

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

# Postępy Biologii Komórki

**TOM 21 NR-3'94**  
(241–348)

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty KILARSKI,  
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA,  
Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,  
Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,  
Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99,  
01-813 Warszawa*

---

## W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Budzące obecnie duże zainteresowanie zagadnienia apoptozy a zwłaszcza jej genetyczne regulacje opisano na przykładzie *Caenorhabditis elegans* oraz komórek somatycznych ssaków na str. 303.
- Poglądy na temat budowy, mechanizmu działania i kontroli kanałów wapniowych funkcjonujących w błonach komórek zwierzęcych i roślinnych opisano na stronach 319–340.
- Ochronne działanie na komórkę niektórych prostaglandyn opisano na stronach 275–291. Przedstawiono różne postulowane mechanizmy oddziaływania tych związków, jak i sugestie stosowania ich w medycynie.
- Pochodne wanadu mogą naśladować działanie insuliny. O tym zjawisku można przeczytać na stronach 293–302.
- Współczesne poglądy na temat ruchomych elementów genetycznych – transpozonów opisano na stronach 263–274. Transpozony stanowią prawdopodobnie jedną z możliwych dróg, którymi odbywa się ewolucja organizmów.
- O oscylacyjnym charakterze zmian podstawowych właściwości komórek roślinnych traktuje artykuł na stronach 249–262.
- Nowe informacje dotyczące regulacji cyklu komórkowego opisano na stronach 243–248.





## KOMUNIKATY

### Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej postanowił przyznać nagrodę naukową w roku 1994 za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w latach 1992–1994 w czasopiśmie figurującym w Current Content. Wysokość nagrody w 1994 r. wyniesie 6 000 000 zł.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada 1994 r. pod adresem Fundacji.

*Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa  
tel. 340 344, fax 340470*

### Komunikat Redakcji "Postępów Biologii Komórki"

Redakcja "Postępów Biologii Komórki" pragnie kontynuować porządkowanie polskich mian z zakresu biologii komórki, a w szczególności miana dotyczące: morfologii komórek i ich funkcji oraz biologii molekularnej. W związku z tym prosimy o nadsyłanie na adres Redakcji propozycji mian do końca listopada każdego roku, aby można opublikować je w zeszycie 1 następnego roku. Wszystkie uwagi do propozycji, które nadejdą do Redakcji do końca września będą opublikowane w zeszycie 4 wraz z propozycją ostateczną mian. Po kilku latach na tej podstawie będzie można opublikować suplement "Postępów" zawierający przyjęte miana.

Układ nadsyłanych propozycji:

---

proponowane miano (nazwa) w j. polskim	odpowiednik w j. angielskim i synonimy	definicja, bliższy opis miana
--	--	-------------------------------------

---

*Redakcja*



# INHIBITORY KINAZ ZALEŻNYCH OD CYKLIN – NOWE GENY PRZECIWNOWOTWOROWE

## CYCLIN DEPENDENT KINASES INHIBITORS – A NEW CLASS OF TUMOR SUPPRESSOR GENES

Cezary WÓJCIK

Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie

*Streszczenie:* Nasze wiadomości dotyczące regulacji cyklu komórkowego uległy ostatnio znacznemu wzbogaceniu przez odkrycie czynników białkowych będących inhibitorami kinaz zależnych od cyklin, czyli CKI. Najważniejszym inhibitorem cdk jest p21<sup>pic1</sup>, którego ekspresja zależy bezpośrednio od antyonkogenu p53. Niejasna jest wciąż dokładna rola CKI w mechanizmie regulacji cyklu komórkowego oraz w procesie onkogenezy.

*Słowa kluczowe:* inhibitory cdk, CKI, cdk, białka przeciwnowotworowe, cykl komórkowy.

*Summary:* The discovery of proteins known as cyclin dependent kinases inhibitors or CKI has enriched our knowledge of the mechanisms of the cell cycle regulation. The most important CKI is known as p21<sup>pic1</sup>. It's expression depends upon the direct action of p53 tumor suppressor protein. The exact role played by the CKI in the cell cycle regulation and in oncogenesis remains to be elucidated.

*Key words:* cdk inhibitors, CKI, cdk, tumor suppressor proteins, cell cycle.

### WSTĘP

Wydawało się, iż mamy już dość jasny obraz na temat czynników kontrolujących cykl komórkowy. Szczegółowo poznano zasady regulacji aktywności enzymatycznej kinaz zależnych od cyklin, zwłaszcza p34<sup>cdc2</sup>. Opisane to zostało szczegółowo w innych publikacjach, jakie ukazały się na tych łamach [9, 19, 20].

Wydawało się, iż aktywność kinaz zależnych od cyklin (cdk) zależy wyłącznie od stopnia fosforylacji różnych reszt aminokwasowych tych białek [10] oraz od ich asocjacji z podjednostkami regulacyjnymi, jakimi są cykliny [1]. Hipotezę tę potwierdziło to, iż z zarodków i stransformowanych linii komórkowych izolowano najczęściej kompleksy zawierające jedynie cdk w powiązaniu z cyklinami. Ostatni rok przyniósł jednak lawinę doniesień o występowaniu w komórkach somatycznych cdk i cyklin w potrójnych i poczwórnych kompleksach z dodatkowymi czynnikami białkowymi, których istnienia wcześniej nawet nie podejrzewano. Co więcej ponieważ okazało się, że niektóre z nich wywierają wpływ hamujący na aktywność enzymatyczną kompleksów cdk/cykliny, zyskały sobie miano CKI, czyli inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (*cyclin dependent kinases inhibitors*).

Pierwszymi sygnałami o możliwości występowania tego typu czynników było wykrycie u drożdży białka  $p13^{suc1(CSK1)}$ , które wykazuje bardzo silne powinowactwo do kompleksów  $p34^{cdc2}$  z cyklinami, wykorzystywane do jego oczyszczania na kolumnach sefarozowych. Sugerowano nawet, iż  $p13^{suc1(CSK1)}$  może pełnić rolę inhibitora kompleksu zawierającego  $cdc2$  i wyizolowano jego ludzkie odpowiedniki, zwane Ckshs 1 i 2 [2, 8].

Innym sygnałem był fakt, iż w komórkach starzejących się nadekspresja  $cdc2$  i różnych cyklin z wprowadzonych do nich plazmidów nie doprowadzała do podjęcia przez nie cyklu komórkowego. Nie pasowało to zupełnie do hipotezy uniwersalnego działania MPF, w związku z czym zaproponowano występowanie w komórkach starzejących się jakiegoś inhibitora działania kinaz zależnych od cyklin [17].

Wreszcie blokowanie przez transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF $\beta$ ) komórek w późnej fazie  $G_1$ , pomimo występowania w nich w normalnej ilości kompleksów  $cdc2$  z cykliną E, nasuwał podejrzenie, iż TGF $\beta$  indukuje ekspresję jakiegoś inhibitora SPF [4].

## BIAŁKO $p21^{pic1}$

Różne grupy badaczy zupełnie niezależnie wykryły w komórkach ludzkich białko  $p21$  o aktywności inhibitora cdk i nadały mu odmienne nazwy. Znane jest więc ono jako inhibitor  $p21$ , białko oddziałujące z cdk  $cip1$  (*cdk interacting protein*), inhibitor pochodzący z komórek starzejących się  $sdi1$  (*senescent cell derived inhibitor*) lub fragment aktywowany przez dzikiego typu antyonkogen  $p53$   $waf1$  (*wild type p53 activated fragment*) [3, 7, 13, 21]. Ponadto homologiczne białko wyizolowane z komórek myszy nazwano białkiem związanym z cdk o masie 20 kDa, czyli CAP20 (*cdk associated protein - 20*) [5]. Ostatnio w celu ujednoczenia nomenklatury zaproponowano dla  $p21$  nazwę regulowanego przez  $p53$  inhibitora kinaz zależnych od cyklin (*p53 regulated inhibitor of cdk*), w związku z czym jego gen nazwano  $pic1$ , a samo białko  $p21^{pic1}$  [8]. Nazwa ta będzie stosowana w niniejszej pracy w celu



uniknięcia jakichkolwiek nieścisłości. Gen *pic1* został zlokalizowany u człowieka w chromosomie 6p21.2 [3].

W niestransformowanych komórkach ssaków przynajmniej część cdk zdaje się występować w złożonych kompleksach. Z diploidalnych fibroblastów ludzkich wyizolowano kompleksy różnych cdk z cyklinami, p21<sup>pic1</sup> i antygenem jądrowym komórek proliferujących PCNA\* (*proliferating cell nuclear antigen*). Białko p21<sup>pic1</sup> hamuje aktywność enzymatyczną cdk w kompleksach, takich jak: cdk4/cyklina D, cdk2/cyklina E, cdk2/cyklina A i cdc2/cyklina B. Hamowanie jest najsilniejsze w przypadku kompleksu cykliny A z cdk2, a bardzo słabe w przypadku kompleksu cykliny B z cdc2. Ponieważ nadekspresja *pic1* zapobiega proliferacji komórek, sugeruje to, iż pełni ono funkcję antyonkogenu, czyli genu przeciwnowotworowego [7, 21].

Okazało się, iż w fibroblastach stransformowanych za pomocą wirusa SV 40 nie występują te makromolekularne kompleksy. PCNA\* i p21<sup>pic1</sup> nie łączą się już z kompleksem cykliny B1 z cdc2, ani z kompleksami zawierającymi cdk4 lub cyklinę A. Co więcej, cdk4 wiąże się z białkiem p16, a kompleksy zawierające cyklinę A łączą się z białkiem p19 o nieznanym działaniu.

Ekspresję p21<sup>pic1</sup> można indukować za pomocą p53, gdyż w regionie promotora *pic1* znajduje się miejsce wiążące produkt tego antyonkogenu. Poziom białka p21<sup>pic1</sup> jest 50 razy niższy w komórkach, w których są niefunkcjonalne obydwa allele p53, co wskazuje, iż uczestniczy ono jako efektor p53 w regulacji cyklu komórkowego. Z kolei w komórkach o nadmiernej ekspresji p53 następuje blok w G<sub>1</sub>, prawdopodobnie zależny od produktu *pic1*. Podobnie zależne od p53 zahamowanie cyklu w G<sub>1</sub> wskutek zadziałania czynników uszkodzających DNA, takich jak światło ultrafioletowe, można w pełni wytłumaczyć działaniem inhibitora cdk p21<sup>pic1</sup>. Ekspresja tego białka w komórkach nowotworowych blokuje ich proliferację [3, 21].

Antyproliferacyjne działanie *pic1* można znieść przez koekspresję antygeny T wirusa SV40 (Ag T). Ag T wiąże się z regulatorami cyklu komórkowego, takimi jak pRb, znosząc potrzebę ich fosforylacji zależnych od cdk, potrzebnych do przejścia punktu R. AgT wiąże się także z p53, hamując tym samym ekspresję *pic1*, co także ma znaczenie w jego zdolności transformowania komórek [3, 8].

Poziom mRNA *pic1* oraz samego białka p21<sup>pic1</sup> jest 10–20-krotnie wyższy w komórkach starzejących się i w komórkach zahamowanych w G<sub>0</sub>. Dzieje się tak, pomimo tego iż w tych komórkach występuje niski poziom p53, co znaczy, iż w indukcji ekspresji genu *pic1* uczestniczą także inne czynniki transkrypcyjne [8, 13].

W przypadku komórek stymulowanych surowicą, w komórkach starzejących się nie zmienia się ekspresja *pic1*, natomiast w komórkach zahamowanych w G<sub>0</sub>, przy

\*PCNA jest kofaktorem polimerazy II DNA i ze względu na cykliczne zmiany jego rozmieszczenia w komórce było niegdyś nazywane cykliną, choć nie wykazuje podobieństwa do właściwych cyklin. Dla uniknięcia pomyłek zarzucono nazywanie PCNA cykliną, tymczasem okazało się, że wchodzi ono w ścisłą interakcję z właściwymi cyklinami i z cdk [21].



przechodzeniu do cyklu następuje przejściowy wzrost mRNA dla *pic1* przed fazą S, a następnie długotrwały spadek. Prawdopodobnie odpowiada mu także spadek poziomu samego białka [13]. Regulacja poziomu p21<sup>pic1</sup> i innych inhibitorów cdk zależy nie tylko od indukcji jego ekspresji, lecz także prawdopodobnie od związania się z ubikwityną i zależnej od proteasomów degradacji tak powstałych koniugatów [12].

### BIAŁKO p24<sup>cip2</sup> (*cdi1*)

Innym dość dobrze poznanym białkiem o charakterze CKI jest białko o masie 24 kDa będące produktem genu określonego jako białko oddziałujące z cdk *cip2* lub interaktor cdk *cdi1* (*cdk interactor*). p24<sup>cip2</sup> w odróżnieniu od p21<sup>pic1</sup> praktycznie nie wiąże się z kompleksami zawierającymi cdk4, wiąże się natomiast z kompleksami zawierającymi cdc2, cdk2 i cdk3. Sekwencja *cip2* upodabnia to białko do poznanych fosfataz tyrozynowych, jednak p24<sup>cip2</sup> nie defosforyluje ani cdk, ani cyklin, jak również nie jest przez nie fosforylowane. Poziom mRNA *cip1* oraz samego białka p24<sup>cip2</sup> zmienia się w przebiegu cyklu komórkowego, osiągając szczyt w okolicach punktu R. Nadekspresja *pic1* opóźnia przejście przez fazę G<sub>1</sub> i wymaga aktywności fosfatazowej p24<sup>cip2</sup> [6].

### BIAŁKO p16<sup>INK4</sup>

W diploidalnych fibroblastach ludzkich kompleksy cdk4 z cykliną D zawierają także PCNA i białko p21<sup>pic1</sup> [21]. W komórkach pozbawionych pRb, czyli produktu antyjonogenu Rb (retinoblastoma) dochodzi natomiast do asocjacji cdk4 z białkiem o masie 16 kDa mającym właściwości CKI. Białko to nazwano INK4 (*inhibitor of cdk4*) i wykryto, że zawiera cztery powtórzenia sekwencji ankiryiny. Wiąże się jedynie z cdk4, a także być może z PSLIRE a nie z innymi cdk. Białko p16<sup>INK4</sup> zapobiega zależnej od kompleksu cdk4 z cykliną D1 lub D3 fosforylacji pRb, p107 i p130.

Prawdopodobnie w niestransformowanych komórkach p16<sup>INK4</sup> wyłącza aktywność cdk4, gdy pRb i pokrewne mu białka ulegną inaktywacji przez fosforylację. W komórkach o zmutowanym pRb wzrasta ekspresja p16<sup>INK4</sup> i następuje inaktywacja cdk4, jednak nie wpływa to na progresję cyklu, gdyż pRb znajduje się przez cały czas w formie sprzyjającej proliferacji [18].

### BIAŁKO p27<sup>Kip1</sup>

Białko o masie 27 kDa będące produktem genu *Kip1* (*kinase inhibitor protein*) jest również inhibitorem cdk. Prawdopodobnie pośredniczy ono w transdukcji sygnału blokującego komórki w późnej fazie G<sub>1</sub> pochodzącego od TGFβ. Białko p27<sup>Kip1</sup>

wiąże się ściśle z kompleksami cdk2 i cykliny E zwiększając znacząco próg stężenia cykliny E potrzebny do aktywacji cdk2. Z kolei wiązanie się p27<sup>Kip1</sup> z kompleksami cdk4 i cykliny D2 umożliwia aktywację kompleksu cdk2/cykliny E. W komórkach proliferujących, nie poddanych działaniu TGFβ p27<sup>Kip1</sup> jest obecne, lecz jest związane w kompleksy z innymi białkami, co zapobiega jego interakcji z cdk [16].

## INNE BIAŁKA ODDZIAŁUJĄCE Z CDK

Omówione powyżej trzy białka zapewne nie zamykają listy inhibitorów cdk, lub też w szerszym ujęciu, białek oddziałujących z cdk. Innym białkiem o nieznanym roli jest p19, łączące się z kompleksami cdk i cykliny A po transformacji fibroblastów ludzkich [21]. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wyizolowano białko Far1, które hamuje kompleks CDC28 (odpowiednika *cdc2*) z cykliną CLN2, niezbędny do przejścia punktu Start. Białko to stanowi końcowy efektor skomplikowanej kaskady wtórnych przekazywników wiodącej od receptora dla feromonu koniugacyjnego, poprzez kinazy MAP do białka Fus3, które aktywuje Far1 przez fosforylację. Innym białkiem drożdży należącym także prawdopodobnie do rodziny CKI jest p40, o nieznanej wciąż sekwencji [12, 15]. Wreszcie ostatnio zbadano strukturę Ckshs2 i wykazano, iż białko to może tworzyć heksamer wiążący sześć cdk, co zapewne moduluje aktywność kinaz zależnych od cyklin [14].

Odkrycie CKI radykalnie zmieniło nasz pogląd na mechanizmy regulacji cyklu komórkowego, wprowadzając do nich zupełnie nowe elementy. Najbliższe lata przyniosą zapewne dokładniejsze poznanie różnych CKI oraz zrozumienie ich roli w cyklu komórkowym [8].

Nasmyth i Hunter wysunęli atrakcyjny model cyklu komórkowego, przez jego analogię z systemem tam i zbiorników retencyjnych. Produkcja cyklin w fazie G<sub>1</sub> powoduje podnoszenie się ich poziomu na podobieństwo podnoszenia się poziomu wody w zalewie. Naporowi temu przeciwstawia się tama ustanowiona przez odpowiednie CKI. Wreszcie tama nie wytrzymuje naporu, dochodzi do jej przerwania i komórka przechodzi punkt R, po czym następuje synteza DNA. Zaczynają się teraz zbierać cykliny mitotyczne, a na ich drodze stoi nowa tama zbudowana z odpowiednich CKI. Jej przerwanie odpowiada aktywacji MPF i komórka wchodzi w mitozę. Po ukończeniu mitozy cała sytuacja powtarza się od nowa. Czas pokaże, czy to porównanie oddaje zjawiska zachodzące w cyklu komórkowym [12].

## LITERATURA

- [1] ATHERTON-FESSLER S, PARKER LL, GEAHLEN RL, PIWNICA-WORMS H. Mechanisms of p34<sup>cdc2</sup> regulation. *Molec Cell Biol* 1993; **13**: 1675–1685.
- [2] DRAETTA G, BRIZUELA L, POTASHKIN J, BEACH D. Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeasts encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell* 1987; **50**: 319–325.



- [3] EL-DEIRY WS, TOKINO T, VELCULESCU VE, LEVY DB, PARSONS R, TRENT JM, LIN D, MERCER WE, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; **75**: 817–825.
- [4] EWEN ME, SLUSS HK, WHITEHOUSE LL, LIVINGSTON DM. TGF $\beta$  inhibition of cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 1993; **74**: 1009–1020.
- [5] GU Y, TURCK CW, MORGAN DO. Inhibition of CDK2 activity *in vivo* by an associated 20 K regulatory subunit. *Nature* 1993; **366**: 707–710.
- [6] GYURIS J, GOLEMIS E, CHERTKOV H, BRENT R. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with cdk2. *Cell* 1993; **75**: 791–803.
- [7] HARPER JW, ADAMI GR, WEIN, KEYOMARSIK, ELLEDGE SJ. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases. *Cell* 1993; **75**: 805–816.
- [8] HUNTER T. Braking the cycle. *Cell* 1993; **75**: 839–841.
- [9] KAWIAK J. Regulacja cyklu mitotycznego. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 325–333.
- [10] MALLER JL. On the importance of protein phosphorylation in cell cycle control. *Molec Cell Biochem* 1993; **127/128**: 267–281.
- [11] MENDENHALL MD. An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1993; **259**: 216–219.
- [12] NASMYTH K, HUNTER T. Dams and sluices. *Nature* 1993; **366**: 634–635.
- [13] NODA A, NING Y, VENABLE SF, PEREIRA-SMITH OM, SMITH JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen source. *Exp Cell Res* 1994; **211**: 90–98.
- [14] PARGE HE, ARVAI AS, MURTARI DJ, REED SI, TAINER JA. Human Ckshs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control. *Science* 1993; **262**: 387–395.
- [15] PETER M, GARTNER A, HORECKA J, AMMERER G, HERSKOWITZ I. FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* 1993; **73**: 747–760.
- [16] POLYAK K, KATO JY, SOLOMON MJ, SHERR CJ, MASSAGUE J, ROBERTS JM, KOFF A. p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; **8**: 9–22.
- [17] RICHTER KH, AFSHARI CA, ANNAB LA, BURKHART BA, OWEN RD, BOYD J, BARRETT JC. Down-regulation of cdc2 in senescent human and hamster cells. *Canc Res* 1991; **51**: 6010–6013.
- [18] SERRANO M, HANNON GJ, BEACH D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; **366**: 704–707.
- [19] WÓJCIK C. Współczesne poglądy na temat regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 153–167.
- [20] WÓJCIK C. Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 331–352.
- [21] XIONG Y, HANNON GJ, ZHANG H, CASSO D, KOBAYASHI R, BEACH D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; **366**: 701–704.

