., Hiraga K., (1985), *Toxicol. Lett.*, **27**: 15–25.
- Lam L.K.T., Garg P.K., Swanson S.M., Pezzuto J.M., (1988), *J. Pharmacol. Sci.*, **77**: 393–395.
- Thompson D., Moldeus P., (1988), *Biochem. Pharmacol.*, **37**: 2201–2207.
- Wattenberg L.W., *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**: 1425–1430.
- Reddy B.S., Furuya K., Hanson D., Di Bello J., Berke B., (1982), *Food Chem. Toxicol.*, **20**: 853–859.
- Hazelton G.A., Hjelle J.J., Klaassen C.D., (1986), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**: 474–485.
- Miranda C.L., Henderson M.C., Schmitz J.A., Buhler D.R., (1983), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **69**: 73–80.
- Ansher S.S., Dolan P., Bueding E., (1983), *Hepatology*, **3**: 932–935.
- Mizutani T., (1985), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **50**: 125–133.
- Shulyakovskaya T.S., Arshinov V.Y., Pakhomov V.Y., Rykova V.A., Saprin A.N., (1980), *Dokl. Akad. Nannk. SSSR*, **254**: 242–250.
- Moore M.A., Tsuda H., Ogiso T., Mera Y., Ito N., (1984), *Cancer Lett.*, **25**: 145–151.
- Cumming R.B., Walton M.F., (1973), *Food Chem. Toxicol.*, **11**: 547–553.
- Kim H.L., Jones L.P., (1982), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **36**: 341–344.
- Garrett B.J., Cheeke P.R., (1984), *J. Animal Sci.*, **58**: 138–144.
- Miranda C.L., Buhler D.R., Ramsdell H.S., Cheeke P.R., Schmitz J.A., (1982), *Toxicol. Lett.*, **10**: 177–182.
- Lam L.K.T., Pai R.P., Wattenberg L.W., (1979), *J. Med. Chem.*, **22**: 569–571.
- Wattenberg L.W., Jerina D.M., Lam L.K.T., Yagi H., (1979), *J. Natl. Cancer Inst.*, **62**: 1103–1106.
- Wattenberg L.W., (1973), *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**: 1541–1544.
- Witschi H.R., Doherty D.G., (1984), *Fund Appl. Toxicol.*, **4**: 795–801.
- Speier J.L., Lam L.K., Wattenberg L.W., (1978), *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**: 605–609.
- Slaga T.J., Bracken W.M., (1977), *Cancer Res.*, **37**: 1631–1638.
- McCormick D.L., Major N., Moon R.C., (1984), *Cancer Res.*, **44**: 2858–2863.
- Wattenberg L.W., (1972), *Fed. Proc.*, **31**: 633–636.
- Williams G.M., Tanaka T., Macura Y., (1986), *Carcinogenesis*, **7**: 1043–1050.
- Chung F.L., Wang M., Carmella S.G., Hecht S.S., (1986), *Cancer Res.*, **46**: 165–168.
- Reddy B.S., Macura Y., (1984), *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**: 1181–1187.
- Reddy B.S., Macura Y., Weisburger J.H., (1983), *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**: 1299–1305.
- Wattenberg L.W., Sparnins V.L., (1979), *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**: 219–222.
- Roebuck D., McMillan D.L., Bush D.M., Kensler T.W., (1984), *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**: 1405–1410.
- Rao M.S., Lalwani N.D., Watanabe T.K., Reddy J.K. (1984), *Cancer Res.*, **44**: 1072–1076.
- Wattenberg L.W., Lam L.K.T., (1983), W: Nygaard O.F., Simic M.G. (red.), Radioprotectors and Anticarcinogens. Academic Press, New York, str. 461–470.