Otrzymano: 20.06.1994 r.

Przyjęto: 27.06.1994 r.

Adres autora: ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa



## OSCYLACYJNY CHARAKTER ZMIAN PODSTAWOWYCH WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK ROŚLINNYCH

### OSCILLATORY CHANGES IN THE BASIC PROPERTIES OF PLANT CELLS

Edward Jerzy ŚPIEWLA

Zespół Biofizyki Katedry Fizyki Politechniki Lubelskiej

*Streszczenie:* Udział procesów oscylacyjnych w generowaniu czasowej i przestrzennej organizacji układów żywych, stanowi w ostatnich latach przedmiot intensywnych badań. W niniejszej pracy podjęto próbę dokonania przeglądu uzyskanych dotąd wyników dotyczących stopnia rozpoznania oscylacyjnych zmian podstawowych właściwości komórek, ze szczególnym uwzględnieniem rezultatów otrzymanych dla komórek i złączy międzykomórkowych roślin *Characeae*.

*Słowa kluczowe:* *Characeae*, oscylacje, potencjały, opór, plazmodesmy, elektryczne sprzężenia.

*Summary:* In recent years, participation of oscillatory processes in the generation of time and spatial organization of living systems has been a topic of intensive studies. In the present work an attempt is made to review the results, obtained so far, dealing with our understanding of oscillatory changes in the basic properties of cells, with particular consideration of the results obtained for cells and intercell nodes of plants.

*Key words:* *Characeae*, oscillations, potentials, resistance, plasmodesmata, electrical couplings.

## WSTĘP

Udział niestabilności, fluktuacji i nie gasnących oscylacji w generowaniu czasowej i przestrzennej organizacji układów ożywionych, stanowi jeden z bardziej intensywnie rozwijanych kierunków badań biologicznych. Można wyróżnić cztery zasadnicze aspekty tych badań:

– koordynacja i optymalizacja działania szlaków metabolicznych, mechanizmów regulacyjnych oraz układów związanych z transdukcją sygnałów i energii [7, 10, 25, 40, 50, 95 i inne];

– mechanizmy "zegarów biologicznych" [14, 16 i inne];

– procesy różnicowania przestrzennego i morfogenezy [1, 24 i inne].

Ważną przesłanką intensyfikacji badań nad czasową i przestrzenną organizacją układów żywych, w szczególności periodycznością procesów i struktur, stały się dokonania w zakresie termodynamiki nierównowagowej; opracowanie fenomenologicznej teorii procesów nieodwracalnych (prace Onsagera, Meixnera, Prigogine'a), teoretyczne wykrycie i doświadczalne potwierdzenie występowania procesów samoorganizacji przestrzenno-czasowej, tzw. struktur dyssypatywnych w reakcyjno-dyfuzyjnych układach chemicznych, znajdujących się w stanach odległych od równowagi – typu reakcji Biełousowa-Żabotyńskiego itp. Rozwijaniu teorii struktur dyssypatywnych w zakresie fizyki i chemii towarzyszyły biologiczne badania procesów kontroli i regulacji, w których wykazano m.in., że typowe mechanizmy regulacji działające na zasadzie sprzężenia zwrotnego (np. autokataliza, autoinhibicja, kataliza krzyżowa), stanowią przykłady reakcji "nieliniowych" (tzn. że równania opisujące ich kinetykę chemiczną są nieliniowe), w których wyniku w określonych warunkach powstają specyficzne formy samoorganizacji. Tak powstające struktury, podobnie jak organiczne elementy organizmów żywych, wykazują rytmiczne oscylacje biochemiczne, morfologiczne i fizjologiczne.

Nagromadzono w ostatnich latach sporo faktów doświadczalnych wskazujących, że występowanie niestabilności i oscylacji jest w układach ożywionych bardziej regułą niż wyjątkiem. Pełne zrozumienie fizjologicznej roli oscylacyjnych zachowań, jak również fizykochemicznych mechanizmów ich generowania wydaje się być jednak ciągle dość odległe i wymaga wielu badań. Zupełnie niedawno zdano sobie np. sprawę, iż oscylacyjny charakter zachowań nie jest prostym odzwierciedleniem i bezpośrednim skutkiem periodycznych zmian właściwości środowiska, ale bardzo ważnym elementem adaptacji i minimalizacji zakłóceń homeostazy – zakłóceń wywoływanych zwykle cyklicznymi, fazowymi zmianami fizyko-chemicznych czynników otoczenia. Wbudowanie programu zmian środowiska do biologicznej organizacji zachowań ustroju sprawia, że staje się on "przygotowany" do tych zmian i to zarówno o charakterze cyklicznym, jak i pojawiających się przypadkowo.

Ten kontekst ekologiczny oraz dokonany postęp w wyjaśnianiu integracji struktur i ich funkcji biologicznych na różnych poziomach organizacji układów żywych nadaje badaniom oscylacyjnych zmian właściwości i zachowań szczególne znaczenie. Podstawowe mechanizmy generowania oscylacji na poziomie komórkowym lokalizuje się w funkcjonowaniu szlaków metabolicznych oraz w procesach transportowych przez błony komórkowe [14, 85 i inne]. Teoretycznie i eksperymentalnie dowiedziono występowanie *in vivo* i *in vitro* szlaków metabolicznych, których funkcjonowaniu towarzyszą oscylacyjne zmiany stężenia metabolitów. Fotosynteza, oddychanie oraz



glikoliza, to reakcje o charakterze oscylacyjnym, związane z wytwarzaniem energii metabolicznej i najprawdopodobniej stanowiące podstawę szeregu oscylacyjnych zmian zachodzących w komórkach [49, 73 i inne].

Z kolei badania procesów transportu transmembranowego dowodzą słuszności tezy o "oscylatorze błonowym"; rytmiczne zmiany strukturalnych i funkcjonalnych własności błon korelują z ekspresją szeregu rytmów [14, 85 i inne]. Koncepcja, iż błony stanowią ważny element oscylatorów fizjologicznych, znajduje również potwierdzenie w wielu pracach wykonanych na układach modelowych – sztucznych błonach lipidowych oraz roztworach białek – jako obiektach dość dobrze zdefiniowanych i podlegających kontroli eksperymentatora.

Celem niniejszego opracowania jest dokonanie – chociaż wybiórczego przeglądu badań oscylacyjnych zmian właściwości komórek, przybliżenie charakterystyk tych zmian i odniesienie ich do układów modelowych. Szczegółowiej przedstawione zostaną wyniki otrzymane dla komórek i złącz międzykomórkowych roślin z rodziny *Characeae*, traktowanych jako materiał modelowy i bardzo dogodny dla badania oscylacyjnych zachowań komórek roślinnych.

## ZMIENNOŚĆ WYBRANYCH WŁAŚCIWOŚCI POJEDYNCZEJ KOMÓRKI

Dość powszechny jest pogląd, że rytmiczny charakter różnorodnych procesów komórkowych stanowi ważny element sprzężenia tworzących komórkę substruktur i organelli, a także ich kontroli i stabilizacji. Wprowadzone wcześniej dwie grupy mechanizmów odpowiedzialnych za generowanie oscylacji w pojedynczej komórce nazywane są odpowiednio: "oscylatorem metabolicznym" oraz "oscylatorem błonowym". Występują one niezależnie lub równocześnie z dominacją jednego mechanizmu, zależnie od rodzaju komórki. Komórki drożdży (*Saccharomyces*) stanowią typowy przykład funkcjonowania oscylatora metabolicznego związanego z cyklem glikolitycznym, natomiast w komórkach wydzielniczych i nerwowych zwierząt obserwuje się głównie oscylacje typu błonowego. Wydaje się jednak, iż funkcjonowanie obu oscylatorów nie odbywa się niezależnie, gdyż sprzężenia procesów metabolicznych komórki realizowane są za pośrednictwem błon; zmiany ich przepuszczalności dla jonów i metabolitów limitują zachodzenie i szybkość reakcji biochemicznych. Z kolei stan energetyczny komórki, zależny wprost od metabolizmu, warunkuje procesy transportu błonowego przesądając o wartości potencjału spoczynkowego i gęstości ładunku powierzchniowego, a tym samym o konformacji i aktywności białek błonowych.

Nie wdając się w rozważania o mechanizmach generowania oscylacji, zgodnie z głównym celem niniejszego opracowania przedstawione zostaną niżej dane o różno-



TABELA 1. Wybrane przykłady procesów oscylacyjnych zachodzących w komórkach

Proces	Okres	Rodzaj komórek lub organizm
<b>Oscylacje aktywności enzymów</b>		
ATPaza	1–2,5 min	mikrosomy nerki i mózgu
dehydrogenaza mleczanowa	1–3 min	<i>Acetabularia</i>
lucyferaza	24 h	<i>Gonyaulax polyedra</i>
<b>Oscylacyjne reakcje biochemiczne</b>		
glikoliza	2 s–3 h	<i>Saccharomyces</i>
fotosynteza	4–6 s	<i>Chlorella</i>
	24 h	<i>Gonyaulax polyedra</i>
oddychanie	1 h	<i>Acanthamoeba castellani</i>
<b>Oscylacje kształtu komórek</b>		
	24 h	<i>Euglena gracilis</i>
<b>Oscylacje objętości i kształtu organelli</b>		
mitochondria	1–30 min	komórki wątroby szczura
chloroplasty	24 h	<i>Acetabularia</i>
<b>Oscylacje poziomu metabolitów i podstawowych jonów</b>		
Ca <sup>2+</sup>	100–200 s	<i>Physarum polycephalum</i>
ATP	100–200 s	<i>Physarum polycephalum</i>
K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup>	24 h	<i>Neurospora crassa</i>
polisacharydy w chloroplastach	24 h	<i>Acetabularia</i>
<b>Oscylacje syntezy białek</b>		
	1 h	<i>Acanthamoeba castellani</i>
	24 h	<i>Acetabularia</i>
<b>Oscylacje strumienia jonów przez błony tylakoidów</b>		
	24 h	<i>Gonyaulax polyedra</i>
<b>Oscylacje metabolizmu kwasów nukleinowych, zawartość RNA, DNA</b>		
	24 h	<i>Neurospora crassa</i>
<b>Oscylacje bioelektryczne</b>		
potencjał elektryczny	0,1–20 s	neurony ślimaka
	1 s–5 min	komórki wydzielnicze gruczołów ślinowych
generowanie spontanicznych pot. czynnościowych	4–25 min	<i>Acetabularia</i>
<b>Oscylacyjne ruchy komórkowe</b>		
ruch cytoplazmy	100–200 s	<i>Physarum polycephalum</i>
migracja chloroplastów	24 h	<i>Acetabularia</i>
<b>Oscylacje towarzyszące procesom wzrostu i rozwoju komórek</b>		
ruchy podczas grupowania	5–10 min	<i>Dictyostelium discoideum</i>
mitoza	8–12 h	<i>Physarum polycephalum</i>
uwalnianie i wzrost spor	6–16 h	<i>Ascomycetes</i>
<b>Oscylacje bioluminescencji</b>		
	24 h	<i>Gonyaulax polyedra</i>

Tabelę sporządzono na podstawie prac Rappa [70] oraz Edmunda [14]

rodnym procesach rytmicznych, w różnych rodzajach komórek, a zwłaszcza w jednokomórkowych glonach (*Acetabularia*, *Chlamydomonas*, *Euglena*, *Gonyaulax*), grzybach (*Neurospora*) i drożdżach (*Saccharomyces*), jako układach szczególnie użytecznych w omawianych tu badaniach [3, 5, 14 i inne]. W tabeli 1 zestawiono wybrane przykłady oscylacji dokumentujące prawidłowość, iż występują one powszechnie w komórkach, dotyczą różnych procesów i parametrów (elektrycznych, biochemicznych i strukturalnych) charakteryzujących stan komórki, mają szerokie widmo częstotliwości (w przytoczonych przykładach okresy oscylacji wynoszą od 0,1 sekundy do 24 godzin).

Międzywęzłowe komórki roślin *Characeae* (ich długość zawiera się w przedziale od kilku do kilkunastu cm, a średnica sięga 0,5 mm) stanowią obiekt powszechnie badany przez biofizyków i elektrofizjologów. Komórki te są dobrze poznane pod względem morfologiczno-funkcyjnym i okazały się być szczególnie dogodnym i interesującym materiałem dla badań periodycznych struktur przestrzenno-czasowych na poziomie komórkowym oraz oscylatorów membranowych. Co prawda, dotąd dla komórek tych roślin nie prowadzono systematycznych badań oscylacji typu metabolicznego, ale o możliwości ich występowania świadczą wyniki badań ultrastabej luminescencji prowadzone w naszym Zespole (A. Jaśkowska i P. Segit) oraz fluorescencji chlorofilu (P. Kuenecke – nie publikowane wyniki cytowane za Fisahnem i wsp. [19]). Badania parametrów charakteryzujących stan błony komórkowej roślin *Characeae* ograniczały się głównie do oscylacji potencjału membranowego [19, 27, 57 i inne].

Nishizaki [56], jako pierwszy wykrył u *Chara brauni* lokalne oscylacje potencjału spoczynkowego błony w okresie kilku do kilkunastu minut i amplitudzie wynoszącej około 10 mV, prowadząc długotrwałą rejestrację wartości różnicy potencjałów pomiędzy mikroelektrodą wprowadzoną do wakuoli komórki i elektrodą odniesienia umieszczoną w roztworze, w którym znajdowała się komórka. Podobne okresowe zmiany potencjału otrzymał rejestrując różnicę potencjałów przy powierzchni dwóch kontaktujących się przez roztwór zewnętrzny obszarów błony. Wykryte w tych warunkach zmiany różnicy potencjałów w różnych obszarach autor interpretował jako wynik nakładania się periodycznych zmian potencjałów tych obszarów. Lokalne oscylacje potencjału, a także przewodnictwa i pH w komórkach *Characeae* zostały potwierdzone w wielu pracach [80, 84–87, 94 i innych].

Rejestrowane w różnych obszarach (kilkumilimetrowej szerokości) komórek międzywęzłowych oscylacje potencjału, ze względu na okres ich zmian, a także postulowane funkcje fizjologiczne, Fisahn i wsp. [19] oraz Hansen [27] podzielili na trzy główne typy o okresach odpowiednio:  $T = 45$  s,  $T = 15$  min i  $T = 1$  h (dalej będą one oznaczane jako typy: "45 s", "15 min" oraz "1 h"). Umowne wartości  $T$  stanowią wielkości uśrednione dla grupy oscylacji, których rzeczywiste okresy mogą różnić się o czynnik wynoszący w przybliżeniu 2. W przypadku badania oscylacji oporu błony komórkowej, np. techniką mikroelektrodową lub elektrod zewnętrznych (opis metod



znajduje się w pracach wcześniejszych [75, 76]), najczęściej rejestrowano oscylacje typu "15 min", rzadziej "3 min" i najrzadziej "1 h". Średnie amplitudy zmian oporu w oscylacjach typu "15 min" i "1 h" wynosiły ok. 20% średniej wartości oporu błony.

U części badanych komórek oscylacje nie występowały, a w komórkach, w których wykrywano oscylacje potencjału lub oporu, niekiedy oscylacje te zanikały bez wyraźnej przyczyny. Oscylacje "1 h" pojawiają się spontanicznie, mogą też być indukowane np. sinusoidalną modulacją natężenia oświetlenia, przepływem prądu czy zmianą pH wewnątrz komórki [19, 27, 87 i inne]. Oscylacje "15 min" obserwowano wyłącznie jako generowane spontanicznie – w literaturze ciągle brak jakichkolwiek danych o ich generacji wywoływanej przez czynniki zewnętrzne.

Podstawowe dane dotyczące zjawisk "periodyczności czasowej" w komórkach roślin *Characeae* przedstawiono w tabeli 2. W tabeli 3 podano natomiast uzyskane dotąd dane dotyczące "periodyczności przestrzennej"; jak widać najwięcej prac poświęcono tworzeniu się wokół komórek międzywęzłowych – przemiennie – pasm zasadowych i kwasowych, którym towarzyszy powstawanie obszarów odpowiadających depolaryzacji i hiperpolaryzacji błony.

Za formowanie się wzdłuż komórek periodycznych struktur czasowo-przestrzennych, czyni się odpowiedzialną pompę protonową. Lokalne, zsynchronizowane na sporych obszarach komórki (w pasmach o szerokości kilku mm) zmiany aktywności pompy protonowej można tłumaczyć występowaniem wewnątrz i na zewnątrz komórki stałych fluktuacji stężenia jonów  $\text{OH}^-$ , które w pewnych warunkach mogą rozros-

TABELA 2. Periodyczność czasowa u *Characeae*

Parametr	Okres	Rodzaj	Prace
Potencjał błony	kilka do kilkadziesiąt s	<i>Nitella</i>	[69, 96, 97]
	45 s	<i>Nitella</i>	[6, 19, 56]
	2–4 min	<i>Nitella, Chara</i>	[20, 29, 31, 37]
	15 min	<i>Nitella, Chara</i>	[6, 19, 26, 38, 57, 94]
	1 h	<i>Nitella</i>	[6, 19, 26]
	45 s, 15 min, 1 h	<i>Nitellopsis obtusa</i>	[84]
Przewodnictwo błony	45 s	<i>Nitella</i>	[19]
	2 min	<i>Chara</i>	[20, 78]
	15 min	<i>Nitella</i>	[19]
	1 h	<i>Nitellopsis, Nitella</i>	[19, 20, 80]
	3 i 15 min, 1 h	<i>Nitellopsis obtusa</i>	[91]
pH przy zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej	2–4 min	<i>Nitella, Chara</i>	[20]
Gęstość prądów jonowych przy zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej	2–4 min	<i>Nitella</i>	[20]



TABELA 3. Periodyczność przestrzenna u *Characeae*

Parametr	Okres	Rodzaj	Prace
Potencjał błony	3–8 mm 2–8 mm	<i>Chara</i> <i>Nitellopsis</i> , <i>Nitella</i>	[20, 58, 59, 77, 94] [84]
Przewodnictwo błony	4 mm kilka mm	<i>Chara</i> <i>Nitellopsis</i> , <i>Nitella</i>	[8, 58] [91]
Pojemność błony			[8]
pH przy zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej	kilka mm	<i>Chara</i> , <i>Nitella</i>	[4, 15, 17, 18, 20, 21, 30, 41–47, 54, 61,78, 79, 80, 98]
Gęstość prądów jonowych przy zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej	4–8 mm	<i>Chara</i> , <i>Nitella</i>	[13, 16, 20]
Depozyty wapnia (inkrustacja węglanem wapnia)	kilka mm	<i>Chara</i>	[47, 52]
Depozyty mikrofibryli celulozowych	kilka mm	<i>Nitella</i>	[71]
Organizacja mikrotubul	kilka mm	<i>Chara</i>	[99]

nać się do poziomu makroskopowego. Jeśli w konsekwencji takiego procesu w jakimś obszarze przy zewnętrznej powierzchni błony koncentracja jonów  $\text{OH}^-$  wzrośnie, to następuje tam osłabienie działania pompy protonowej i wystąpi lokalnie depolaryzacja błony, a co za tym idzie intensywniejsze niż w obszarach sąsiednich gromadzenie się jonów  $\text{OH}^-$ . Również wewnątrz komórki zwiększa się stężenie jonów  $\text{OH}^-$ , co z kolei prowadzi do ich wypływu na zewnątrz. Tam zaś, gdzie koncentracja jonów  $\text{OH}^-$  utrzymuje się na stałym poziomie, następuje wzmożona aktywacja pompy protonowej, rośnie hiperpolaryzacja błony i formują się obszary kwasowe [4, 48, 94].

Wiele danych eksperymentalnych wskazuje, że tworzące się wokół komórek międzywęzłowych pasma o zmieniających się okresowo właściwościach można uznać za struktury dyssypatywne [93]. Stwierdzono m.in., że pasma pojawiają się, gdy dostarczona układowi energia przekracza pewną wartość krytyczną, przeprowadzając układ w stan daleki od równowagi. Wykazano ponadto, że na formowanie się pasm oraz ich stabilizację ma wpływ jakość środowiska wewnętrznego i zewnętrznego komórki (objętość, skład jonowy, mieszanie roztworu, zaburzenia chemiczne, elektryczne, mechaniczne).

## OSCYLACYJNE ZMIANY WŁAŚCIWOŚCI ZŁĄCZ KOMÓRKOWYCH

Integracja funkcji biologicznych w obrębie wielokomórkowego organizmu żywego, wymaga komunikacji także pomiędzy komórkami. Stosunkowo szeroko udokumentowano fizjologiczną rolę oscylacji w systemie komunikacji wewnątrzkomórkowej i międzykomórkowej pośredniej. W komórce np. poziom szeregu hormonów i poziom wewnątrzkomórkowych przekaźników (takich jak cAMP – cykliczny adenylo-3', 5'-monofosforan i  $Ca^{2+}$ ) wykazują oscylacyjne zmiany w czasie [3, 11]. W chemicznej komunikacji międzykomórkowej, czyli pośredniej, przykładem sygnalizacji za pomocą kodu częstotliwościowego jest wysyłanie okresowych sygnałów przez śluzowce (*Dictyostelium discoideum*) w formie cAMP [23, 40]. W cytowanych pracach wykazano, że fizjologiczny efekt wielu sygnałów może być powiązany z ich czasową zmiennością. Otrzymuje się coraz więcej danych wskazujących, iż kodowanie informacji "częstotliwościowe" jest dość powszechne i występuje na wszystkich poziomach organizacji [22].

Wykrycie oscylacyjnych zmian oporu elektrycznego przegrody międzykomórkowej u *Characeae* (węzła) po uszkodzeniu [81, 82] sugerowało, że również działaniu symplastycznych mechanizmów regulacyjnych mogą towarzyszyć oscylacyjne zmiany właściwości złącz międzykomórkowych. Wiadomo bowiem, że bezpośrednie sprzężenia międzykomórkowe u roślin realizowane są za pośrednictwem tubularnych, wyścielonych plazmalemmą struktur, zwanych plazmodesmami. O ile zagadnienia dotyczące formowania się struktury plazmodesm są dość szeroko udokumentowane w literaturze [53, 72, 91 i inne], o tyle dane dotyczące ich funkcjonowania są bardzo skąpe; a o cykliczności zmian ich właściwości brak jakichkolwiek danych.

Na podstawie pracy [91] wiadomo, że ok. 80% badanych węzłów u *Nitellopsis obtusa* wykazuje jeden lub więcej typów oscylacji. Średnia wielkość amplitudy zmian oporu węzłów wyniosła dla *Nitellopsis obtusa* 29% średniej wartości ich oporu. Podobnie jak dla oscylacji oporu błon komórkowych, wyróżniono trzy typy oscylacyjnych zmian oporu złącz: "3 min", "15 min" oraz "1 h". Najczęściej występują zmiany typu "15 min", rzadziej "3 min" i najrzadziej "1 h". Pomiar prowadzone były techniką elektrod zewnętrznych, a dla weryfikacji ich poprawności część badań realizowano quasirównolegle również mikroelektrodami [83].

## OSCYLACYJNE ZMIANY WŁAŚCIWOŚCI UKŁADÓW MODELOWYCH

Ze względu na złożoność procesów biologicznych, użytecznym podejściem jest badanie układów modelowych i w szczególności sztucznych błon lipidowych. Bada-



nie mechanizmów generowania oscylacji w modelowych układach biocząsteczek przy braku organizacji komórkowej, a w szczególności roztworów białek, również jest wielce obiecujące i może stanowić ważny przyczynek dla wyjaśnienia fizyko-chemicznych aspektów funkcjonowania oscylatorów fizjologicznych. Postępowanie takie wymaga jednak sporej ostrożności i wielorakich weryfikacji.

W miarę postępu w rozpoznawaniu roli białek w procesach życiowych, coraz częściej analizuje się ich znaczenie i funkcje, uwzględniając ich specyficzne właściwości dynamiczne [2, 12, 60]. Stwierdzono doświadczalnie, że aktywność enzymów w komórce, określana zarówno *in vivo*, jak też *in vitro*, wykazuje rytmiczną zmienność w czasie. Obserwowane zmiany przypisywane są działaniu kilku mechanizmów [66, 68]):

- zmianom liczebności populacji cząsteczek enzymu, będących konsekwencją rytmiczności ich syntezy,
- rytmicznym posttranslacyjnym modyfikacjom enzymu, związanym m.in. z cyklem fosforylacji (defosforylacji) cząsteczek enzymu oraz
- działaniu strumieni metabolicznych danego szlaku lub szlaków sprzężonych, co może prowadzić do zmiany stężenia substratów, efektorów, pH itp.

TABELA 4. Rytmiczne zmiany właściwości enzymów *in vitro* – w roztworach

Enzym	Pochodzenie	Rytmicznie zmieniający się parametr	Okres	Prace
Kinaza kreatynowa	mięśnie	aktywność	45–60 s	[9]
Aktomiozyna	mięśnie	konformacja	45–60 s	[74]
Hydroksylaza tyrozyny	mózg szczura		10–40 min	[51]
Karboksylaza fosfo-enolopirogronianowa	liście <i>Kalanchoe blossfeldiana</i>	aktywność	16–27 h +	[62, 63, 65, 67]
Dehydrogenaza jabłczanowa	liście <i>Kalanchoe blossfeldiana</i>	własności katalityczne: aktywność, stała Michaelisa-Menten, krzywa nasycenia dla substratu (kształt), charakter kinetyki reakcji (kształt), wrażliwość na działanie efektorów	20–25 h	[39, 63, 64, 67]
Peroksydaza chrzanowa			10–39 h + zmiany szybkie	[85, 88]
Peroksydaza bakterii	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	oddziaływanie z rozpuszczalnikiem (NMR): czasy relaksacji protonu agregatów wodnych, parametr porządku agregatów wodnych, czasy korelacji wymiany protonu, przesunięcie chemiczne widma NMR	10–39 h	[89, 90]

(informacje nie publikowane)

W tabeli 4 zestawiono przykłady rytmicznych zmian właściwości enzymów *in vitro* – w roztworach.

Przechodząc do problematyki oscylacji obserwowanych na błonach sztucznych, należy przypomnieć, iż zgodnie z wynikami badań mikroskopowych i innych, zasadniczym elementem strukturalnym błony jest podwójna warstwa fosfolipidowa. Funkcje błony zależą silnie od właściwości tworzących ją lipidów, a więc ich uporządkowania i dynamiki łańcuchów, ich giętkości i ruchliwości, stanów konformacyjnych itd. Oscylacyjne zmiany parametrów elektrycznych (potencjału transmembranowego, przewodnictwa, pojemności) obserwowano w różnych typach błon lipidowych oraz w modyfikowanych błonach lipidowych – z rekonstruowanymi białkami kanałowymi. W przypadku błon składających się wyłącznie z lipidów oscylacje własności elektrycznych obserwowano jedynie w warunkach nierównowagowych, wywołanych np. przepływem prądu przez błonę, występowaniem gradientu chemicznego lub elektrycznego w poprzek błony, różnicy ciśnień osmotycznych bądź hydrostatycznych itd. [32, 100 i inne].

W tabeli 5 przytoczono przykładowe wyniki obserwacji oscylacyjnych zmian parametrów elektrycznych, zachodzących w błonach sztucznych. Z zestawionych

TABELA 5. Przykłady oscylacyjnych zmian parametrów elektrycznych błon sztucznych

Rodzaj błony lipid/warunki	Parametr	Okres	Prace
<b>Błony zbudowane wyłącznie z lipidu</b>			
DOPH na filtrze miliporowym	potencjał	1 h	[35]
– gradient stężenia jonów		kilka minut	[32]
– przepływ prądu elektr.			
– różnica ciśnień		kilka sekund	[32, 33, 92, 93]
DOPC – BLM na otworu	natężenie prądu	kilka sekund	[100]
– gradient potencjału			
DOPC otrzymana techniką "pipette-clamp"	natężenie prądu	kilka sekund	[100]
– gradient potencjału			
DOPC wielowarstwa na podłożu porowatego papieru filtracyjnego	natężenie prądu	kilka sekund	[100]
– gradient potencjału			
DOPC/diolychlofosforan BLM	pojemność	kilkadziesiąt sekund	[34]
– napięcie zewnętrzne			
<b>Modyfikowane błony lipidowe</b>			
BLM zawierająca białka	potencjał	kilkadziesiąt sekund	[55]
BLM z rekonstruowanymi kanałami sodowymi z mózgu szczura	przewodnictwo	kilka sekund	[28]
BLM lecytynowa modyfikowana polipirole	potencjał natężenie prądu	ok. 40 s	[36]



danych wynika, że przedział częstości oscylacji rejestrowanych w różnych układach modelowych jest dość szeroki i w dużym zakresie pokrywa się z częstotliwościami oscylatorów fizjologicznych. Dla błon lipidowych o określonym składzie okresy zmian ich właściwości zależą od intensywności oddziaływania zastosowanego czynnika nierównowagowego (bądź kombinacji kilku czynników). Na podstawie przedstawionych wyżej oraz nie cytowanych tutaj danych, sformułowano dość prawdopodobne hipotezy wyjaśniające mechanizm generowania omawianych oscylacji [32, 92, 95, 100 i inne].

## LITERATURA

- [1] ALMIRANTIS Y, PAPAGEORGION S. Cross-diffusion effects on chemical and biological pattern formation. *J Theor Biol* 1991; **151**: 289–311.
- [2] ASTUMIAN RD, CHAK PB, TSONG TY, WESTERHOFF HV. Effects of oscillations and energy-driven fluctuations on the dynamics of enzyme catalysis and free energy transduction. *Phys Rev A* 1989; 6416–6435.
- [3] BERRIDGE MJ. Cytoplasmic calcium oscillations: A two pool model. *Cell Calcium* 1991; **12**: 63–72.
- [4] BISSON MA. The effect of darkness on active and passive transport in *Chara corallina*. *J Exp Bot* 1986; **37**: 8–21.
- [5] BISSON MA, SIEGEL A, CHAU R, GELSOMINO S, HERDIC S. Distribution of charasomes in *Chara*: Binding pattern and effect of photosynthetic inhibitors. *Aust J Plant Physiol* 1991; **18**: 81–93.
- [6] BOELS HD, HANSEN UP. Light and electric current stimulate the same feed-back system in *Nitella*. *Plant Cell Physiol* 1982; **23**: 343–346.
- [7] BORNENS M, PAINTRAND M, CELATI C. The cortical microfilament system of lymphoblasts displays a periodic oscillatory activity in the absence of microtubules: implications for cell polarity. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1071–1083.
- [8] CHILCOTT TC, COSTER HGL, OGATA K, SMITH JR. Spatial variation of the electrical properties of *Chara*: II. Membrane capacitance and conductance as a function of frequency. *Aust J Plant Physiol* 1983; **10**: 353–362.
- [9] CHETVERIKOVA EP. Oscillations in muscle creatine kinase activity. [w] Biological and biochemical oscillators. Chance B, Pye EK, Ghosh AK, Hess B [red] New York: Academic Press 1973: 347–362.
- [10] CORTASSA S, AON MA, WESTERHOFF HV. Linear nonequilibrium thermodynamics describes the dynamics of autocatalytic system. *Biophys J* 1991; **60**: 794–803.
- [11] CUTHBERTSON KSR. Intracellular calcium oscillators. [w] Cell to cell signaling: From experiments to theoretical models. Goldbeter A [red] London: Academic Press 1989; 435–447.
- [12] DI IORIO EE, HITPOLD UR, FILIPOVIC D, WINTERHALTER KH, GRATTON E, VITRANO E, CUPANE A, LEONE M, CARDONE L. Protein dynamics. Comparative investigation on heme-proteins with different physiological roles. *Biophys J* 1991; **59**: 742–754.
- [13] DORN A, WEISENSEEL MH. Growth and the current pattern around internodal cells of *Nitella flexilis* L. *J Exp Bot* 1984; **35**: 373–383.
- [14] EDMUNDS LN. Cellular and molecular bases of biological clocks. New York: Springer Verlag 1988.
- [15] FERRIER J, LUCAS WJ. Ion transport and the vibrating probe. *Biophys J* 1986; **64**: 1134–1137.
- [16] FISAHN J, LUCAS WJ. Effects of microtubule agents on the spatial and electrical properties of the plasma membrane in *Chara corallina*. *Planta* 1990; **182**: 506–512.
- [17] FISAHN J, LUCAS WJ. Autonomous local control area over membrane transport in *Chara* internodal cells. *Plant Physiol* 1991; **95**: 1138–1143.
- [18] FISAHN J, LUCAS WJ. Direct measurement of the reversal potential and current - voltage characteristics in the acid and alkaline regions of *Chara corallina*. *Planta* 1992; **186**: 241–248.
- [19] FISAHN J, MIKSCHL E, HANSEN UP. Separate oscillations of the electrogenic pump and of  $K^+$  - channel in *Nitella* as revealed by simultaneous measurements of membrane potential and of resistance. *J Exp Bot* 1986; **37**: 34–47.
- [20] FISAHN J, MCCONNAUGHEY T, LUCAS WJ. Oscillations in extracellular current, external pH and membrane potential and conductance in the alkaline bands of *Nitella* and *Chara*. *J Exp Bot* 1989; **40**: 1185–1193.

- [21] FRANCESCHI VR, LUCAS WJ. Structure and possible function (s) of Charasomes; complex plasmalemma – cell wall elaborations present in some Characean species. *Protoplasma* 1980; **104**: 253–271.
- [22] GOLDBETER A. Periodic signalling as an optimal mode of intercellular communication. *News Physiol Sci* 1988; **3**: 103–105.
- [23] GOLDBETER A. Rythmes et chaos dans les systemes biochimiques et cellulaires. Paris: Masson 1990.
- [24] GOODWIN B. Developing organisms as self-organizing fields. [w] Self-organizing systems. Yates FE [red] New York: Plenum Press 1987: 167–180.
- [25] GREPPIN H, BOZON M, CRESPI P, CRÉVECOEUR M, DEGLI AGOSTI R, PENEL C, TACCHIMI P. Communication in plants. Plant signalling, plasma membrane and change of state. [w] Penel C, Greppin H [red] Genève: Imprimerie Nationale 1991: 139–177.
- [26] HANSEN UP. Do light included changes in the membrane potential of *Nitella* reflect the feed-back regulation of a cytoplasmic parameter. *J Membr Biol* 1978; **41**: 197–224.
- [27] HANSEN UP. Implications of control theory for homeostasis and phosphorylation of transport molecules. *Bot Acta* 1990; **103**: 15–23.
- [28] HARTSHORNE RP, KELLER BU, TALVENHEIMO JA, CATTERALL WA, MONTAL M. Functional reconstruction of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 240–245.
- [29] HAYASHI H, HIRAKAWA K. *Nitella* fluctuation and instability in the membrane potential near threshold. *Biophys J* 1980; **31**: 31–44.
- [30] HOMBLÉ F, JENARD A. Pseudo-inductive behaviour of the membrane potential of *Chara corallina* under galvanostic conditions. *J Exp Bot* 1984; **35**: 1309–1322.
- [31] HOPE AB, ASCHBERGER PA. Effects of temperature on membrane permeability to ions. *Aust J Biol Sci* 1970; **23**: 1047–1060.
- [32] IYAMA S, TOKO K, YAMAFUJI K. Electric oscillation in an excitable model membrane impregnated with lipid analogues. *Biophys Chem* 1987; **28**: 129–135.
- [33] IYAMA S, TOKO K, YAMAFUJI K. A highly sensitive frequency change by odorants in the electric oscillation of a lipid membrane. *Sens Mat* 1991; **3**: 1–7.
- [34] JANAS T, KUCZERA J, CHOJNACKI T. Voltage dependent behaviour of dolichyl phosphate-phosphatidylcholine bilayer lipid membranes. *Chem Phys Lipids* 1990; **52**: 151–155.
- [35] KAMO N, YOSHIOKA T, YOSHIDA M, SUGITA T. Transport phenomena in a model membrane accompanying a conformational change. Transient processes in response to external stimuli. *J Membr Biol* 1973; **12**: 193–205.
- [36] KOTOWSKI J, JANAS T, TIEN HT. Electrical oscillations in polypyrrrolecithin bilayer lipid membranes. *Bioelektrochem Bioenerg* 1988; **19**: 283–289.
- [37] LEFEBVRE J, GILLET C. Variations periodique de la difference de potentiel electrochimique chlorures au cours d'oscillations spontanees du potentiel de membrane chez *Nitella*. *Biochim Biophys Acta* 1970; **203**: 575–578.
- [38] LEFEBVRE J, LEFEVER R, GILLET C. Oscillations autoentretenues des potentiels de membrane *Nitella*. *Bull Soc Roy Bot Belg* 1970; **103**: 157–165.
- [39] LENK R, QUEIROZ-CLARET C, QUEIROZ O, GREPPIN H. Studies by NMR of *in vitro* spontaneous oscillations of activity in enzymatic extracts. *Chem Phys Lett* 1982; **92**: 187–190.
- [40] LI YX, GOLDBETER A. Pulsatile signalling in intercellular communication. Periodic stimuli are more efficient than random and chaotic signals in a model based on receptor desensitization. *Biophys J* 1992; **61**: 161–171.
- [41] LUCAS WJ. The influence of light intensity on the activation and operation of the hydroxyl efflux system of *Chara corallina*. *J Exp Bot* 1975; **26**: 347–360.
- [42] LUCAS WJ. Mechanism of acquisition of exogenous  $\text{HCO}_3^-$  by aquatic plants' *Annu Rev Plant Physiol* 1982; **34**: 71–104.
- [43] LUCAS WJ. Photosynthetic assimilation of exogenous bicarbonate by internodal cells of *Chara corallina*. *Planta* 1983; **156**: 181–192.
- [44] LUCAS WJ, ALEXANDER JM. Sulfhydryl group involvement in plasmalemma transport of  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{OH}^-$  in *Chara corallina*. *Plant Physiol* 1980; **65**: 274–280.
- [45] LUCAS WJ, DAINTY J. Spatial distribution of functional  $\text{OH}^-$  carriers along a Characean internodal cell: determined by the effect of cytochalasin B on  $\text{HCO}_3^-$  assimilation. *J Membr Biol* 1977; **32**: 75–92.
- [46] LUCAS WJ, NUCCITELLI R.  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{OH}^-$  transport across plasmalemma of *Chara*: Spatial resolution obtained using extracellular vibrating probe. *Planta* 1980; **150**: 120–131.
- [47] LUCAS WJ, SMITH FA. The formation of alkaline an acid region on the surface of *Chara corallina*. *J Exp Bot* 1973; **24**: 1–14.



- [48] LUCAS WJ, KEIFER DW, SANDERS D. Bicarbonate transport in *Chara corallina*: Evidence for cotransport of  $\text{HCO}_3^-$  with  $\text{H}^+$ . *J Membr Biol* 1983; **74**: 263–274.
- [49] LÜTTGE U, BECK F. Endogenous rhythms and chaos in crassulacean acid metabolism. *Planta* 1992; **188**: 28–38.
- [50] MANDELKOW E, MANDELKOW EM, HOTANI H, HESS B, MÜLLER SC. Spatial patterns from oscillating microtubules. *Science* 1989; **246**: 1291–1293.
- [51] MANDELL AJ, RUSSO PV. Striatal tyrosine hydroxylase activity: multiple conformational kinetic oscillators and product concentration frequencies. *J Neurosci* 1981; **1**: 380–389.
- [52] MCCONNAUGHEY T, FALK R. Calcium - proton exchange during algal acidification. *Biol Bull* 1991; **180**: 185–195.
- [53] MEINERS S, BARON-EPEL O, SCHINDLER M. Intercellular communication – filling in the gaps. *Plant Physiol* 1988; **88**: 791–793.
- [54] METRAUX JP, RICHMOND PA, TAI Z. Control of cell elongation in *Nitella* by endogenous cell wall pH gradients. Multiaxial extensibility of growth studies. *Plant Physiol* 1980; **65**: 204–210.
- [55] MUELLER P, RUDIN DO. Action potentials induced in bimolecular lipid membranes. *Nature* 1968: 713–719.
- [56] NISHIZAKI Y. Rhythmic changes in the resting potential of a single plant cell. *Plant Cell Physiol* 1968; **9**: 613–616.
- [57] OGATA K, KISHIMOTO U. Rhythmic change of membrane potential and cyclosis of *Nitella* internode. *Plant Cell Physiol* 1976; **17**: 201–207.
- [58] OGATA K, CHILCOTT TC, COSTER HGL. Spatial variation of electric properties of *Chara australis*. I. Electrical potentials and membrane conductance. *Aust J Plant Physiol* 1983; **10**: 339–351.
- [59] OGATA K, TOKO K, FUJIYOSHI T, YAMAFUJI K. Electric inhomogeneity in membranes of Characean internode influenced by light/dark transition,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$  - free air and extracellular pH. *Biophys Chem* 1987; **26**: 71–81.
- [60] POLLARD TD. Proteins as machines. *Nature* 1992; **355**: 17–18.
- [61] PRICE GD, BADGER MR, BASSET ME, WHITECROSS MI. Involvement of plasmalemmasomes and carbonic anhydrase in photosynthetic utilization of bicarbonate in *Chara corallina*. *Aust J Plant Physiol* 1985; **12**: 241–256.
- [62] QUEIROZ - CLARET C, GIRARD Y, GIRARD B, QUEIROZ O. Spontaneous long-period oscillations in the catalytic capacity of enzymes in solutions. *J Interdisc Cycle Res* 1985; **16**: 1–9.
- [63] QUEIROZ-CLARET C, LENK R, QUEIROZ O, GREPPIN H. NMR studies of in vitro slow oscillations in enzyme properties and dissipative structures. *Plant Physiol Biochem* 1988a; **26**: 333–338.
- [64] QUEIROZ-CLARET C, VALON C, QUEIROZ O. Are spontaneous conformational interconversions a molecular basis for longperiod oscillations in enzyme activity? *Chronobiol Int* 1988b; **5**: 301–309.
- [65] QUEIROZ-CLARET C, QUEIROZ O. Rythmes circadiens spontanés d'activite enzymatique (PEP carboxylase et malate dehydrogenase de *Kalanchoe*) dans extraits maintenus en conditions constantes. *CR Acad Sci Paris* 1981; **292**: 1237–1240.
- [66] QUEIROZ-CLARET C, QUEIROZ O. Multiple levels in the control of rhythms in enzyme synthesis and activity by circadian clocks: recent trends. *Chronobiol Int* 1990; **7**: 25–33.
- [67] QUEIROZ-CLARET C, QUEIROZ O. Enzyme circadian rhythms and conformational oscillators. Survey and prospects. *J Interdisc Cycle Res* 1991; **22**: 41–55.
- [68] QUEIROZ - CLARET C, QUEIROZ O. Seasonal and daily control of enzyme synthesis and activity by circadian clocks. [w] Biological rhythms in chemical and laboratory medicine. Touitou Y, Hans E [red] Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag 1992: 78–89.
- [69] RADENOVIC CN, VUCINIC Z. Oscillations of membrane potential. *Period Biol* 1985; **87**: 161–165.
- [70] RAPP PE. An atlas of cellular oscillators. *J Exp Biol* 1979; **81**: 281–306.
- [71] RICHMOND PA. Patterns of cellulose microfibril deposition and rearrangement in *Nitella*: in vivo analysis by birefringence index. *J Appl Polymer Sci* 1983; **37**: 107–122.
- [72] ROBARDS AW, LUCAS WJ. Plasmodesmata. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1990; **41**: 369–419.
- [73] RYDE-PETERSON U. A theoretical treatment of damped oscillations in biochemical reaction systems with application to the photosynthetic oscillations. Uniwersytet w Lund: rozprawa doktorska 1991.
- [74] SCHNOLL SE, CHETVERIKOVA EP. Synchronous reversible alterations in enzymatic activity (conformational fluctuations) in actomyosine and creatine kinase preparations. *Biochim Biophys Acta* 1975; **403**: 89–97.
- [75] SKIERCZYŃSKA J, ŻOŁNIERCZUK R, SPIEWLA E, BULANDA W, PRZYGDZKA A. Measurements of membrane resistance of *Characeae* with external electrodes and microelectrodes. *J Exp Bot* 1972; **23**: 591–599.
- [76] SKIERCZYŃSKA J, SPIEWLA E, ŻOŁNIERCZUK R, BULANDA W, WARDAK A. The measurements of membrane resistance of *Characeae* by alternating and direct currents. *J Exp Bot* 1973; **24**: 1015–1023.