38. Imaida K., Fukushima S., Shirai T., Ohtahi M., Nakanishi K., Ito N., (1983), *Carcinogenesis*, **4**: 895—899.
39. Moore M.A., Thamavit W., Ito N., (1987), *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**: 295—301.
40. Moore M.A., Tsuda H., Thamavit W., Masui T., Ito N., (1987), *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**: 289—293.
41. Tsuda H., Sakata T., Masui T., Imaida K., Ito N., (1984), *Carcinogenesis*, **5**: 525—531.
42. Calle L.M., Sullivan P.D., (1982), *Mutation Res.*, **101**: 99—104.
43. Batzinger R.P., Ou S.-Y.L., Bueding E., (1978), *Cancer Res.*, **38**: 4478—4485.
44. Kahl R., (1984), *Toxicology*, **33**: 185—228.
45. Rahimtula A.D., Jernstrom B., Dock L., Moldeus P., (1982), *Br. J. Cancer*, **45**: 935—944.
46. Peng R., Lewis K.F., Yang C.S., (1986), *Acta Pharmacol. Sinica*, **7**: 157—163.
47. Kahl R., Wulff U., (1979), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**: 217—220.
48. Ioannou Y.M., Wilson A.G.E., Anderson M.W., (1982), *Cancer Res.*, **42**: 1199—1204.
49. Wattenberg L.W., Speier J., Kotake A., (1976), *Adv. Enzyme Regul.*, **14**: 113—127.
50. Sydor Jr. W., Chou M.W., Yang S.K., Yang C.S., (1983), *Carcinogenesis*, **4**: 131—136.
51. Captevila J., Estabrook R.W., Prough R.A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**: 1291—1296.
52. Hennig E.E., Demkowicz-Dobrzański K.K., Sawicki J.T., Mojska H., Kujawa M., (1983), *Carcinogenesis*, **4**: 1243—1246.
53. Yang C.S., Sydor Jr. W., Martin H.B., Lewis K.F., (1981), *Chem.-Biol. Interact.*, **37**: 337—350.
54. Yang C.S., Strickart F.S., Woo G.K., (1974), *Life Sci.*, **15**: 1497—1505.
55. Dock L., Cha Y.-N., Jernstrom B., Moldeus P., (1982), *Chem.-Biol. Interact.*, **41**: 25—37.
56. Dock L., Rahimtula A., Jernstrom B., Moldeus P., (1982), *Carcinogenesis*, **3**: 697—701.
57. Krzywanska E., Piekarski L., (1977), *Neoplasma*, **24**: 395—400.
58. Reddy B.S., Hanson D., Mathews L., Sharma C., (1983), *Food Chem. Toxicol.*, **21**: 129—134.
59. Lam L.K.T., Sparnins V.L., Hochalter J.B., Wattenberg L.W., (1981), *Cancer Res.*, **41**: 3940—3944.
60. Sparins V.L., Wattenberg L.W., (1981), *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**: 769—771.
61. Kahl R., (1982), *Trends Pharmacol. Sci.*, **3**: 72—74.
62. Benson A.M., Hunkeler M.J., Talalay P., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 5216—5221.
63. Matsuoka A., Matsui M., Miyata N., Sofuni T., Ishidate M.Jr., (1990), *Mutation Res.*, **241**: 125—132.
64. Moch R.W., (1986), *Food Chem. Toxicol.*, **24**: 1167—1169.
65. Olsen P., (1983), *Cancer Lett.*, **21**: 115—116.
66. Ito N., Fukushima S., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T., (1983), *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**: 343—352.
67. Masui T., Hirose M., Imaida K., Fukushima S., Tamano S., Ito N., (1986), *Gann.*, **77**: 1083—1090.
68. Ito N., Fukushima S., Tsuda H., (1985), *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **15**: 109—150.
69. Hirose M., Masuda A., Kurata Y., Ikawa E., Mera Y., Ito N., (1986), *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**: 143—149.
70. Sakai A., Miyata N., Takahashi A., (1990), *Carcinogenesis*, **11**: 1985—1988.
71. Fukushima S., Ogiso T., Kurata Y., Hirose M., Ito N., (1987), *Cancer Lett.*, **34**: 83—90.
72. Ito N., Hirose M., Fukushima S., Tsuda H., Shirai T., Tatematsu M., (1986), *Food Chem. Toxicol.*, **24**: 1071—1082.
73. Hagiwara A., Diwan B.A., Ward J.M., (1986), *Jap. J. Cancer Res.*, **77**: 1215—1221.
74. Fukushima S., Sakata T., Tagawa Y., Shibata M.A., Hirose M., Ito N., (1987), *Cancer Res.*, **47**: 2113—2116.
75. Hirose M., Asamoto M., Hagivara A., Ito N., Kaneko H., Yoshitake A., Miyamoto Y., (1987), *Toxicology*, **45**: 13—24.
76. DeStafney C.M., Prabhu V.D.G., Sparnins V.L., Wattenberg L.W., (1986), *Food Chem. Toxicol.*, **24**: 1149—1157.
77. Williams G.M., McQueen C.A., Tong C., (1990), *Food Chem. Toxicol.*, **28**: 793—798.

XXVII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO LUBLIN, 18—20.09.1991 r.

SPRAWOZDANIE

W dniach 18—20 września 1991 roku obradował w Lublinie XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obrady Zjazdu odbywały się na terenie Miasteczka Uniwersyteckiego w salach Wydziału Chemii, Ekonomii oraz Prawa i Administracji Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej.