- [77] SMITH JR, WALKER NA. Effects of ammonia and methylamine on  $\text{Cl}^-$  transport and on the pH changes and circulating electric currents associated with  $\text{HCO}_3^-$  assimilation in *Chara corallina*. *J Exp Bot* 1980; **31**: 119–133.
- [78] SMITH JR, WALKER NA. Effects of pH and light on the membrane conductance measured in the acid and basic zones of *Chara*. *J Membr Biol* 1985; **83**: 93–105.
- [79] SPEAR DG, BARR JK, BARR CE. Localization of hydrogen ion and chloride ion fluxes in *Nitella*. *J Gen Physiol* 1969; **54**: 397–414.
- [80] ŚPIEWLA E. Niejednorodność elektrycznych właściwości komórek roślin *Characeae*. *Folia Soc Sci Lubl* 1979; **21**: 87–92.
- [81] ŚPIEWLA E. The kinetic of after-injury processes of plasmodesmata of *Characeae*. *Folia Soc Sci Lubl* 1982; **24**: 19–27.
- [82] ŚPIEWLA E. Elektrofizjologiczne aspekty wpływu niektórych czynników środowiska na rośliny. Wyd. Politechniki Lubelskiej, Lublin: 1983.
- [83] ŚPIEWLA E, SKIERCZYŃSKA J. Elektryczny układ zastępczy węzłów roślin *Characeae*. *Folia Soc Sci Lubl* 1975; **17**: 147–155.
- [84] ŚPIEWLA E, TOKARSKA M. Oscillations of membrane potential during inhibition of cytoplasmic streaming in Characean internodes. *Physiol Plant* 1990; **80**: 191–195.
- [85] TOKARSKA M. Oscylacyjne zmiany wybranych właściwości komórek roślinnych. UMCS w Lublinie, rozpr. doktorska: 1993.
- [86] TOKARSKA M. Oscylacyjne zmiany parametrów elektrycznych u roślin na przykładzie komórek *Characeae*. *Prace Nauk PL 200 Fizyka* 1990; **7**: 89–112.
- [87] TOKARSKA M, JAŚKOWSKA A., ŚPIEWLA E. Chemically induced changes in the oscillatory behaviour of electric parameters in Characean cells. [w] Tenth International School on Biophysics of Membrane Transport. Kuczera J, Przestalski S. [red] School Proceedings. Tom II; 1990: 303.
- [88] TOKARSKA M, GREPPIN H. Fluctuation périodique de l'activité peroxidasique chez *Pseudomonas fluorescens* Mig. *Saussurea* 1992; **23**: 83–87.
- [89] TOKARSKA M, GREPPIN H. *In vitro* slow fluctuations in peroxidase activity. [w] Ibid [87], 324.
- [90] TOKARSKA M, GREPPIN H, PENEL C, BONZON M. *In vitro* slow fluctuations in horseradish peroxidase activity. *Chronobiol Int* 1993; **4**: 238–243.
- [91] TOKARSKA M, ŚPIEWLA E. Oscillation in the electrical resistance of the *Nitellopsis obtusa* nodes. *Physiol Plant* 1994; **90**: 98–104.
- [92] TOKO K, TSUKIJI M, IYAMA S, YAMAFUJI K. Self-sustained oscillations of electric potential in a model membrane. *Biophys Chem* 1986; **23**: 201–210.
- [93] TOKO K, OZAKI N, IYAMA S, YAMAFUJI K, MATSUI Y, SAITO M, KATO M. Electrical characteristics in an excitable element of lipid membrane. *Biophys Chem* 1991; **41**: 143–156.
- [94] TOKO K, HAYASHI K, YOSHIDA T, FUJIYOSHI T, YAMAFUJI K. Oscillation of electric spatial patterns emerging from the homogenous state in Characean cells. *Eur Biophys J* 1988; **16**: 11–21.
- [95] TSONG TY. Electrical modulation of membrane proteins: enforced conformational oscillations and biological energy and signal transductions. *Annu Rev Biophys Chem* 1990; **19**: 83–106.
- [96] VUČINIĆ Z, RADENOVIĆ C, DAMJANOVIĆ Z. Oscillation of the vacuolar potential in *Nitella*. *Physiol Plant* 1978; **44**: 181–186.
- [97] VULETIĆ M, RADENOVIĆ C, VUČINIĆ Z. The role of Calcium in the generation of membrane potential oscillations in *Nitella* cells. *Gen Physiol Biophys* 1987: 203–207.
- [98] WALKER NA, SMITH FA. Circulating electric currents between acid and alkaline zones associated with  $\text{HCO}_3^-$  assimilation in *Chara*. *J Exp Bot* 1977; **28**: 1190–1206.
- [99] WASTENEYS GO, WILLIAMSON RE. Microtubule organization differs between acid and alkaline bands in interpodal cells of *Chara* but bands can develop in the absence of microtubule. *Planta* 1992; **188**: 99–105.
- [100] YOSHIKAWA K, FUJIMOTO T, SHIMOOKA T, TERADA H, KUMAZAWA N, ISHII T. Electrical oscillation and fluctuation in phospholipid membranes. Phospholipid can form a channel without protein. *Biophys Chem* 1988; **29**: 293–299.

Otrzymano: 20.03.1994 r.

Przyjęto: 08.06.1994 r.

Adres autora: 20-636 Lublin, ul. Emancypantek 3/13



## TRANSPOZONY I ICH EWOLUCYJNE ZNACZENIE

### TRANSPOSONS AND THEIR EVOLUTIONAL FUNCTION

Elżbieta WIRTH-DZIĘCIOŁOWSKA

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW w Warszawie

*Streszczenie:* W przedstawionym artykule dokonano krótkiego przeglądu współczesnych poglądów na temat transpozonów – ruchomych elementów genetycznych. Poglądy te dotyczą pochodzenia, rodzajów transpozonów oraz możliwej roli w powstawaniu organizmów eukariotycznych. Przytoczono przykłady insercji transpozonów w sąsiedztwie genu i ich skutków w postaci mutacji, zmiany ekspresji czy zmiany specyfiki tkankowej genu. Opisane przykłady mogą stanowić jedną z możliwych dróg, którymi odbywa się ewolucja organizmów.

*Summary:* In this article some recent theories about transposons which are transposable genetic elements have been summarised. These theories concern the origin of transposons, their types and their possible role in evolution of eukaryotes. Some examples of insertion of transposable elements near the endogenous genes and their effects on mutation, on altering of gene expression (like Slp gen in mice) or on changing the tissue specific (like human genes for salivary amylase expression) which was previously for this gene presented. These last two cases can determined one of possible ways of molecular evolution of organisms.

Obecność ruchomych elementów genetycznych w genomie kukurydzy wykazała po raz pierwszy jeszcze w latach czterdziestych Barbara MacClintock, jednak nie wzbudziły one dużego zainteresowania, a przede wszystkim zrozumienia u jej współczesnych. W czasach gdy jeszcze nie była znana natura chemiczna materiału dziedzicznego, trudno było rozumieć rolę elementów genetycznych, które zmieniając swe położenie wpływałyby na zmianę zachowania się genu, jego ekspresję czy funkcję. Barbara MacClintock interpretowała ich ruchliwość jako manifestację programowych, genetycznych zmian w procesie rozwoju. Przez długie lata uważano, że jest to jedynie "dziwna" cecha kukurydzy. Dopiero w końcu lat siedemdziesiątych nastąpił wzrost zainteresowań ruchomymi elementami genetycznymi u innych organizmów

zarówno prokariotycznych [16, 19], jak również licznych eukariontów [4, 7, 34]. Badania te przyniosły nowe spojrzenie na rolę ruchomych elementów genetycznych u bakterii (kodowanie oporności na antybiotyki i wzrost przeżywalności komórek przenoszących je), jak i u organizmów wyższych (np. wytwarzanie oporności nowotworów na chemioterapię, powstawanie intronów i inne).

Wśród badaczy zajmujących się ruchomymi elementami DNA wystąpiły różnice poglądów wyjaśniających pochodzenie transpozonów. Jedni uważali elementy te za integralną część genomu, inni zaś jak Doolittle i Sapienza [13] czy Orgel i Crick [31] sugerowali, że ruchome elementy DNA reprezentują "molekularne pasożyty" lub "samolubne DNA", które nie odgrywają żadnej istotnej roli w organizmie.

Hipoteza pasożytniczego DNA spotkała się z licznymi głosami krytyki, w których podkreślano, że nie wykryte jeszcze funkcje różnych transpozonów nie są dowodem całkowitego ich braku [5]. Podkreślano również, że występowanie i rozpowszechnienie transpozonów w populacji musi być związane z naturalną selekcją, która działa zarówno na poziomie organizmu gospodarza (komórki), jak i na poziomie molekularnym [23]. Ten drugi poziom selekcji realizowany jest przez zdolności transpozonów do samopowielania się i dotyczy głównie eukariontów. Selekcja na poziomie komórkowym odnosi się przede wszystkim do bakterii rozmnażających się drogą klonowania.

Tempo procesu ewolucji transpozonów prokariotycznych związane jest z ich przeżywalnością, która jest wypadkową zachodzących procesów samoreplikacji transpozonów oraz częstości przenoszenia ich przez plazmidy do nowych komórek gospodarza [11]. Jednak w naturalnych populacjach bakterii procesy te zachodzą raczej z niską częstością, stąd szansa ewoluowania transpozonów w kierunku pasożytów molekularnych jest raczej niewielka. Przeżywalność i ewolucja tych elementów genetycznych wynika raczej z korzyści, jakie z ich obecności odnoszą komórki gospodarza [2].

Rozpowszechnienie w populacji transpozonów eukariotycznych związane jest z cyklami łączenia się gamet w zygotę i procesami mejozy. Procesy te stwarzają szansę przenoszenia wewnątrzgenomowych zmian, jakie zachodzą w jednym osobniku, do osobników potomnych i tą drogą do populacji. W związku z płciowym rozmnażaniem gatunków eukariotycznych rozprzestrzenianie występujących w ich genomie transpozonów jest szybsze niż u prokariotów. Nawet przy braku pozytywnej selekcji na poziomie komórkowym elementy te mają dużo większe możliwości ewolucji w kierunku pasożytów genomu. Bezpośrednie dowody potwierdzające te rozumowanie uzyskano w trakcie prowadzenia badań nad elementem P występującym u *Drosophila melanogaster*. Element ten wywołuje objawy dysgenezy u posiadających je owadów. Dotyczy to przede wszystkim mieszańców powstałych z krzyżowania samców z elementem P z samicami z linii nie posiadających tego elementu i objawia się niedorozwojem osobniczym [26]. Badania przeżywalności naturalnych i doświadczalnych populacji owadów wykazały, że element ten był w stanie dokonać inwazji



gatunku w bardzo krótkim czasie. Według Kiyasu i Kidwell [28] oraz Good i wsp. [18] częstość genomów przenoszących elementy P może ulec podwojeniu z pokolenia na pokolenie. Z prac Houck i Kidwell (cyt. za [32]) wynika, że element ten może przenosić się nie tylko w trakcie cyklu reprodukcyjnego pionowo w populacji, ale także może rozprzestrzeniać się poziomo dzięki roztoczom pasożytniczym na owadach i przenoszącym element P w swym przewodzie pokarmowym.

Badania, dotyczące równowagi między namnażaniem się transpozonów a selektywną eliminacją powodowaną przez ich negatywne oddziaływanie, potwierdziły zgodność z modelem transpozonu jako pasożyta genomu [8, 9, 30]. Prace te prowadzone głównie na *Drosophila* potwierdziły również, że powielanie transpozycji jest dominującą siłą w ewolucji tej grupy zwierząt.

Oczywiście nie wszystkie transpozony tak dokładnie odpowiadają omawianemu modelowi pasożytniczego DNA. W wielu przypadkach szczególnie tych, w których nie ma pełnej losowości kojarzeń, selekcja transpozonów może odbywać się na obu poziomach (molekularnym i komórkowym).

Częstość, z jaką transpozony rozprowadzane są w populacji organizmów eukariotycznych, jest związana z frekwencją połączeń między gametami, które mają transpozon, a tymi, które są wolne od niego. Hickey [23] sugeruje, że transpozony mogły odegrać pewną rolę w rozwoju rozmnażania płciowego u prymitywnych eukariontów i że ewolucja płci odbywała się drogą selekcji na geny transpozonowe. Pośrednich dowodów popierających ten tok rozumowania dopatruje się w mechanizmie koniugacji zależnej od plazmidu F u *Escherichia coli*.

## TRANSPOZONY JAKO ELEMENT SSACZEGO GENOMU

Sekwencje kodujące różne białka organizmu stanowią 10–15% haploidalnego genomu ssaków zawierającego 3 miliardy par zasad. Pozostałą część genomu, szczególnie w części heterochromatynowej stanowią proste, powtarzalne tandemowo sekwencje. W części euchromatynowej będącej siedliskiem genów znajdują się również repetytywne sekwencje, które w większości wchodzi w skład intronów. Istniejące korelacje między częstością występowania intronów i transpozonów mogłyby świadczyć o ewolucyjnym związku między nimi. Pewne spekulacje na temat intronów sugerują, że były one obecne już w genomie praeukariontów [12] i odegrały istotną rolę w ewolucji genów strukturalnych [17]. Alternatywną sugestią wysuwaną przez Cavalier-Smith [5, 6] i Hickey [20, 21, 22] jest traktowanie intronów jako wstawek do istniejących już genów podczas trwania ewolucji. Konsekwencją tego rozumowania jest hipoteza, że introny są pozostałością ewolucyjną pewnych typów transpozonów.

Istnieje szereg prób klasyfikacji współczesnych transpozonów. W jednej z nich przedstawionej przez Finnegana [14] zostały wyróżnione dwie grupy transpozonów

w zależności od mechanizmu ich transpozycji. Elementy ruchome zaliczane do klasy I korzystają z własnej odwrotnej transkryptazy przy przenoszeniu się z jednego miejsca w DNA na inne. Nie jest to jednorodna grupa pod względem budowy. Część z zaliczanych tu transpozonów, np.  *copia-like* u *Drosophila melanogaster*, Ty u drożdży, IAP oraz VL30 u gryzoni, THE u człowieka, BS1 u kukurydzy, przypominają swą budową retrowirusy. Posiadają bowiem długie sekwencje zasad powtarzających się terminalnie (LTR), długie, otwarte ramki odczytu i korzystają z pośrednictwa RNA w swym cyklu życiowym.

Inne elementy ruchome klasy I mają całkowicie odmienną budowę. Nie występują u nich długie, terminalne powtórzenia sekwencji zasad, mają natomiast w końcu 3' sekwencje bogate w adeninę. Mają zwykle dwie otwarte ramki odczytu, z których jedna koduje informację o odwrotnej transkryptazie. Budowa taka cechuje elementy: L1 ssaków, I, G, T u *Drosophila melanogaster*, Cin4 u kukurydzy i sekwencje wstawione wewnątrz genu 28SrRNA u jedwabnika morwowego czy muszki owocowej.

Drugą klasę ruchomych elementów stanowią transpozony, które oflankowane są przez krótkie, powtarzalne sekwencje o przeciwstawnej orientacji. Dokładny mechanizm transpozycji nie jest całkowicie poznany, chociaż wiadomo, że transpozaza może brać udział przy przenoszeniu ich z jednego miejsca w DNA na inne. Pod jej wpływem mogą ulec przełamaniu końce elementu ruchomego oraz sekwencje docelowe w miejscu, do którego ma nastąpić transpozycja. Przenoszony element może być wycinany i integrowany w całości w miejscu docelowym jak w przypadku transpozonu Ac/Ds u kukurydzy. Częściej jednak transpozycja elementów należących do klasy II odbywa się przez nacinanie tylko jednej z nici DNA w miejscu docelowym oraz przy końcu transpozonu, następnie łączenie obu końców przy udziale nukleaz i polimerazy DNA, pod wpływem której następuje replikacja elementu ruchomego i duplikacja sekwencji docelowych.

Innymi kryteriami przy klasyfikacji transpozonów kierowali się Wichman i wsp. [35]. Autorzy ci uwzględniając różną długość i częstość występowania transpozonów, podzielili je na trzy klasy, między którymi granice nie są ściśle określone.

Pierwszą grupę SINE (*short interspersed element*) stanowią krótkie elementy rozproszone w genomie i określane mianem retropozonów. Druga grupa to LINE (*long interspersed element*), długie, powtarzalne elementy rozproszone w genomie określane jako retrotranspozony. Ostatnią grupą są elementy podobne do retrowirusów (RLE – *retrovirus like element*) zaliczane również do retrotranspozonów.

Najwięcej elementów powtarzalnych, spotykanych głównie w genomach ssaków, a czasem także innych kręgowców, należy do grupy pierwszej. Są one długości 75–500 par zasad i występują w dziesiątkach, a nawet tysiącach kopii ( $10^4$ – $10^6$ ). Poszczególne gatunki organizmów mogą mieć w swym genomie kilka rodzin SINE, z których najlepiej poznany jest Alu występujący u człowieka. Element ten może stanowić 5% genomu człowieka [27]. Pochodzenie jego wiązane jest z cząsteczką



7sRNA. Inne rodziny retropozonów pochodzą od różnych, małych RNA jądrowych, takich jak np. tRNA. Rodziny SINE złożone są zatem z powtórzeń pierwotnych struktur RNA, które pod wpływem odwrotnej transkryptazy tworzą nowe klasy krótkich elementów nie podlegających translacji, o różnym pochodzeniu, ale o podobnej strukturze drugorzędowej, zmienności i sposobie regulacji. Elementy SINE zachowują się raczej pasywnie, a w ich aktywowaniu bierze udział polimeraza III, która wykorzystuje sekwencje starterowe położone wewnątrz genomu. SINE często integrują się w miejscach bogatych w adeninę (nie koniecznie o specyficznych sekwencjach), które wykorzystywane są jako startery przez odwrotną transkryptazę. Istnieją sugestie, że retropozony mogły rozwijać się wielokrotnie w trakcie ewolucji ssaków. Wskazują na to zbieżności w zmianach zachodzących w rodzinie Alu z okresami radiacji ssaków, naczelnych i małp człekokształtnych.

Drugą klasą elementów powtarzających się we wszystkich genomach ssaczych, a także wśród innych eukariontów są retrotranspozony. U ssaków występują w ilości  $10^3$ – $10^5$  kopii, co np. u myszy stanowi 10% DNA. Należy tu rodzina L1, która jak inne LINE charakteryzuje się długością większą niż 5 kb (L1Md u gryzoni – 7 kb, L1Hs u naczelnych – 6,5 kb). W obrębie rodziny L1 istnieje bardzo duża homologia, tym większa, im większe jest pokrewieństwo ewolucyjne między grupami systematycznymi, w których ta klasa transpozonów występuje. LINE zawierają geny kodujące własną odwrotną transkryptazę, charakteryzuje je także brak długich terminalnie powtarzających się sekwencji DNA (LTRs). Filogenetycznie są bliższe ruchomym elementom występującym u *Drosophila* niż retrowirusom.

Trzecią klasą ruchomego DNA u ssaków są elementy podobne do retrowirusów. Elementy te można uszeregować uwzględniając częstość ich powtórzeń w genomie, a także stopień pokrewieństwa ze znanymi retrowirusami. Te z nich, które nie mają sekwencji podobnych do znanych retrowirusów, muszą wykazywać pewne ich cechy, takie jak: obecność długich, terminalnych powtórzeń (LTR), wykorzystywanie przy replikacji DNA starterowego tRNA oraz syntetyzowanie przy pomocy odwrotnej transkryptazy komplementarnego do RNA łańcucha DNA. Liczne rodziny retrowirusów zostały scharakteryzowane u naczelnych i gryzoni, lecz nie ma pewności, czy są równie powszechne w genomach innych ssaków [35].

Jak wynika z badań dotyczących występowania transpozonów, rozmieszczenie ich w genomie ssaków nie jest losowe. Wykazano, że w genomie myszy długie sekwencje powtarzalne są zlokalizowane głównie w odcinkach DNA bogatych w pary AT, podczas gdy retropozony (B1 u myszy i Alu u człowieka) występują przede wszystkim w miejscach bogatych w pary GC. Wyniki takie otrzymano zarówno przy zastosowaniu techniki wirowania fragmentów DNA w gradiencie gęstości, jak i przy zastosowaniu wibracyjnego pola elektroforetycznego (*pulse field electrophoresis*) i analizy *blottingu Southerna* [10].

Rozkład transpozonów przebadano także metodą hybrydyzacji *in situ* na chromosomach metafazowych. Uzyskane wyniki z badań chromosomów człowieka [4] i

myszy [1] pozwalają wnioskować, że długie elementy ruchome DNA (LINE) i elementy podobne do retrowirusów (RLE) były głównie zlokalizowane w regionach prążków G, co odpowiada odcinkom DNA bogatym w pary AT. Krótkie elementy ruchome genomu (SINE) w podanych przykładach występowały w przeważającej ilości w obrębie prążków R, które odpowiadają regionom bogatym w pary GC. Stwierdzono ponadto dużą akumulację tych elementów w obrębie chromosomów X i Y [1, 4].

Przy zastosowaniu techniki hybrydyzacji *in situ*, sondą oznaczoną trytem, badano rozkład wzdłuż chromosomów sekwencji endogennych elementów wirusopodobnych u myszy – IAP (*intracisternal A particle*) oraz innych RLE. Wykazano, że większość tych sekwencji występowała w heterochromatynie, z wyraźną przewagą w długim ramieniu chromosomu X i w całym chromosomie Y. Wyniki te sugerują, że istnieje preferencja pewnych sekwencji w genomie do przyjmowania specyficznych insercji DNA. Korelacje, jakie istnieją między układem prążków chromosomów a typem insercji, mogą mieć podłoże funkcjonalne lub strukturalne. Regiony chromosomu bogate w pary GC są miejscami skupień genów transkrybowanych we wszystkich typach komórek i replikujących we wczesnej fazie S (prążki R). Później replikującymi są regiony bogate w pary AT (prążki G), w których z pewną preferencją występują geny tkankowo specyficzne [29]. W tych też regionach stwierdzono wyższy stopień transpozycji długich elementów ruchomych DNA.

## ROLA TRANSPOZONÓW W EWOLUCJI

Wspomniany już wcześniej element P u *Drosophila* powoduje genetyczną niezgodność między dzikimi i laboratoryjnymi populacjami owadów. Niezgodność ta przyczynia się do braku potomstwa z krzyżówek między tymi grupami owadów lub powoduje nienormalności u osobników mieszańcowego pokolenia. King [27] sugeruje, że dysgeneza osobników F1 może wynikać ze wzrostu częstości transpozycji związanej np. z mejozą, co w ostateczności prowadzioby do istotnych zmian w organizacji genomu. Zatem elementowi P można przypisać rolę w tworzeniu izolacji reprodukcyjnej [3]. Gardner i wsp. [15] wspominają o innej roli transpozonów. Autorzy ci sugerują, że obecność pewnego prowirusa produkującego białko osłonowe w dzikich populacjach myszy ochrania swego gospodarza przed infekcją mysią leukemią (MuLV).

Obecnie u ssaków znanych jest wiele ruchomych, wirusopodobnych elementów, które zostały pogrupowane w odrębne rodziny różniące się między sobą długością sekwencji LTR i wykorzystywanymi starterami tRNA (cechy klasyfikacyjne). Mysie IAP (*intracisternal A particles*) są aktywnie transkrybowane i charakteryzują się w większości brakiem sekwencji odpowiadających genom *env* u wirusów. Brak sekwencji genu *env* stwierdzono także u retrowirusopodobnego elementu *copia* u *Drosophila*



oraz w elemencie *Ty* u drożdży. Takie duże podobieństwo między tymi elementami u ewolucyjnie obcych gatunków może świadczyć o tym, że elementy te są ewolucyjnie bardzo stare lub mają zdolność przechodzenia między gatunkami. W licznych badaniach znaleziono przykłady potwierdzające obie alternatywy [32, 35].

Powszechne występowanie elementów wirusopodobnych w genomach różnych organizmów może przyczyniać się do mutacji genów gospodarza. Takim przykładem organizmu, u którego pewne spontaniczne mutacje wywoływane są przez insercje wewnątrz lub blisko genu, jest *Drosophila melanogaster*. Także u myszy mutację *d* – rozjaśnienie barwy futra [24] czy *h* – bezwłosność tłumaczy się tym samym mechanizmem [Stoye i in. 1988 cyt. za [33]]. Interesujący jest fakt, że ostateczny efekt fenotypowy takich insercji zależy nie tylko od miejsca występowania, ale i od specyficznych sekwencji transpozonów. Bowiem różne elementy wstawione w tym samym miejscu mogą dawać różne efekty fenotypowe [25]. Przykładem może być zmiana w ekspresji genu *yellow* u *Drosophila* pod wpływem insercji transpozonu podobnego do *copia* powyżej promotora tego genu powodująca tylko w części tkanek owada właściwą ekspresję koloru żółtego (Corses i Geyer 1991 cyt. za [33]).

Istnieje wiele przykładów wskazujących, że insercja transpozonu w genom gospodarza może wpływać na ekspresję genu przez:

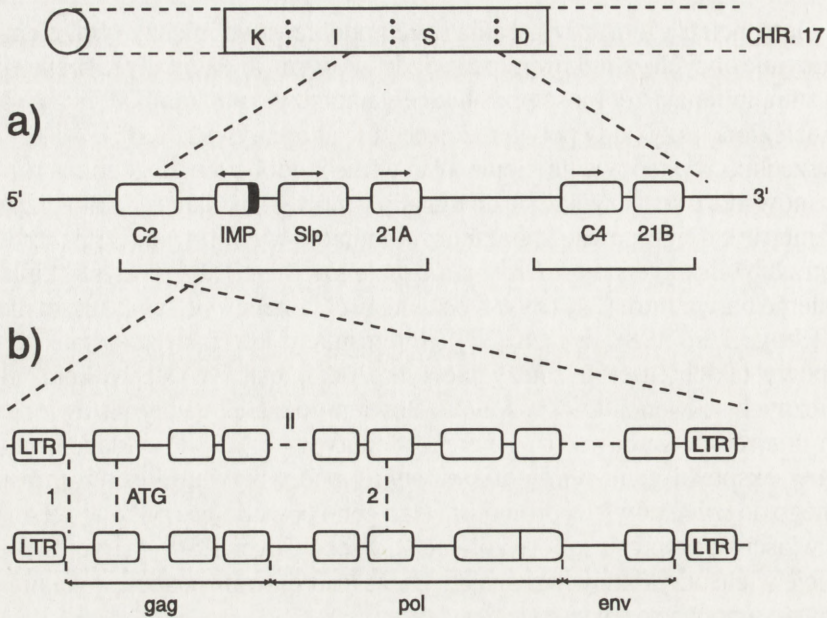
- zmianę w transkrypcji miejsc startowych,
- ingerencję w proces obróbki RNA (*splicing*, poliadenilację),
- dostarczenie nowych sygnałów regulatorowych [33].

Większość tych sytuacji ma miejsce w komórce w trakcie zmian nowotworowych, chociaż znaleziono przykłady, w których włączenie elementu transpozonowego w obręb regulatora genu w jednym przypadku wpłynęło na ekspresję hormonu sterydowego, w innym wywołało zmianę specyficzności tkankowej [33].

## WPŁYW TRANSPOZONU NA EKSPRESJĘ HORMONU STERYDOWEGO

W głównym kompleksie zgodności tkankowej (MHC) u myszy w lokus S sąsiadują ze sobą dwa geny: *C4* i *Slp*, które kodują białka o podobnej budowie, lecz odmiennej funkcji i regulacji. Produkt genu *C4* jest ważnym składnikiem komplementu biorącego udział w humoralno-immunologicznej odpowiedzi komórki. Gen *Slp* nie współdziała w komplemencie, ale uaktywnia swą działalność jedynie u dojrzałych płciowo samców. Jest zatem genem, którego działanie ograniczone jest do konkretnej płci.

Analiza fragmentów DNA zawierających oba geny wykazała, że gen *Slp* jest wynikiem duplikacji genu *C4*. Duplikacja długości 55 kb obejmuje również sąsiedni gen 21-hydroksylazy (rys. 1a). Podobieństwo genów *C4* i *Slp* wynika z większej niż w 95% identyczności sekwencji w regionach zarówno kodujących, jak i flankujących.



Rys. 1. Uproszczony schemat regulacji genu *Slp* u myszy na podstawie [33]: a – schemat rozmieszczenia kompleksu H-2 (MHC) u myszy na chromosomie 17; poniżej rozpisano locus S z uwzględnieniem genów komplementu C2 i C4 oraz genów 21-hydroksylazy A i B (wg Jackson Laboratory 1986); kłami oznaczono region genu *C4*, który uległ duplikacji; IMP – to przeciwnie zorientowany insert prowirusa w odległości 2 kb od genu *Slp*; zaciemniony obszar w prowirusie związany z odpowiedzią hormonalną obejmuje region promotora i miejsca wiązania specyficznej dla samców DNAzy I oraz 5' LTR; strzałki oznaczają orientację od 5' do 3'; b – porównanie budowy wirusopodobnego elementu IMP z wirusem Maloneya mysiej leukemii z zaznaczeniem funkcjonalnych regionów (1 – miejsca primerowe, ATG – miejsca rozpoczęcia translacji, 2 – RNAza H); regiony wydzielone na obu schematach wykazują homologię większą niż 50%; linie przerywane oznaczają delecje I – genu *env*, II – genu *pol*

Przy tak dużej homologii w budowie obu genów różnice istniejące w ich działaniu zostały wywołane insercją wirusopodobnego elementu w sąsiedztwie genu *Slp*. Insercja ta długości 2 kb ma miejsce w obrębie wzmacniacza (*enhancer*) genu *Slp* i jest przeciwnie zorientowana względem sąsiednich genów (rys. 1a). Elementem warunkującym odpowiedź androgenową są prowirusowe sekwencje LTR wzmacniacza. Ta cecha transpozonów, a w szczególności retrovirusów nie jest cechą niezwykłą. Stwierdzono bowiem, że sekwencje LTR wirusa raka piersi mogą także odpowiadać na hormony sterydowe, takie jak: glukokortykoidy, progesteron i androgeny [37].

Sekwencję wirusopodobnego elementu genu *Slp* oznaczoną skrótem IMP porównano z wirusem Maloneya mysiej białaczki (MuLV) i wykazano między nimi ogromne podobieństwo (rys. 1b). Jediną różnicą między IMP i MuLV była delecja części genu *pol* oraz genu *env* w elemencie wirusopodobnym. Porównanie to dostarczyło



również informacji o wysokim stopniu homologii między LTR obu elementów. Typ delekcji dotyczący genów *pol* i *env* jest bardzo podobny do delekcji spotykanych w rodzinie MuRRS (*murine retroviral-related sequences*). Porównania tego typu mogą być pomocne przy ustalaniu filogenezy tych elementów, szczególnie przy uwzględnieniu dzikich populacji myszy.

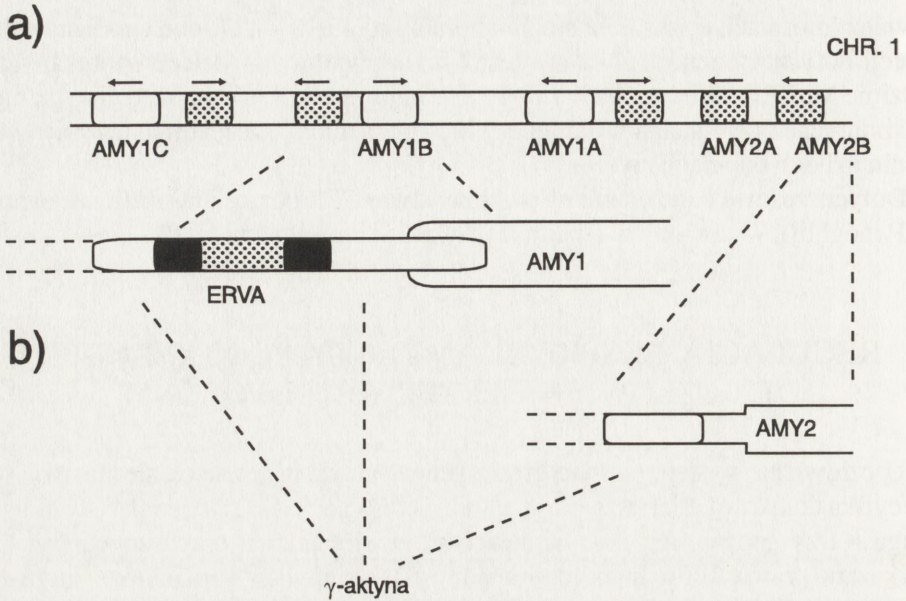
Dotychczasowe dane oparte na podobieństwie LTR pozwalają sądzić, że element IMP mógł być wstawiony w genom myszy przed 5 milionami lat [36].

## REGULACJA EKSPRESJI AMYLAZY ŚLINIANKOWEJ U CZŁOWIEKA PRZEZ RETROPOZONY

U człowieka występują dwie grupy genów amylazy różniące się między sobą specyfiką tkankową. Pierwszą grupę stanowią dwa geny *AMY2* działające w trzustce, drugą – trzy geny *AMY1* uaktywniające się w śliniankach przyusznych (rys. 2a). Wykazano prawie 100% homologii między cDNA amylazy śliniankowej i trzustkowej, a także 92% podobieństwa na obszarze 750 par zasad otaczających promotory obu typów genów, co może świadczyć o ich ewolucyjnie bliskim pokrewieństwie. Zasadnicza różnica, jaką stwierdzono między genami amylazy trzustki i ślinianek, dotyczy ich promotorów.

Analiza genów amylazy u człowieka wykazała, że w regionach promotora wszystkich genów znajduje się pseudogen  $\gamma$ -aktyny, który poprzedza o 200 par zasad pierwszy egzon kodujący białko. Pseudogen ten pozbawiony intronów i bogaty w adeninę w końcu 3' musiał powstać w drodze odwrotnej transkrypcji z mRNA. W przypadku genu *AMY2B* wykazuje on w prawie 90% identyczność z mRNA  $\gamma$ -aktyny, a w pozostałych genach występuje w wersjach skróconych. Śliniankowe geny *AMY1* różnią się od trzustkowych obecnością insercji (ERVA1) o długości ok. 8 kb w obrębie pseudogenu (rys. 2b). Insert ten będący w odwrotnej orientacji względem genu jest oddalony o 235 par zasad od miejsca rozpoczęcia transkrypcji *AMY1*. Ponieważ tylko w genach amylazy gruczołów śliniankowych działają inserty ERVA1, można przypuszczać, że to one pełnią funkcję w określaniu aktywności tkankowej genu. Sugestię tę potwierdzono u myszy transgenicznych, którym przeniesiono gen *AMY1* człowieka wraz z transpozonom. Okazało się, że nie tylko cały transpozon, ale nawet jego fragment wystarczał do kierowania ekspresją genu w śliniance przyusznej myszy [33]. Warto tu może nadmienić, że w genach amylazy śliniankowej u myszy nie stwierdzono żadnych insercji transpozonów czy  $\gamma$ -aktyny. Także nie poznano jeszcze sekwencji niezbędnych dla ekspresji tego genu u myszy (Jones i in. 1989 cyt. za [33]).

Obecność amylazy w śliniankach stwierdzono tylko u przedstawicieli nielicznych rzędów ssaków, podczas gdy wydzielanie jej w trzustce okazało się cechą wszystkich kręgowców. Amylazę śliniankową wytwarzają naczelne, gryzonie i króliki, chociaż



Rys. 2. Uproszczony schemat regulacji genów amylazy śliniankowej u człowieka na podstawie [33]: a – diagram obrazujący rozmieszczenie kompleksu genów amylazy na chromosomie 1p21 obejmujący geny amylazy śliniankowej *AMY1A*, *AMY1B*, *AMY1C* oraz amylazy trzustkowej *AMY2A* i *AMY2B*; zakratkowane obszary oznaczają wirusopodobny element ERVA1A, ERVA1B, ERVA1C występujący przed odpowiednimi genami; strzałki określają orientację genów od 5' do 3'; b – w regionie promotorów genów amylazy zarówno trzustkowej, jak i śliniankowej wstawiony jest pseudogen  $\gamma$ -aktyny (oznaczony białym polem) o tej samej orientacji co geny; geny amylazy śliniankowej różnią się od genów amylazy trzustkowej insertem pseudowirusa ERVA (zakratkowany prostokąt) o orientacji przeciwnej niż pseudogen  $\gamma$ -aktyny; czarne obszary oznaczają regiony LTR prowirusa

brak jej u seimiri – małej małpki z Nowego Świata oraz u chomika chińskiego. Powyższe dane dotyczące braku insercji w genach amylazy u myszy i niewystępowania amylazy śliniankowej np. u chomika chińskiego może świadczyć o nabywaniu specyficzności tkankowej w wydzielaniu amylazy przez ślinianki niezależnie w różnych grupach ssaków i możliwie różnymi sposobami.

Opisane za Robins i Samuelson [33] przypadki regulacji genów *Slp* u myszy i amylazy śliniankowej u człowieka są ciekawymi przykładami wyjaśniającymi mutacyjną rolę transpozonów i potwierdzającymi ewolucję na poziomie molekularnym. Interesujące jest występowanie w obu opisanych przypadkach duplikacji genu, która historycznie zapewne poprzedza insercję elementów ruchomych. Powyższe przykłady funkcyjnej łączności transpozonów z genami gospodarza należą narazie do nielicznych. Jest to raczej zadziwiające, gdy uwzględnimy fakt dużej akumulacji transpozonów w genomach ssaków.