W Zjeździe uczestniczyło około 400 zarejestrowanych członków i sympatyków PTBioch. z kraju oraz 12 gości z zagranicy (Francja, Holandia, Litwa, Związek Radziecki). Największą grupę stanowili goście z Francji (7 osób). Większość uczestników Zjazdu (około 300) korzystała z zakwaterowania w Domu Studenckim UMCS „Helios” oraz Hotelu Studenta Zaocznego UMCS. Pozostali uczestnicy byli zakwaterowani w Hotelach Miejskich. Wszystkim uczestnikom zaoferowano obiady w stołówce akademickiej UMCS po umiarkowanej cenie. Ponadto w obiektach w których odbywały się obrady Zjazdu czynne były bufety serwujące, oprócz posiłków typu śniadania, również dania gorące.

Po oficjalnym otwarciu Zjazdu (18 września, godz. 10⁰⁰), powitaniu zaproszonych gości i uczestników rozpoczęła się sesja plenarna, podczas której referat wygłosił Prof. dr hab. Andrzej Legocki pt.: „Molekularne podstawy organospecyficznego ekspresji genów.”

Dalszy naukowy program Zjazdu wypełniło sześć następujących sympozjów:

- A — „Molekularna regulacja procesów wzrostu i różnicowania komórek somatycznych” (organizator: Prof. dr hab. D. R o z y n k o w a).
- B — „Procesy biotechnologiczne w produkcji żywności i ochronie środowiska” (organizator: Prof. dr hab. A. L e o n o w i c z).
- C — „Toksyczne oddziaływanie czynników środowiska na organizmy żywe” (organizator: Prof. dr hab. Z. T y n e c k a).
- D — „tRNA i syntetazy aminoacylo-tRNA” (organizator: Prof. dr hab. T. B o r k o w s k i).
- E — „Patochemia tkanki łącznej” (organizator: Prof. dr hab. E. B a Ń k o w s k i).

F — „French — Polish Symposium on calcium Metabolism” (organizator: Prof. dr hab. Z. P o r e m b s k a).

Ponadto zorganizowano sesję posterową „R”, w ramach której prezentowane były prace o różnej tematyce w postaci plakatów.

W toku sześciu wyżej wymienionych sympozjów i sesji „R” wygłoszono łącznie 28 referatów, 22 komunikaty oraz zaprezentowano 317 prac w formie posterów. W poszczególnych sympozjach tematycznych i sesji „R” liczby referatów, komunikatów i posterów wynosiła:

Sympozjum	Referaty	Komunikaty	Postery
A	5	—	32
B	6	—	99
C	8	15	62
D	6	—	7
E	3	—	18
F	—	7	1
sesja R	—	—	98
	28	22	317

Należy podkreślić, że Zjazd cieszył się dużym zainteresowaniem zarówno uczestników jak i całego lubelskiego środowiska naukowego, związanego niekiedy bardzo luźno z biochemią, z uwagi na atrakcyjną tematykę poszczególnych sympozjów.

Podczas Zjazdu odbył się Konkurs dla młodych biochemików o Nagrodę im. Włodzimierza Mozółowskiego. Komisji konkursowej przewodniczył Prof. dr hab. T. B o r k o w s k i z Zakładu Chemii Fizjologicznej AM. Do konkursu zgłoszono 5 prac, których autorami byli młodzi biochemicy z Poznania (2 prace), Warszawy (2 prace) i Bydgoszczy (1 praca).

Laureatem Konkursu został mgr J a c e k K r a j e w s k i z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w

Poznaniu, który przedstawił pracę pt. „Struktura U5 snRNA z łubinu białego”. Laureat został uhonorowany dyplomem i nagrodą pieniężną w wysokości 2.000.000, – zł (dwa miliony) ufundowaną przez Oddział Gdański PTBioch. Wynik Konkursu został ogłoszony bezpośrednio po obradach Komisji, zaś uroczyste wręczenie Nagrody im. W ł o d z i m i e r z a M o z o ł o w s k i e g o miało miejsce w drugim dniu Zjazdu przed rozpoczęciem obrad sympozjum D, którego organizatorem był Przewodniczący Komisji Konkursowej.

Obradom Zjazdu towarzyszyła wystawa sprzętu laboratoryjnego, aparatury i odczynników. Swoje wyroby prezentowało 28 firm krajowych i zagranicznych. Ponadto kilka firm skorzystało z naszej oferty dotyczącej umieszczenia reklam w Materiałach Zjazdowych.