## LITERATURA

- [1] BAKER RJ, WICHMAN HA. Retrotransposon mys is concentrated on the sex chromosomes: implications for copy number containment. *Evolution* 1990; **44**: 2083–2088.
- [2] BIEL SW, HARTL DL. Evolution of transposons: natural selection for Tn5 in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 1983; **103**: 581–592.
- [3] BINGHAM PM, KIDWELL MG, RUBIN GM. The molecular basis of P-M hybrid disgenesis; the role of the P element, a P strain specific transposon family. *Cell* 1982; **29**: 995–1004.
- [4] BOYLE AL, BALLARD SG, WARD DC. Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome. Chromosome karyotyping by fluorescence *in situ* hybridization. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; **87**: 7757–7761.
- [5] CAVALIER-SMITH T. How selfish is DNA? *Nature* 1980; **285**: 617–618.
- [6] CAVALIER-SMITH T. Intron phylogeny, a new hypothesis. *Trends Genet* 1991; **7**: 145–148.
- [7] CHAO L, VARGAS C, SPEAR BB, COX EC. Transposable elements as mutator genes in evolution. *Nature* 1983; **303**: 633–635.
- [8] CHARLESWORTH B, CHARLESWORTH D. The population dynamics of transposable elements. *Genet Res* 1983; **42**: 1–27.
- [9] CHARLESWORTH B, LANGLEY H. The evolution of self-regulated transposition of transposable elements. *Genetics* 1986; **112**: 381–383.
- [10] CHEN TL, MANUELIDIS L. SINEs and LINEs cluster in distinct DNA fragments of Giemsa band size. *Chromosoma* 1989; **98**: 309–316.
- [11] CONDIT R, STEVART FM, LEVIN BR. The population biology of bacterial transposons; a priori conditions for maintenance as parasitic DNA. *Amer Nat* 1988; **132**: 129–147.
- [12] DOOLITTLE WF. Genes in pieces; were they ever together? *Nature* 1978; **272**: 581–582.
- [13] DOOLITTLE WF, SAPIENZA C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 1980; **248**: 601–603.
- [14] FINNEGAN DJ. Eukariotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics* 1989; **5**: 103–107.
- [15] GARDNER M, DANDEKAR S, CARDIFF R. Molecular mechanism of an ecotropic MuLV restriction gene Akvr-1/FV-4 in California wild mice. *Current Topics in Micro and Immunol* 1986; **127**: 338–345.
- [16] GAWRON-BURKE C, CLEWELL DB. A transposon in *Streptomyces faecalis* with fertility properties. *Nature* 1982; **300**: 1–3.
- [17] GILBERT W. Introns and exons; playgrounds of evolution. *Symp Mol Cell Biol* 1979; **14**: 1–12.
- [18] GOOD AG, MEINSTER G, BROCK H, GRIGLIATTI A, HICKEY D. Rapid spread of transposable P elements in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1989; **122**: 387–396.
- [19] HARTL DL, DUKHUIZEN DE, MILLER RD, GREEN L, de FRAMOND J. Transposable element IS50 improves growth rate of *E. coli* cells without transposition. *Cell* 1983; **35**: 503–510.
- [20] HICKEY DA. Selfish DNA, a sexually-transmitted nuclear parasite. *Genetics* 1982; **101**: 519–531.
- [21] HICKEY DA, BENKEL BF. Splicing and the evolution of introns. *Nature* 1985; **316**: 582.
- [22] HICKEY DA, BENKEL BF, ABUKASHAWA SM. A general model for the evolution of nuclear pre-mRNA introns. *J Theoret Biol* 1989; **137**: 41–53.
- [23] HICKEY DA. Evolutionary dynamics of transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. *Genetica* 1992; **86**: 269–274.

- [24] JENKINS NA, COPELAND NG, TAYLOR BA, LEE BK. Dilute (d) coat colour mutation of DBA//2J mice is associated with the site of integration of an ectropic MuLV genome. *Nature* 1981; **293**: 370–374.
- [25] KIDD S, YOUNG MW. Transposon dependent mutant phenotypes at the Notch locus of *Drosophila*. *Nature* 1986; **323**: 89–91.
- [26] KIDWELL MG. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 1655–1659.
- [27] KING CC. Modular transposition and the dynamic structure of eukariote regulatory evolution. *Genetica* 1992; **86**: 127–142.
- [28] KIYASU PK, KIDWELL MG. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*; the evolution of mixed P and M populations maintained at high temperature. *Genet Res* 1984; **44**: 251–259.
- [29] MANUELIDIS L, CHEN TL. A unified model of eucaryotic chromosomes. *Cytometry* 1990; **11**: 8–25.
- [30] MONTGOMERY EA, LANGLEY CH. Transposable elements in Mendelian populations. II. Distribution of three copia-like elements in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 1983; **104**: 473–483.
- [31] ORGEL LE, CRICK FH. Selfish DNA; the ultimate parasite. *Nature* 1980; **284**: 604–607.
- [32] RENNIE J. Nowe sztuczki DNA. *Świat Nauki* 1993; (V): 72–81.
- [33] ROBINS DM, SAMUELSON LC. Retrotransposons and the evolution of mammalian gene expression. *Genetica* 1992; **86**: 191–201.
- [34] SORIANO P, MEUNIER-ROTIVAL M, BERNARDI G. Distribution of interspersed repeats is nonuniform and conserved in the mouse and human genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 1816–1820.
- [35] WICHMAN A, van den BUSSCHERA, HAMILTON MJ, BAKER RJ. Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals. *Genetica* 1992; **86**: 287–293.
- [36] WU CI, LI WH. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 1741–1745.
- [37] YAMAMOTO KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann Rev Genet* 1985; **19**: 209–252.

Otrzymano: 27.09.1993 r.

Przyjęto: 20.07.1994 r.

Adres autora: 05-840 Brwinów, ul. Przejazd 4



# CYTOPROTEKCYJNE DZIAŁANIE PROSTAGLANDYN (NA POZIOMIE NARZĄDU, KOMÓRKI ORAZ W UKŁADACH *IN VITRO*)

## CYTOPROTECTION BY PROSTAGLANDINS (ON THE ORGAN, CELL AND *IN VITRO* SYSTEMS)

ANNA, MARIA KORDOWIAK, ROBERT TRZOS

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

*Streszczenie:* W artykule prócz danych historycznych, dotyczących ochronnego działania wybranych prostaglandyn, zebrano wyniki doświadczeń wykonywanych na poziomie organu oraz komórek, a nawet organeli komórkowych w układzie *in vitro*. Przedstawiono różne postulowane mechanizmy oddziaływania tych związków, jak również możliwość zastosowania ich w farmakologii i w medycynie. Szczególną uwagę zwrócono na oddziaływania prostaglandyn w cukrzycy.

*Słowa kluczowe:* Prostaglandyny, cytoprotekcja, oddziaływania na poziomie organu, komórki, *in vitro*.

*Summary:* In this paper, historical aspects concerning protection by some prostaglandins and results of experiments carried on the organ, cell, and cells organelle *in vitro* were presented. Different suggestions on the mechanisms of these compounds action, as well as they application in pharmacology and medicine were presented. Special attention was put on the effect of response to prostaglandins in diabetes.

*Key words:* Prostaglandins, cytoprotection, influence on the organ, cell and *in vitro*.

## 1. WPROWADZENIE

Pośród eikozanoidów, pochodnych kwasu arachidonowego (prócz tromboksanów i leukotrienów), szczególne miejsce zajmują prostaglandyny (PGs). Są one produktami działania cyklooksygenazy i wykazują bardzo różnorodne działanie biologiczne,

które oprócz rodzaju prostaglandyny zależy również od rodzaju tkanki, a nawet rodzaju komórek, na które ta pochodna działa. PGs przypisuje się ważną rolę w regulacji normalnego funkcjonowania organizmu, a także w warunkach patologicznych [50, 74]. Trudno jest obecnie znaleźć jednostkę chorobową, w której pozytywnie lub negatywnie nie brałyby udziału eikozanoidy [15, 22–24, 31, 44, 50, 56, 71, 79].

Jedną z bardzo ciekawych i ważnych własności biologicznych PGs są tzw. zdolności cytoprotekcyjne wykazywane szczególnie przez PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, jej dimetylową pochodną, tj. 16,16'-dimetyloprostaglandynę E<sub>2</sub> (16,16' dmPGE<sub>2</sub>) oraz PGF<sub>2</sub>alfa, PGA<sub>1</sub> i PGI<sub>2</sub>. Termin "cytoprotekcja" zawdzięczamy gastroenterologom, którzy pierwsi stwierdzili zdolność PGs do zapobiegania tworzeniu wrzodów i uszkodzeń błony śluzowej żołądka i jelit. Stopniowo pojęcie to uległo rozszerzeniu na zjawiska związane z mobilizacją mechanizmów obronnych różnych tkanek narażonych na rozmaite uszkodzenia, w celu zapewnienia im prawidłowego funkcjonowania. Co więcej, analogiczne własności przejawiają PGs wobec komórek w hodowlach, a nawet organeli komórkowych o względnej autonomii. Oddziaływanie tego typu jest możliwe w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* [40].

### 1.1. MECHANIZMY CYTOPROTEKCJI

Mechanizmów cytoprotekcji nie można prosto zdefiniować. Proponowane są różne czynniki, których oddziaływanie przeważa w danej tkance lub komórce, na przykład:

1) zwiększenie przepływu krwi w uszkodzonym rejonie [53, 86] wraz ze zwiększoną podażą tlenu [35];

2) wzmożone wydzielanie śluzu i wydzieliny ochronnej, np. soku żołądkowego [8, 35, 53, 67];

3) wzmożone wydzielanie dwuwęglanów [52, 53];

4) stabilizacja błon komórkowych i wzrost odporności komórki [53, 68];

5) wpływ na krążenie jonów i ich stężenie w komórce [8, 15, 18, 35, 42, 46, 47, 53, 56, 78, 81, 86];

6) wpływ na procesy syntezy w komórce przez stymulację enzymów, np. cyklazy adenylowej [15, 22, 40] i poziomu cAMP w komórce [13, 34], czy fosfolipazy A<sub>2</sub> [15];

7) zmiany składu i proporcji fosfolipidów błon komórkowych [37, 38] lub płynów ustrojowych [11, 26];

8) zmiany aktywności enzymów uczestniczących w syntezie swoistych eikozanoidów [50];

9) wpływ na receptory PGs (zwane też czasem miejscami wiążącymi PGs) na powierzchni błony plazmatycznej komórki. Receptorom tym poświęca się ostatnio wiele uwagi [13, 44, 72, 82, 85].

Wydaje się, że wpływ PGs w danej tkance czy komórce docelowej zależy zarówno od rodzaju pochodnej PGs, jak od rodzaju tej tkanki czy komórki, a także jej stanu fizjologicznego. Należy podkreślić, że oddziaływania te nie są zwykle jednostronne,



lecz są wypadkową oddziaływań kilku pochodnych (np. PGs i leukotrienów czy tromboksanów), a efekt końcowy zależy od ustalenia się dynamicznej równowagi biologicznego oddziaływania (często przeciwstawnego) tych związków [15].

## 2. DZIAŁANIE CYTOPROTEKCYJNE NA POZIOMIE NARZĄDU

Przegląd klasycznych poglądów na temat mechanizmów cytoprotekcji PGs w żołądku i jelitach podsumowuje jeden z artykułów odkrywcy tego zjawiska Andre Roberta [53]. Praca ta sprzed blisko 10 lat podkreśla przede wszystkim farmakologiczno-patologiczny aspekt działania PGs, ale również zwraca uwagę na wpływ aktywności enzymów uczestniczących w biosyntezie i przemianach eikozanoidów. Autor jest w pełni świadomy, że jego podsumowanie jest niepełne, a dalsze badania pozwolą na lepsze zrozumienie odkrytego przezeń procesu biologicznego. W istocie pionierskie badania Roberta są kontynuowane nadal z powodzeniem. Stwierdzono, że 16,16'-dmPGE<sub>2</sub> stymuluje wydzielanie dwuwęglanów i chroni żołądek szczura przed nekrotycznymi zmianami powodowanymi przez absolutny etanol [19, 50]. W cytoprotekcyjnym działaniu PGs w żołądku przypisuje się ostatnio coraz większą rolę ich zdolności hamowania neutrofilii [77].

Georg i wsp. [17] odwołując się do badań Roberta dotyczących nagromadzenia się płynów w jelicie cienkim, które jest hamowane przez PGI<sub>2</sub> i PGD<sub>2</sub>, wskazuje, że wynika ono z oddziaływania PGD<sub>2</sub> na neurony sekretomotoryczne, natomiast PGE<sub>2</sub> stymuluje aktywność cyklazy adenylowej nabłonka. Sterowane przez neurony wydzielanie w jelicie grubym szczura jest hamowane przez PGD<sub>2</sub>, jak potwierdził Diener i wsp. [11]. Hamowanie wydzielania zachodzi przez oddziaływanie ze swoistymi receptorami w błonie plazmatycznej.

PGE<sub>2</sub> zmniejsza proces utraty komórek i poprawia proces kostnienia u samiec szczurów pozbawionych jajników. Może to mieć znaczenie w leczeniu osteoporozy u kobiet po menopauzie [29]. Ta sama prostaglandyna oraz 16,16'-PGE<sub>2</sub> mają własność hamowania wydzielania kwasu w żołądku [70]. Oddziałuje ona również ochronnie na śluzówkę żołądka nowo narodzonych szczurów przed działaniem kwasu i etanolu [68]. Pochodna ta działa również obniżająco na przyswajanie etanolu przez zwierzęta doświadczalne [55].

Prostaglandyny E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> i F<sub>2</sub>alfa obecne w mleku i osoczu ludzkim odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu układu żołądkowo-jelitowego u niemowląt [60]. Syntetyczna pochodna 15(R)-15-metyloprostaglandyna E<sub>2</sub> (tzw. arbaprostil) jest skutecznym czynnikiem przeciw owrzodzeniom [69]. W żołądku PGs działają zapobiegawczo przeciw owrzodzeniom indukowanym zarówno przez stress, jak i etanol [8] mimo różnic w mechanizmach powstawania tych uszkodzeń. Rąbek szczoteczkowy dwu-

nastnicy PGs (głównie PGE<sub>2</sub>) osłaniają przed szkodliwym wpływem zbyt wysokich stężeń kwasów żółciowych poprzez wzrost przepuszczalności protonów [86].

Lichtenberger i wsp. [37] już w 1983 r. postulowali, że wzrost stężenia 16,16'-dmPGE<sub>2</sub>, które osłania żołądek przed owrzodzeniami i krwawieniem u zwierząt doświadczalnych i ludzi, działa poprzez lokalny wzrost stężenia lipidów w błonie. Wpływa to na podniesienie hydrofobowości śluzówki i działa jako bariera ochronna.

16,16'-dmPGE<sub>2</sub> wywiera również działanie ochronne na wątrobę, co wykazały badania Stachury i wsp. [66] już w latach osiemdziesiątych. Pochodna ta chroniła przed uszkodzeniami wywołanymi galaktozaminą czy czterochlorkiem węgla. Ruwart i wsp. [58] wykazali, że pochodna ta działa hepatoprotekcyjnie przed tworzeniem kolagenu wywołanym u szczurów dietą wysokotłuszczową. Również badania własne wskazują na zdolność tego związku do zapobiegania drastycznym zmianom morfologii i funkcji biochemicznej wątroby szczurów poddanych działaniu streptozotocyny [31]. Podanie 16,16'-dmPGE<sub>2</sub> zapobiega również nekrozie w wątrobie, która zostaje indukowana przez dożylną iniekcję monoklonalnych przeciwciał. Podobne działanie wykazuje również podanie dożylnie dibutyrylo-cAMP [34]. Według sugestii autorów obydwie związki działają przez wzrost ilości komórkowego cAMP w wątrobie oraz stabilizację błony plazmatycznej. Inna pochodna PGE<sub>1</sub> chroni wątrobę przed miejscowymi niedokrwieniami i w tym procesie przypisuje się rolę makrofagom wątrobowym [9].

16,16'-dmPGE<sub>2</sub> (podobnie jak WR-2721) chroni myszki doświadczalne przed utratą uwłosienia wywołaną napromieniowaniem [16], jak również uszkodzeniami włosów, ułatwiając ponowne ich porostanie.

### 3. DZIAŁANIE CYTOPROTEKCYJNE NA POZIOMIE KOMÓRKI

#### 3.1. KOMÓRKI TKANKI PŁUCNEJ

Komórki tkanki płuc 15–20-tygodniowych płodów ludzkich wykazywały w hodowli ogromną reaktywność na PGE<sub>2</sub>. Działanie PGF<sub>2</sub> jest mniejsze [25]. Wyniki badań wskazują na kluczową rolę tych pochodnych w procesie samoróżnicowania się tych komórek w hodowli, gdyż zachodzi ono bez obecności surowicy czy dodatkowych hormonów lub czynników wzrostu. Komórki nabłonkowe tchawicy królika w kulturze są chronione przez PGE<sub>2</sub> przed uszkodzeniami spowodowanymi przez atmosferę zawierającą nadmiar tlenu lub ozon [10].

#### 3.2. KOMÓRKI ŻOŁĄDKA

PGE<sub>2</sub> chronią błony plazmatyczne komórek powierzchni żołądka przed działaniem soli żółciowych [20]. Jak stwierdzają Prelik i wsp. [48, 49] aktywność cyklooksygenazy jest czynnikiem ograniczającym wydzielanie PGE<sub>2</sub>, a nie uwalniania



TABELA 1. Cytoprotekcyjne działanie PGs na narządy

Rodzaj PG	Tkanka docelowa	Efekt biologiczny	Cytowane piśmiennictwo
16,16' dmPGE <sub>2</sub>	żołądek szczura	ochrona przed nekrozą wywołaną przez absolutny etanol hamowanie neutrofilii [70] obniżenie wydzielania kwasu osłona przed owrzodzeniami i krwawieniem przez lokalny wzrost stężenia fosfolipidów w błonie komórkowej; wzrost hydrofobowości śluzówki	[19,52,53,77] [37] [55,68]
Syntetyczna pochodna PGE <sub>2</sub> , tzw. Arbaprostil	u młodych osobników	obniżenie przyswajania etanolu osłona przed działaniem kwasu i etanolu lek przeciw owrzodzeniom indukowanym etanolem lub stresem	[8, 69]
PGE <sub>2</sub>	dwunastnica	osłona rąbka szczoteczkowego przed zbyt wysokim stężeniem kwasów żółciowych wzrost przepuszczalności protonów	[86]
PGI <sub>2</sub> PGD <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub>	jelito cienkie neurony sekretomotoryczne	hamowanie nagromadzania płynów wzrost aktywności cykazy adenylowej nabłonka	[11, 17]
16,16' dm PGE <sub>2</sub>	wątroba	ochrona przed działaniem galaktozoaminy i CCl <sub>4</sub> zapobieganie tworzeniu nadmiaru kolagenu w diecie wysokotłuszczowej normalizacja morfologii komórki wątrobowej i aktywności biochemicznej aparatu Golgiego zapobieganie nekrozie wątroby po podaniu monoklonalnych przeciwciał wzrost stężenia cAMP w komórce, stabilizacja błony plazmatycznej ochrona przed lokalnymi niedokrwieniami	[66] [58] [31] [34] [34] [9]
PGE <sub>1</sub>			
PGE <sub>2</sub>	układ kostny	poprawa procesu kostnienia u samiec po wycięciu jajników	[29]
PGE <sub>1</sub> PGE <sub>2</sub> PGF <sub>2</sub> alfa	obecne w mleku i osoczu	prawidłowe działanie układu żołądkowo-jelitowego u niemowląt	[60]
16,16' dm PGE <sub>2</sub>	uwłosienie	ochrona przed utratą oraz uszkodzeniami włosów, będącymi skutkiem napromieniowania	[16]

kwasu arachidonowego przez fosfolipazę A<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> działa supresyjnie na aktywność komórek mięśni gładkich żołądka [43]. Izolowane komórki żołądka szczura wykazują zmniejszone wydzielanie kwasu przy zastosowaniu diety mlecznej zawierającej znaczne ilości PGE<sub>2</sub>. Po zastosowaniu tej diety stwierdza się wzrost produkcji endogennej PGE<sub>2</sub> [12].

### 3.3. KOMÓRKI WĄTROBY I NEREK

Rouwart i wsp. [57] wykazali ochronne działanie  $\text{dmPGE}_2$  na hodowlę pierwotną hepatocytów poddaną działaniu  $\text{CCl}_4$ , wykazując, że działanie to nie wynika ze zwiększenia przepływu krwi, czego w hodowli po prostu brak. Dimer  $16,16'$ - $\text{dmPGB}_1$  jest związkiem chroniącym hepatocyty w hodowli przed działaniem KCN. Substancja ta nie oddziałuje na utratę ATP ani z puli mitochondrialnej, ani całej komórki [44], ochrania jednak przed zawijaniem i zaokrągleniem. Skouteris i Kaser [63] sugerują zdolność  $\text{PGE}_2$  i  $\text{PGF}_{2\alpha}$  do modulacji ekspresji genu *c-myc* w hodowli pierwotnej hepatocytów. W linii komórek nabłonkowych nerki psa  $\text{PGE}_1$  stymuluje wydzielanie chlorków [62].

### 3.4. KOMÓRKI ŚLEDZIONY, LIMFOCYTY, MAKROFAGI

Komórki śledziony (w 72 godzinie hodowli) w obecności interleukiny 2 (IL-2) oraz lipopolisacharydu (LPS) wykazują spadek aktywności cytotoksycznej, co wg autorów jest związane ze spadkiem produkcji endogennych  $\text{PGE}_2$  i interferonów alfa/beta [75]. Limfocyty śledziony ulegają immunomodyfikacji pod wpływem  $\text{PGE}_1$  [6]. Ludzkie makrofagi alveolarne (w hodowli 3–24 godz. z dwutlenkiem krzemu) wykazują wzrost uwalniania leukotrienów głównie  $\text{B}_4$  oraz  $\text{C}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ , natomiast spadek produkcji  $\text{PGE}_2$  i tromboksanu  $\text{D}_2$  [30].

Ludzkie makrofagi z płynu synowialnego z nerki w hodowli hamowane przez  $\text{PGE}_1$  i  $\text{PGE}_2$  przy syntezie witaminy  $\text{D}_3$  [21].

### 3.5. KOMÓRKI PODŻUCHWOWYCH GRUCZOŁÓW ŚLINOWYCH, KOMÓRKI NEURONALNE I KOMÓRKI MIĘŚNI GŁADKICH

W badaniach fragmentów podżuchwowych gruczołów ślinowych szczura wykazano, że etanol poniżej 1% nie oddziałuje na receptor  $\text{PGE}_2$ , natomiast wiązanie  $\text{PGE}_2$  wzrasta do 30 lub 50% przy stężeniach etanolu odpowiednio 2,5 i 5% [82]. Autorzy sugerują, że jest to mechanizm regulujący wzrost zdolności wiązania receptora  $\text{PGE}_2$  w odpowiedzi na duże stężenia etanolu, wywołujące zmniejszenie syntezy  $\text{PGE}_2$  w tkankach.

Pierwsze badania Stachury i Kałuży [65] nad tkanką nerwową embrionów kurzych są nadal kontynuowane [13]. Potwierdzają one poprzednie doniesienia dotyczące dawki  $\text{PGE}_2$  działającej cytoprotekcyjnie jako  $3 \times 10^{-5}$  do  $5 \times 10^{-5}$  M. Dymond i Kalmus [13] sugerują zmianę błony plazmatycznej przez jej stabilizację po związaniu prostaglandyny z jej receptorem. W nerwach sensorycznych ptaków  $\text{PGE}_2$  wzmacnia krążenie wapnia [42].

Proliferację komórek mięśni gładkich w hodowli, hamuje podawanie PGA i PGI. Proces ten zachodzi przez hamowanie cyklu komórkowego na granicy  $\text{G}_1/\text{S}$ , które-



TABELA 2. Wpływ PGs na komórki

Rodzaj PG	Komórka docelowa	Efekt biologiczny	Cytowane piśmiennictwo
PGE <sub>2</sub>	komórki tkanki płuc embrionów ludzkich	ogromna reaktywność związana z rolą PGE <sub>2</sub> w samoróżnicowaniu się; znacznie słabsze oddziaływanie PGF <sub>2</sub> alfa	[25]
PGE <sub>2</sub>	komórki nabłonkowe tchawicy królika	ochronne działanie przed wpływem atmosfery o nadmiernej zawartości tlenu lub ozonu	[10]
PGE <sub>2</sub>	komórki powierzchni żołądka	osłona przed działaniem soli żółciowych (podobnie jak na poziomie organu w dwunastnicy)	[20]
PGE <sub>2</sub>	komórki mięśni gładkich żołądka	działanie supresyjne, zmniejszenie wydzielania kwasu; aktywność cyklooksygenazy jest czynnikiem ograniczającym wydzielanie PGE <sub>2</sub>	[12,43,48,49]
dm PGE <sub>2</sub>	hodowla pierwotna hepatocytów	ochrona przed CCl <sub>4</sub>	[57]
16,16' dmPGB <sub>1</sub>	hodowla pierwotna hepatocytów	ochrona przed działaniem KCN	[46]
PGE <sub>2</sub> PGF <sub>2</sub> alfa	hodowla pierwotna hepatocytów	modulacja ekspresji genu c-myc	[63]
PGE <sub>1</sub>	linie komórek epitelialnych nerki	stymulacja wydzielania chlorków	[62]
PGE <sub>2</sub>	komórki śledziony	współdziałanie z IL-2 oraz LPS, obniżenie aktywności cytotoksycznej	[75]
PGE <sub>1</sub>	limfocyty śledziony	immunomodyfikacja	[6]
PGE <sub>1</sub>	ludzkie makrofagi alveolarne (3–24 godz.) hodowla z SiO <sub>2</sub>	wzrost uwalniania leukotrienów B <sub>4</sub> oraz w mniejszym stopniu C <sub>4</sub> ,D <sub>4</sub> i E <sub>4</sub> ; obniżenie produkcji PGE <sub>2</sub> i TBD <sub>2</sub>	[30]
PGE <sub>1</sub> PGE <sub>2</sub>	ludzkie makrofagi nerki	hamowanie komórek przy syntezie wit. D <sub>3</sub>	[21]
PGE <sub>2</sub>	komórki gruczołów podżuchwowych szczura	stęż. etanolu <1% bez oddziaływań na receptor PGE <sub>2</sub> ; stęż. etanolu 2,5% wzrost wiązania PGE <sub>2</sub> 30%; stęż. etanolu 5% wzrost wiązania PGE <sub>2</sub> 50%	[82]
PGE <sub>2</sub>	tkanka nerwowa embrionów kurzych	dawka cytoprotekcyjna 3x10 <sup>-5</sup> –5x10 <sup>-5</sup> M zmiana błony plazmatycznej, stabilizacja po związaniu PG z receptorem; wzrost krążenia wapnia	[13,42,65]
PGA PGI	komórki mięśni gładkich	hamowanie proliferacji poprzez oddziaływanie na cykl komórkowy w fazie G <sub>1</sub> / S	[59]
PGE <sub>2</sub>	komórki linii T	obniżenie produkcji TNF-alfa i limfotoksyny	[14]
PG serii E	komórki erytro-leukemii ludzkiej	mobilizacja wewnątrzkomórkowego Ca <sup>2+</sup> , współdziałanie z białkami G i receptorami	[47, 81]
PGE <sub>1</sub>	płytki krwi ludzkiej	wzrost oporności na deformację	[78]

mu nie towarzyszy redukcja ekspresji genu *c-myc*, w przeciwieństwie do innych komórek guzowych, którym podawano PGs [59].

### 3.6. KOMÓRKI LINII T, ERYTROLEUKEMII, PŁYTKI KRWI

W komórkach linii T PGE<sub>2</sub> hamuje produkcję limfotoksyny [14]. Wu i wsp. [81] proponują bardzo ciekawy mechanizm działania prostaglandyn serii E oparty na schemacie działania na wewnątrzkomórkową mobilizację wolnego wapnia i aktywację fosfolipazy D. Poddanie ludzkich komórek erytroleukemicznych wstępnemu działaniu toksyny błoniczej, która hamuje wzrost stężenia wapnia stymulowany przez PGE, wskazuje, że białka G uczestniczą w procesie sygnału przekazywanego przez receptor PGE. Perusquia i Kubli-Garfias [47] preferują drugi model spośród trzech dróg, którymi może zachodzić wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie, tj.:

- a) poprzez wzmożone przechodzenie przez zależne od napięcia kanały wapniowe,
- b) przez ich wpływ na kanały współpracujące z receptorami PGs,
- c) przez zwalnianie wewnątrzkomórkowego wapnia.

Sugerują oni ścisły związek pomiędzy receptorami PGs a kanałami wapniowymi. Dotyczy to głównie dwu pochodnych PGE<sub>2</sub> i PGF, które w przeciwieństwie do pochodnych progesteronu miałyby otwierać kanały wapniowe współdziałające z receptorami tych pochodnych.

Działanie cytoprotekcyjne PGE<sub>1</sub>, podobne do wpływu dibutyrylo cAMP jest widoczne na ludzkich płytkach krwi, poddanych deformacji w teście aspiracji mikropipetą. Płytki w obecności obu wymienionych związków wykazują większą oporność na deformację. Autorzy podkreślają również w tym przypadku związek z poziomem wapnia i jego wpływem na cytoskielet [78].

## 4. DZIAŁANIE CYTOPROTEKCYJNE NA POZIOMIE ORGANELI KOMÓRKOWYCH

Oprócz doświadczeń nad ochronnym działaniem PGs na tkanki, organy oraz komórki w hodowli coraz więcej danych wskazuje na ich oddziaływanie również na poziomie organeli wewnątrzkomórkowych [80]. W błonach płytek krwi [72] stwierdzono nowy receptor dla tromboksanu A<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>. Transport oraz aktywne miejsca wiążące zależą od płynności błony, a ta z kolei jest pod wpływem biologicznego działania PGs, głównie PGE<sub>1</sub> i PGF<sub>2α</sub> [41]. Nawet oczyszczone preparaty błon plazmatycznych komórek mięśniowych macicy wołowej wiążą PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> wykazując wysokie powinowactwo do tych pochodnych w przeciwieństwie do PGF<sub>2α</sub> oraz PGD<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> hamuje cyklazę adenylową, co wskazuje na fizjologiczne znaczenie cAMP we współdziałaniu z PGE<sub>2</sub> w komórkach miometrium [36].



TABELA 3. Wpływ PGs na organele komórkowe

PGs	Organela komórkowa	Efekt biologiczny	Pozycja piśmiennictwa
PGH <sub>2</sub>	błona płytek krwi	nowy receptor dla TBA <sub>2</sub> /PGH <sub>2</sub>	[72]
PGE <sub>1</sub> PGF <sub>2a</sub>	błona płytek krwi	oddziaływanie na transport oraz miejsca wiążące, uzależnienie od płynności błony	[41]
PGs	preparat błon plazmatycznych komórek mięśniowych macicy wołu	wysokie powinowactwo wiązania PGE <sub>1</sub> i PGE <sub>2</sub> niskie powinowactwo do PGF <sub>2a</sub> i PGD <sub>2</sub> ; PGE <sub>2</sub> obniża aktywność cykazy adenylowej	[36]
PGE <sub>1</sub>	błona plazmatyczna hepatocytów ludzkich, szczurzych i świnińskich	oddziaływanie z receptorem LDL sugerujące obniżenie poziomu lipidów przez PGE <sub>1</sub> .	[76]
PGE <sub>2</sub>	błona izolowanych komórek żołądka	ochrona przed działaniem soli żółciowych	[20]
PGE <sub>1</sub> PGF <sub>2a</sub>	cytozol komórek śluzówki żołądka	obydwie pochodne oddziałują z histaminą, cyklazą adenylową i wolnym wapniem; rola w przenoszeniu sygnału	[4]
PGE <sub>1</sub> PGE <sub>2</sub>	błona komórek parenchymalnych wątroby	stabilizacja mikrolepkości błony	[39]
PGE <sub>2</sub>	mitochondria hepatocytów	ochrona przed działaniem KCN	[46]
16,16' dmPGE <sub>2</sub>	mitochondria komórek powierzchniowych żołądka	ochrona przed działaniem etanolu; jądra tych komórek są morfologicznie niezmiennione	[2]
PGJ <sub>2</sub> PGA	jądra komórek naskórka	miejsce nagromadzenia PGs; kierowanie do jądra zachodzi poprzez swoiste przekaźniki w błonie plazmatycznej	[27]
16,16' dmPGE <sub>2</sub>	aparat Golgiego (AG) komórek wątroby	ochrona przed uszkodzeniami powodowanymi przez streptozotocynę; morfologia AG oraz aktywność biochemiczna (aktywność transferazy galaktozylowej, wydajność izolowania, skład fosfolipidów) takie jak w kontroli	[31]
16,16' dmPGE <sub>2</sub> PGE <sub>1</sub>	frakcja wzbogacona w błony AG	stymulacja aktywności transferazy galaktozylowej przez obydwie PGs <i>in vitro</i> po izolacji frakcji wzbogaconej w błony AG; pomiary do 8 godz. (dla PGE <sub>1</sub> ) lub do 20 godz. (dla 16,16' PGE <sub>2</sub> )	[32, 33]

Również elektryczne właściwości błon, także inne fizykochemiczne ich właściwości mogą być regulowane przez PGs [45, 67]. Prostaglandyny ( $PGE_1$ ) oddziałują na receptor LDL w komórkach wątroby ludzkiej, szczurzej i świńskiej [76]. Sugeruje to potencjalne możliwości obniżenia poziomu lipidów przez  $PGE_1$ . Współdziałanie  $PGE_2$  i  $PGF_{2\alpha}$  z histaminą, cyklazą adenylową oraz wolnym wapniem w cytozolu komórek śluzówki żołądka odgrywa ważną rolę w przenoszeniu sygnału [4]. Cytoprotekcyjne działanie  $PGE_1$  i  $PGE_2$  w komórkach parenchymalnych wątroby [39] polega na stabilizacji mikrolepkości błony.

Inne organele komórkowe także oddziałują z błonami, np. mitochondria hepatocytów są chronione przez  $PGE_2$  przed uszkodzeniami cyjankiem potasu [44]. Również mitochondria komórek powierzchniowych nabłonka żołądka są głównym miejscem docelowym, na które działa etanol i które są chronione przez 16,16'dm $PGE_2$  [2]. Jądra tych komórek są morfologicznie niezmienione.

Jądra komórek naskórka są natomiast miejscem, gdzie w komórce są kierowane i nagromadzane PGs (np.  $PGJ_2$  i PGA). Proces ten zachodzi przez swoiste przENOŚniki w błonie komórki [27].

Aktywność biochemiczna aparatu Golgiego (wyrażona wydajnością izolowania tej frakcji, aktywnością galaktozylotransferazy, która jest enzymem-znacznikiem tej organeli, jak również składem fosfolipidów) oraz morfologia tej organeli jest zachowana przy trzykrotnym podaniu 16,16'dm $PGE_2$  wraz ze streptozotocyną (która sama powoduje drastyczne zmiany aparatu Golgiego hepatocytów szczurzych) [31]. Co więcej w badaniach *in vitro* aktywność tego enzymu jest stymulowana dodaniem do wyizolowanej frakcji błon aparatu Golgiego  $PGE_1$  lub 16,16'dm $PGE_2$  przez 8 lub 20 godz. po izolacji tej frakcji [32, 33].

Krótkie zestawienie pochodnych PGs oraz narządów, komórek lub organeli komórkowych, na które działają, wraz z podsumowaniem biologicznej aktywności tych związków podają tabele 1–3.

## 5. ZASTOSOWANIE PGs W FARMAKOLOGII I MEDYCYNIE

Istnieją próby zastosowania ukierunkowanej terapii-prostaglandynami, np. Lipo- $PGE_1$  (preparat, gdzie  $PGE_1$  jest wprowadzona do mikrosfer lipidowych). W Japonii od 1988 r. prowadzi się tego typu kurację w różnych schorzeniach krążenia [26]. Są czynione starania dla ulepszenia preparatu, który byłby szybko hydrolizowany we krwi do  $PGE_1$ , a lipidowe mikrosfery byłyby stabilne i niezmienione w stosunkowo długim czasie (np. 1 miesiąca). Taki preparat hamuje np. agregację płytek krwi ludzkiej, jak również uszkodzenia ścian naczyń, natomiast powoduje mniejsze podrażnienia skóry niż sama  $PGE_1$ , co wskazuje na możliwość doustnego podawania takiej pochodnej. Wspomniano już o cytoprotekcyjnym działaniu 16,16'dm $PGE_2$  przed utratą włosów spowodowaną promieniowaniem, co może być podstawą zasto-



sowania tego związku w radioterapii, szczególnie u pacjentów z guzami mózgu, których poddaje się temu zabiegowi [16].

Niektórzy autorzy, np. Ferrei i wsp. [14] wraz z poznaniem współdziałania cytokin, np. TNF-alfa i LT z PGs wiążą duże nadzieje z profilaktyką pewnych typów nowotworów oraz AIDS. Musiałoby to prowadzić do lokalnego użycia cytotoksycznej aktywności tych związków z równoczesnym zminimalizowaniem ich działania na tkanki inne niż docelowa.

W zabiegach transplantacyjnych np. wątroby u ludzi znalazła zastosowanie PGE<sub>1</sub> [71]. Autorzy działanie to przypisują takim właściwościom, jak hamowanie agregacji płytek, stabilizacja błon komórkowych, zachowywanie puli wątrobowego ATP oraz zdolności immunosupresyjne. Właściwości te potwierdzają również badania innych autorów [24,79].

Również w cukrzycy obserwowany jest wyraźny wpływ PGs. Jakkolwiek trudno jest jednoznacznie podsumować efekt działania metabolitów kwasu arachidonowego na trzustkę, Robertson [54] podkreśla, że większość prac do 1986 r. wskazuje, iż PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> hamują funkcję komórek B zarówno w pierwszej, jak i drugiej fazie wydzielania insuliny.

Rosen i Hohl [56] rozpatrują zależność pomiędzy PGs a cukrzycą (brakiem insuliny w cukrzycy insulinozależnej czy też brakiem tolerancji na glukozę w cukrzycy insulinoniezależnej). Z doświadczeń wynika, że PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> oraz PGI<sub>2</sub> same indukują hiperglikemię zarówno u zdrowych, jak i chorych osób. Stąd dodatkowo konieczna jest dokładna kontrola poziomu cukru u chorych z cukrzycą, którym podaje się preparaty PGs. Tendencję do hiperglikemii indukowanej podaniem PGs wykazują również zwierzęta.

Jednym z klinicznych oddziaływań PGs w cukrzycy jest wpływ na zmiany pochodzące z neuropatii czy powikłań naczyniowych. Dotyczy to zarówno PGI<sub>2</sub>, jak PGE<sub>1</sub>. Doświadczenia na szczurach z długotrwałą cukrzycą wywołaną streptozotocyną (5 mies.) wskazują bardzo dodatni efekt łączenia terapii inhibitorem reduktazy aldolazy (lekiem stosowanym w neuropatii cukrzycowej) z analogiem PGE<sub>1</sub> [84]. Axelrod [3] podkreśla modulujące działanie PGI<sub>2</sub> i PGE<sub>2</sub> na reaktywność naczyń zarówno u zdrowych, jak i u osób z brakiem insuliny oraz działanie obu tych pochodnych w tkance tłuszczowej (i prawdopodobnie w innych tkankach). Przy wzmożonej produkcji wymienionych PGs w kwasicy cukrzycowej zmniejsza się oporność naczyń oraz ciśnienie krwi. Szczególne zainteresowanie wpływem PGs w cukrzycy doświadczalnej wywołanej podaniem streptozotocyny (SZ) wynika z własnych prac doświadczalnych. Przy trzykrotnym podaniu 16,16'dmPGE<sub>2</sub> łącznie z SZ (przed, łącznie oraz po SZ) uzyskano doskonałe ochronne działanie tego związku przed drastycznymi uszkodzeniami aktywności biochemicznej oraz morfologii aparatu Golgiego wątroby szczura [31].

Zupełnie inny mechanizm oddziaływania ma normalizujące kliniczne objawy cukrzycy doustne zastosowanie jonów wanadu (na różnym stopniu wartościowości),

co zostanie omówione odrębnie [73]. Z przytoczonych wyżej przykładów wynika, że jakkolwiek powszechne zastosowanie w medycynie leków, opartych na eikozanoidach wymaga jeszcze dalszych badań, to uzyskane do tej pory wyniki wydają się obiecujące.

## 6. ZAKOŃCZENIE

Na zakończenie należy podkreślić, że znane są i inne związki, chroniące podobnie jak PGs przed uszkodzeniami różnych organów i tkanek. Jako przykład można podać dla układu żołądkowo-jelitowego związki hydrochalconu [83], pochodne cynku (np. L-karnoizyna w połączeniu z cynkiem, tzw. Z-103 [7] czy monoglicerynian cynku, tzw. ZMG albo Glyzinc [51] podobnie jak siarczan cynku). W układzie tym osłaniająco działa też dimetylotiomocznik [64], kwas moczowy [1] oraz lansoprazol, nowy inhibitor pompy protonowej [5].

W uszkodzeniach wywołanych w wątrobie i nerkach czterochlorkiem węgla skojarzonym z etanolem działa acetylocysteina stosowana doustnie [61]. W cukrzycy modelowej, wywołanej podaniem streptozotocyny lub alloksanu, oprócz wspomnianego wanadu działa cytoprotekcyjnie chlorowodorek diltiazemu (środek blokujący kanały wapniowe). Stosowany jest dootrzewnowo lub dożylnie i działa podobnie do innych substancji hamujących aktywność kanałów wapniowych [28]. Wydaje się jednak, że jak dotąd najbardziej fizjologicznymi (gdyż są produkowane w organizmie), najpowszechniej oraz najskuteczniej działającymi związkami o własnościach cytoprotekcyjnych są prostaglandyny.

## LITERATURA

- [1] AL-BEKAIRI AM, QUERESHI S, AHMED MM, AFZAL M, SHAH AH. A study of uric acid pretreatment for the protection of rat gastric mucosa against toxic damage. *Fd Chem Toxic* 1992; **30**: 525–531.
- [2] ARAKAWA T, KOBAYASHI K, FUKUDA T, HIGUCHI K, SAKUMA H, KOBAYASHI K. Early ultrastructural changes of surface epithelial cells isolated from rat gastric mucosa after exposure to ethanol with or without 16,16'-dimethylprostaglandin E<sub>2</sub>. *J Clin Gastroenterol* 1992; **14**: 59–63.
- [3] AXELROD L. Insulin, prostaglandins and pathogenesis of hypertension. *Diabetes* 1991; **40**: 1223–1227.
- [4] BEIL W, BERSIMBAEVR, SEWING KF. Signal transduction pathway in gastric mucous cells. *Biomed Biochim Acta* 1991; **50**: 1185–1192.
- [5] BERGMANN JF, CHASSANY O, SIMONEAU G, LEMAIRE M, SEQUESTAA JM, CAULIN C. Protection against aspirin-induced gastric lesions by lansopromazole: simultaneous evaluation of functional and morphologic responses. *Clin Pharmacol Ther* 1992; **52**: 413–416.