W przeddzień Zjazdu odbyło się zebranie Zarządu Głównego PTBioch. poświęcone głównie sprawom bieżącym oraz organizacji Zjazdu w Łodzi w 1992 roku.

W pierwszym dniu Zjazdu w godzinach wieczornych Komitet Organizacyjny zaprosił wszystkich chętnych na koncert Zespołu Tańca Ludowego UMCS. Zespół, pomimo zmęczenia podróżą (właśnie tego dnia wrócił ze swych występów w Hiszpanii), zaprezentował wspaniały program (opinia uczestników). Szkoda, że stosunkowo mało osób zdecydowało się skorzystać z naszej propozycji.

Wieczorem drugiego dnia Zjazdu, odbyło się spotkanie towarzyskie. W imprezie zorganizowanej w sali barowej Hotelu Studenta Zaocznego uczestniczyło około 120 osób.

W trzecim dniu Zjazdu, w godzinach popołudniowych, zorganizowano wycieczkę do Muzeum Wnętrz Pałacu w Kozłowie. Autokar na w/w wycieczkę został udostępniony organizatorom nieodpłatnie przez J. M. Rektora KUL.



Pokwitowanie dla wpłacającego	Odcinek dla posiadacza rachunku	Odcinek dla poczty lub banku
zł	zł	zł
słownie	słownie	słownie
wpłacający	wpłacający	wpłacający
.....
.....
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek	na rachunek	na rachunek
Polskie Towarzystwo Biochemiczne 00-227 Warszawa, ul. Freta 16 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 00-227 Warszawa, ul. Freta 16 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 00-227 Warszawa, ul. Freta 16 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11
stempel	stempel	stempel
Pobrano opłatę	Pobrano opłatę	Pobrano opłatę
zł.	zł.	zł.
.....
podpis przyjmującego	podpis przyjmującego	podpis przyjmującego

W sobotę 21. 09. 1991 r. autokar, udostępniony za częściową odpłatnością przez J. M. Rektora AR, zabrał grupę uczestników Zjazdu na wycieczkę połączoną ze zwiedzaniem Nałęczowa, Kazimierza i Puław. Obydwie wycieczki były bardzo udane, jak stwierdzili biorący w nich udział uczestnicy Zjazdu.

Dla gości z Francji zorganizowano (wprawdzie odpłatnie) transport z Warszawy do Lublina i z powrotem oraz odrębną wycieczkę, w ramach której mogli oni zwiedzić Lublin i okolice, Pałac w Kozłowie, Nałęczów i Kazimierz.

Na organizację Zjazdu Komitet nie uzyskał żadnych dotacji ze strony Towarzystwa Biochemicznego (jedynie w formie pożyczki 5 milionów złotych) bądź Polskiej Akademii Nauk. Nie uzyskał też żadnych dotacji od ewentualnych sponsorów. Jedyny wyjątek to 350 sztuk reklamówek z Zakładów Azotowych „Puławy”. Koszty organizacji Zjazdu zostały pokryte w dużej mierze z dochodów z wystaw i reklam. Zjazd korzystał natomiast z pomocy zadeklarowanej przez Środowiskowe Kolegium Rektorów, któremu aktualnie przewodniczy J. M. Rektor UMCS Prof. dr hab. E. Gąsior. W tym miejscu organizatorzy Zjazdu pragną podziękować J. M. Rektorowi UMCS oraz Władzom pozostałych Uczelni za różne formy pomocy jak udostępnienie sal wykładowych na obrady i organizację wystaw, druk Materiałów Zjazdowych po tzw. kosztach własnych, transport, itp.

W rozliczeniu finansowym organizacji Zjazdu pozostaje pewna nadwyżka finansowa, którą organizatorzy chcieliby przeznaczyć na fundację Nagrody im. W. M o z o ł o w s k i e g o, wsparcie finansowe Redakcji Listów, a także pewną jej część przekazać do dyspozycji Zarządu Głównego.

Prof. dr hab. Maria Wojtaś-Wasilewska

ERRATA do zeszytu 3-4, 37, 1991.

Strona pierwsza okładki, trzecia pozycja spisu treści powinna brzmieć „Fosfatydylocholina a substancje sygnałowe”.

- str. 140, kolumna prawa, wiersz 8 i 15 od góry: zamiast + powinno być ±
str. 155, kolumna prawa, wiersz 2 od dołu: zamiast DNS powinno być DNA
str. 156, kolumna prawa, wiersz 11 od góry: zamiast I1507 powinno być I507
str. 159, kolumna lewa, wiersz 14 od dołu: zamiast deoksytymina powinno być deoksytymidyna
str. 159, kolumna prawa, wiersz 9 od góry: zamiast trójfosforan powinno być trifosforan
str. 159, kolumna prawa, wiersz 18 od góry: zamiast limfocytów powinno być limfocytów
str. 160, kolumna prawa, wiersz 9 od dołu: zamiast MPD(I) powinno być MDP(I)
str. 162, kolumna lewa, wiersz 6 od góry: zamiast immunoglobulin powinno być immunoglobulin
str. 162, kolumna lewa, wiersz 23 od dołu: zamiast wskazuje powinno być wskazują

Za wszystkie przeoczone błędy serdecznie przepraszamy P. T. Autorów. Szczególnie serdecznie przepraszamy Profesora Tadeusza Wilusza i Docent Lidę Paś-Dzięgielewską za błędne podanie nazwisk.

**W imieniu Redakcji
Zofia Zielińska**

Zmiany autorskie

- str. 141, kolumna prawa, wiersz 5 od góry: zamiast alfa 2 powinno być alfa₂, a w wierszu 6 zamiast alfa₂ powinno być alfa₁
str. 160 kolumna prawa: zamiast **Wzór IV.** D-laktylo-L-alanylo-γ-D-glutamylo-(L)-mezo-α,ε-diaminopimelilo-L-glicyna (FK 156) powinno być **Wzór III.** Muroktazyna (MDP-Lys-L18)
str. 160, kolumna prawa: zamiast **Wzór III.** Muroktazyna (MDP-Lys-L18) powinno być **Wzór IV.** N-Heptanoilo-γ-D-glutamylo-(L)-mezo-2,6-diaminopimelilo-L-alanina
str. 161, w Tabeli 1 Wzór IV przedstawia strukturę związku FK-565 chemiczna nazwa związku brzmi: N-Heptanoilo-γ-D-glutamylo-(L)-mezo-2,6-diaminopimelilo-L-alanina

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1992 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Naukowego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie

imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu wraz 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).

Prenumerując „Postępy Biochemii” wspierasz swoje czasopismo!

Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm z trzydziestoma wierszami na stronie i 60 znakami w wierszu (litery + odstęp), odstępy pomiędzy wyrazami powinny odpowiadać jednemu znakowi (nie równać do prawego marginesu).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

XXVIII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Zaproszenie

Serdecznie zapraszamy do udziału w XXVIII Ogólnopolskim Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, który odbędzie się w Łodzi, w terminie 16—18 września 1992 r. Program naukowy Zjazdu obejmuje wiele aspektów współczesnej biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii, stwarzając możliwości przedstawienia i przedyskutowania najnowszych wyników badań w tym zakresie.

Komitet Organizacyjny

S. Bielecki (przewodniczący), E. Galas, M. Gniazdowski, J. Greger, A. Jakubowski (skarbnik), Z. Kiliańska, L. Klyszejko-Stefanowicz, W. Krajewski, E. Kwapisz (sekretarz), M. Kwinkowski, L. Lachowicz, A. Lipińska, A. Płucienniczak, M. Różalski, L. Szmigiero, M. Turkiewicz, E. Turska, Z. Walter, W. Wąsowicz, R. Wierzbicki, A. Zgirski (v-ce przewodniczący).

Prezentacja wyników

Zaproszeni wykładowcy wygłoszą referaty plenarne i sympozjalne. Uczestnicy Zjazdu przedstawiać będą swoje prace w poszczególnych grupach tematycznych, w formie doniesień ustnych lub plakatowych (wg wyboru Komitetu Organizacyjnego).

Miejsce obrad

Obrady Zjazdu odbywać się będą na terenie Uniwersytetu Łódzkiego. Przewidujemy możliwość zakwaterowania uczestników w pobliskich domach akademickich oraz hotelach miejskich.

Sekretariat

Dr inż. Ewa Kwapisz,
Instytut Biochemii Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź,
tel. 31-34-39, tlx 88-42-20 btz pl,
fax 36-85-22

Sympozja:

1. Ekspresja genów w systemach heterologicznych.
2. Białka aparatu genetycznego.
3. Oddziaływanie ligandów z DNA.
4. Wpływ mutagenów środowiskowych na genom.
5. Metabolizm i funkcja peptydów biologicznie czynnych.
6. Biotechnologia.
7. Doniesienia różne.

Dyskusje panelowe

- A. Nauczanie biochemii i biotechnologii w różnych typach szkół wyższych.
- B. Biotechnologia — teoria i praktyka (dyskusja z udziałem przedstawicieli przemysłu).