- [6] BOKKOH Y. Effects of prostaglandin E<sub>1</sub> on rat cardiac allografts with cyclosporine. *Transplant Proceed* 1992; **24**: 1355–1356.
- [7] CHO CH. Protective effects of zinc L-carnosine (Z-103) on reserpine-induced gastric ulceration in rats. *Drug Develop Res* 1992; **27**: P61–65.
- [8] CHO CH, OGLE CW. The pharmacological; differences and similarities between stress and ethanol-induced gastric mucosal damage. *Life Sci* 1992; **51**: 1833–1842.
- [9] CRAFA F, GUGENHEIM J, SAINT-PAUL MC, CAVANE LC, LAPALUS F, OUZAN D, MILITERNO G, MOUIEL J. Protective effects of prostaglandin E<sub>1</sub> on normothermic liver ischemia. *Eur Surg Res* 1991; **23**: 278–284.
- [10] DENNERY PA, WALENGA RW, KRAMER CM, ALPERT SE. Prostaglandin E<sub>2</sub> attenuates hyperoxia-induced injury in cultured rabbit tracheal epithelial cells. *Pediatr Res* 1992; **32**: 87–91.
- [11] DIENER M, NOBLES M, SCHMITT C, RUMMEL W. Characterization of the antisecretory action of prostaglandin D<sub>2</sub> in the rat colon. *Acta Physiol Scand* 1992; **145**: 19–24.
- [12] DUCROC R, WIRBEL A, GARZON B, VILAR J, BRUNEL-RIVEAU B, GELOSO JP. Milk-stimulated PGE<sub>2</sub> production by isolated gastric cells: a possible role in the inhibition of histamine-induced acid secretion. *J Pediatr Gastroenterol Nutrit* 1992; **15**: 20–24.
- [13] DYMOND JB, KALMUS GW. The cytoprotective properties of prostaglandin E<sub>2</sub> against the toxic effects of actinomycin C on embryonic neuronal retina cells. *Prostaglandins* 1992; **44**: 129–134.
- [14] FERRERI NR., SARR T, ASKENASE PW, RUDDLE NH. Molecular regulation of tumor necrosis factor alfa and lymphotoxin production in T cells. *J Biol Chem* 1992; **267**: 9443–9449.
- [15] FOGH ML, ALIJANI MR, HELFRICH GB, RAMWELL PW. Eicosanoids and organ transplantation. *Ann Clin Res* 1984; **16**: 318–322.
- [16] GENG L, HANSON WR, MALKINSON FD. Topical or systematic 16,16dm prostaglandin E<sub>2</sub> or WR-2721 (WR-1065) protects mice from alopecia after fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol* 1992; **61**: 533–537.
- [17] GOERG KJ, WANITSCHKER, DIENER M, RUMMEL W. Inhibition of neuronally mediated secretion in rat colonic mucosa by prostaglandin D<sub>2</sub>. *Gastroenterology* 1992; **103**: 781–788.
- [18] GOMEZ-NINO A, ALMARAZ L, GONZALEZ C. Potentiation by cyclooxygenase inhibitors of the release of catecholamines from the rabbit carotid body and its reversal by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Neurosci Lett* 1992; **140**: 1–4.
- [19] GUTH PH, PAULSEN G, NAGATA H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. *Gastroenterology* 1988; **87**: 1083–1090.
- [20] GULDUTUNA S, ZIMMER G, KURTZ W, LEUSCHNER U. Prostaglandin E<sub>2</sub> directly protects isolated rat gastric surface cell membranes against bile salts. *Biochim Biophys Acta* 1987; **902**: 217–222.
- [21] HAYES ME, RAI A, COOPER RG, BAYLEY D, FREEMONT AJ, MAWER EB. Inhibition by prostaglandin E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> synthesis by synovial fluid macrophages from arthritic joints. *Ann Rheumatic Disease* 1992; **51**: 632–637.
- [22] HIGGS GA, MONCADA S, VANE JR. Eicosanoids in inflammation. *Ann Clin Res* 1984; **16**: 287–299.
- [23] HORROBIN DF. The relationship between schizophrenia and essential fatty acid and eicosanoid metabolism. *Prostagland Leukotr Essent Fatty Acids* 1992; **46**: 71–77.
- [24] HUGHES-FULFORD M, McGRATH MS, HANKS D, ERICKSON S, PULLIAM L. Effects of dimethylprostaglandin A<sub>1</sub> on Herpes Simplex Virus and human immunodeficiency virus replication. *Antimicrob Agents & Chemoth* 1992; **36**: P2253–2258.
- [25] HUME R, COSSAR D, KELLY R, GILES M, HALLAS A, GOURLAY M, BELL J. Prostaglandins: PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>alfa in human fetal lung: immunochemistry and release from organ culture. *Exptl Lung Res* 1992; **18**: 259–273.

- [26] IGARASHI R, MIZUSHIMA Y, TAKENAGA M, MATSUMOTO K, MORIZAWA Y, YASUDA A. A stable PGE<sub>1</sub> prodrug for targeting therapy. *J Control Release* 1992; **20**: 37–46.
- [27] IKAI K, FUKUSHIMA M. Effects of cytotoxic prostaglandin, delta 12 PGJ<sub>2</sub> on protein synthesis and cytoskeleton in transformed cells in culture. *Arch Dermatol Res* 1990; **282**: 131–134.
- [28] KATSUMATA K, KATSUMATA K jr, KATSUMATA Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin induced diabetes in rats. *Horm Metab Res* 1992; **24**: 508–510.
- [29] KE HZ, LI M, JEE WSS. Prostaglandin E<sub>2</sub> prevents ovariectomy-induced cancellous bone loss in rats. *Bone & Mineral* 1992; **19**: 45–62.
- [30] KOREN HS, JOYCE M, DEVLIN RB, BECKER S, DRISCOLL K, MADDEN MC. Modulation of eicosanoid production by human alveolar macrophages exposed to silica in vitro. *Env Health Prospect* 1992; **97**: 77–83.
- [31] KORDOWIAK AM. Cytoprotective effect of 16,16'-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> (dmPGE<sub>2</sub>) on streptozotocin-induced biochemical alterations of Golgi-rich membrane fraction in comparison with morphology of rat liver Golgi apparatus in situ. *Path Res Pract* 1986; **181**: 397–402.
- [32] KORDOWIAK AM, STACHURA J, TOMECKI J, KAPUSTA P. The influence of PGE<sub>1</sub> and ethanol as PGE<sub>1</sub> solvent on the activity of galactosyltransferase of rat liver Golgi fractions – *in vitro* experiments. *J Physiol Pharmacol* 1993; **44**: 383–390.
- [33] KORDOWIAK AM, TOMECKI J, PROCYK K, KAPUSTA P. Prostaglandin E (dmPGE<sub>2</sub>) action *in vitro* on the activity of rat liver Golgi apparatus galactosyltransferase. *Acta Biochim Polon* 1993; **40**: 1–5.
- [34] KUREBAYASHI Y, HONDA Y. Protection by 16,16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> and dibutyl cyclic AMP against complement-mediated hepatic necrosis in rats. *Hepatology* 1991; **14**: 545–550.
- [35] LARSEN KR, DAJANI EZ, IVES MM. Antiulcer drugs and gastric mucosal integrity. *Digest Diseases and Sci* 1992; **37**: 1029–1038.
- [36] LERNER RW, LOPASCHUK GD, OLLEY PM. High-affinity prostaglandin E receptors attenuate adenylyl cyclase activity in isolated bovine membrane. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; **68**: 1574–1580.
- [37] LICHTENBERGER LM, GRAZIANI LA, DIAL EJ, BUTLER BD, HILLS BA. Role of surface-active phospholipids in gastric cytoprotection. *Science* 1983; **219**: 1327–1329.
- [38] MARGO M, ZOLI A, ALTOMONTE L, MIRONE L, DeSOLE P, DIMARGO G, DeLEO E. Effect of fish oil on neutrophil chemiluminescence induced by different stimuli in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992; **51**: 877–880.
- [39] MASAKI N, OHTA Y, SHIRATAKI H, OGATA I, HAYASHI S, YAMADA S, HIRATA K, NAGOSHI S, MOCHIDA S, TOMIYA T. Hepatocyte membrane stabilization by prostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> favorable effects on rat liver injury. *Gastroenterology* 1992; **102**: 572–576.
- [40] MONCADA S, VANE JR. Prostacyclin and its clinical applications. *Ann Clin Res* 1984; **16**: 241–252.
- [41] NAGAPPA AN, RAJU DB, SRIVASTAVA RC. Role of liquid membrane phenomenon in the biological actions of prostaglandins; studies on prostaglandin E<sub>1</sub> and prostaglandin F<sub>2alpha</sub>. *Indian J Biochem Biophys* 1989; **26**: 172–177.
- [42] NICOL GD, KLINGBERG DK, VASKO MR. Prostaglandin E<sub>2</sub> increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *J Neurosci* 1992; **12**: 1917–1927.
- [43] NISHIYAMA K, KATORI M, UENO A, OHNO T, SAIGENJI K. Suppression of myoelectrical activity of gastric smooth muscle by endogenous gastric prostaglandin E<sub>2</sub>. *Digestive Dis Sci* 1992; **37**: 1002–1008.
- [44] NOWAK J. Eicosanoids and the lungs. *Ann Clin Res* 1984; **16**: 269–286.



- [45] OHNISHI ST, OHNISHI T. Biologically significant physico-chemical properties of antioxidative prostaglandin derivatives *Arzneimittelforschung* 1991; **41**: 1201–1205.
- [46] PARK Y, DEVLIN TM, JONES PP. Protective effect of the dimer 16,16-diMePGB<sub>1</sub> against KCN-induced mitochondrial failure in hepatocytes. *Am J Physiol* 1992; **263**: C405–C411.
- [47] PERUSQUIA M, KUBLI-GARFIAS C. External calcium dependence of the uterine contraction induced by prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2alpha</sub> and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins* 1992; **43**: 445–455.
- [49] PRECLIK G, STRANGE EF, DITSCHUNEIT H. PGE<sub>2</sub> secretion from organ cultured gastric mucosa: correlation with cyclooxygenase activity and endogenous substrate release. *Prostaglandins* 1992; **43**: 545–558.
- [49] PRECLIK G, STANGE EF, DITSCHUNEIT H. Limited utilization of exogenous arachidonic acid by the prostaglandin cyclooxygenase in gastric mucosa; the role of protein binding, glutathione, peroksydase and hydrogen peroxides. *Prostaglandins* 1992; **44**: 177–197.
- [50] ZAORSKA B (red.) Prostaglandyny i inne eikozanoidy. PZWL W-wa 1986.
- [51] RAINSFORD KD, WHITEHOUSE MW. Anti-ulcer activity of slow-release zinc complex, zinc monoglycerolate (Glyzinc). *J Pharm Pharmacol* 1992; **44**: 476–482.
- [52] REICHSTEIN BJ, COHEN MM. Effect of acetazolamide on rat gastric mucosal protection and stimulated bicarbonate secretion with 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub>. *J Lab Clin Med.* 1984; **104**: 797–804.
- [53] ROBERT A. On the mechanism of cytoprotection by prostaglandins. *Ann Clin Res* 1984; **16**: 335–338.
- [54] ROBERTSON RP. Arachidonic acid metabolite regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* vol. 2 Wiley J.&Sons Inc. 1986; 261–269.
- [55] ROSS AD, PERLANSKI E, GRUPP LA. Prostaglandin E<sub>2</sub> reduces voluntary ethanol consumption in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; **36**: 527–530.
- [56] ROSEN P, HOHL C. Prostaglandins and diabetes. *Ann Clin Res* 1984; **16**: 300–313.
- [57] RUWART MJ, NICHOLS NM, HEDEEN K, RUSH BD, STACHURA J. 16,16 dimethylPGE<sub>2</sub> and fatty acids protect hepatocytes against CCl<sub>4</sub> induced damage. *In vitro Cell Develop Biol* 1985; **21**: 450–452.
- [58] RUWART MJ, RUSH BD, SNYDER KF, PETERS KM, APPELMAN HD, HENLEY K.S. 16,16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> delays collagen formation in nutritional injury in the rat liver. *Hepatology* 1988; **8**: 61–64.
- [59] SASAGURI T, MASUDA J, SHIMOKADO K, YOKOTA T, KOSAKA C, FUJISHIMA M, OGATA J. Prostaglandins A and J arrest the cell cycle of cultured vascular smooth muscle cells without suppression of c-myc expression. *Expt Cell Res* 1992; **200**: 351–357.
- [60] SHIMIZU T, YAMASHIRO Y, YABUTA K. Prostaglandin E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and F<sub>2alpha</sub> in human milk and plasma. *Biol Neonate* 1992; **61**: 222–225.
- [61] SIMKO V, MICHAEL S, KATZ J, OBERSTEIN E, POPESCU A. Protective effect of oral acetylcysteine against the hepatorenal toxicity of carbon tetrachloride potentiated by ethyl alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; **16**: 795–799.
- [62] SIMMONS NL. Acetylcholine and kinin augmentation of Cl<sup>-</sup> secretion stimulated by prostaglandin in a canine renal epithelial cell line. *J Physiol* 1992; **447**: 1–15
- [63] SKOUTERIS GG, KASER MR. Prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2alpha</sub> mediate the increase in c-myc expression induced by EGF in primary rat hepatocyte cultures. *Biochim Biophys Res Commun* 1991; **178**: 1240–1246.
- [64] SMITH GS, BARETO JC, SCHMIDT KL, TORNWALL MS, MILLER TA. Protective effect of dimethylthiourea against mucosal injury in rat stomach. *Digest Diseases Sci* 1992; **7**: 1345–1355.
- [65] STACHURA J, KAŁUŻA J. Influence of prostaglandin on actinomycin C-induced degeneration of embryonal neuroectodermal tissue. *Prostaglandins* 1982; **24**:433–439.

- [66] STACHURA J, TARNAWSKI A, SZCZUDRAWA J, BOGDAŁ J, MACH T, KLIMCZYK B, KIRCHMAYER S. Cytoprotective effect of 16,16'-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> and some drugs on an acute galactosamine induced liver damage in rat. *Folia Histochem Cytochem* 1980; **18**: 311–318.
- [67] STEIDL M, RITTER M, LANG F. Regulation of potassium conductance by prostaglandins in cultured renal epitheloid (Madin-Darby canine kidney) cells. *Pflugers Arch* 1991; **418**: 431–436.
- [68] TABATA M, TOMOMASA T, ITOH K, MIYASHITA M, HYMAN PE, TANAKA T, KUROUME T. Developmental changes in gastric mucus gel thickness: responsiveness to 16,16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> and mucosal protection in the rat. *Pediatr Res* 1992; **31**: 193–195.
- [69] TAKANASHI H, AKIMA M. Protective effects of arbaprostil against indomethacin induced gastric lesions in rats: significance of maintained gastric blood flow. *Japan J Pharmacol* 1992; **59**: 349–355.
- [70] TAKANASHI H, KAWABE Y, AKIMA M. Acid promoted epimerisation of arbaprostil 15(R)-15-methylprostaglandin E<sub>2</sub> elicits gastric antiseecretory activities in rats. *Japan J Pharmacol* 1991; **57**: 559–564.
- [71] TANCHAROEN S, JONES RM, ANGUS PW, MICHELL LD, McNICOL L, HARDY KJ. Prostaglandin E<sub>1</sub> therapy in orthotopic liver transplantation recipients: indications and outcome. *Transpl Proc* 1992; **24**: 2248–2249.
- [72] THEIS JG, DELLWEG H, PERZBORN E, GROSS R. Binding characteristics of the new thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor antagonist [3H] BAY U3405 to washed human platelets and platelet membranes. *Biochem Pharmacol* 1992; **44**: 495–503.
- [73] TRZOS R, KORDOWIAK AM. Pochodne wanadu jako czynnik normalizujący kliniczne objawy cukrzycy. *Post Biol Kom* 1994; **3**: 293–302.
- [74] UOTILA P, VAPAATALO H. Synthesis, pathways and biological implications of eicosanoids. *Ann Clin Research* 1984; **16**: 226–233.
- [75] VAILLIER D, DACULSI R, GUALDE N. Effects of lipopolisaccharide on interleukin 2 induced activity of murine splenocyte cultures: role of prostaglandin E<sub>2</sub> and interferons. *Canc Immunol Immunother* 1992; **35**: 395–400.
- [76] VIRGOLINI I, LI SR, LUPATTELLI G, PIDLICH J, ANGELBERGER P, BANYAI M, SINZINGER H. Effect of prostaglandin E<sub>1</sub> on the low density lipoprotein apo-B-receptor binding in human rat and swine liver in vitro. *Prostaglandins* 1991; **42**: 81–93.
- [77] WALLACE JL. Non-steroidal anti-inflammatory drug, gastropathy and cytoprotection. Pathogenesis and mechanisms reexamined. *Scand J Gastroenterol* 1992; **27**: 3–8.
- [78] WANG DL, CHANG YN, HSU HTC, USAMI S, CHIEN S. Prostaglandin E<sub>1</sub> and dibutyryl cyclic AMP enhance platelet resistance to deformation. *Trombosis Res* 1992; **65**: 757–768.
- [79] WAYMACK JP, KLIMPEL G, HAITHCOAT J, RUTAN RL, HERNDON DN. Effect of prostaglandin E on immune function in normal healthy volunteers. *Surgery, Gynecol & Obstetrics* 1992; **175**: 329–322.
- [80] WILHELM J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med. Monogr Prahe* 1990; **137**: 1–53.
- [81] WU H, JAMES-KRACKE MR, HALENDA SP. Direct relationship between calcium mobilization and phospholipase D activation in prostaglandin E-stimulated human erythroleukemia cells. *Biochemistry* 1992; **31**: 3370–3377.
- [82] WU-WANG CY, WANG S-L, LIM C, SLOMIANY A, SLOMIANY BL. Effect of ethanol on prostaglandin E<sub>2</sub> receptor in rat submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol* 1992; **37**: 867–873.
- [83] YAMAMOTO K, KAKEGAWA H, UEDA H, MATSUMOTO H, SUDOT T, MIKI T, SATOH T. Gastric cytoprotective anti-ulcerogenic actions of hydroxychalcones in rats. *Planta Med* 1992; **58**: 389–484.



- [84] YASUDA H, SONOBE M, HISANAGA T, KAWABATA T, MAEDA K, KIKKAWA R, SHIGETA Y. A combination of the aldolase reductase inhibitor statil and prostaglandin E<sub>1</sub> analogue, OP 1206 alfa CD, completely improves sciatic motor nerve conduction velocity in streptozotocin-induced chronically diabetic rats. *Metabolism* 1992; **41**: 778–782.
- [85] ZHANG S-Z, FULTON AM. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor modulation affects tumor cell adhesion to laminin. *J Cell Physiol* 1991; **149**: 208–213.
- [86] ZHAO D, HIRST BH. Prostaglandin protects against bile salt induced increases in proton permeation of duodenal brush border membrane. *Gut* 1991; **32**: 645–648.

Otrzymano: 16.11.1993 r.

Przyjęto: 20.07.1994 r.

31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3





## POCHODNE WANADU JAKO CZYNNIK NORMALIZUJACY KLINICZNE OBJAWY CUKRZYCY

### DERIVATIVES OF VANADIUM AS INSULIN-MIMETIC AGENT IN DIABETES

ROBERT TRZOS, ANNA MARIA KORDOWIAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu  
Jagiellońskiego w Krakowie

*Streszczenie.* W artykule opisano działanie pochodnych wanadu, naśladujących działanie insuliny *in vivo* i *in vitro*. Efekty te obserwowano u szczurów i myszy w modelu cukrzycy insulino-zależnej i insulino-niezależnej. Przedstawiono wpływ wanadu na poziomie tkanki i komórki, jak również na kinazę tyrozynową receptora insuliny i omówiono alternatywne drogi jego działania w komórce.

*Słowa kluczowe:* wanad, kinaza tyrozynowa receptora insuliny, fosforylacja, cukrzyca.

*Summary.* In this paper insulin-mimetic action of vanadium *in vivo* and *in vitro* was described. This effects were observed in rats and mice in insulin-dependent and insulin-independent diabetes mellitus. The influence of vanadium on tissues, cells, enzymes and on insulin receptor tyrozine kinase were presented. The alternative ways of action of vanadium were shown.

*Key words:* vanadium, insulin receptor protein kinase, phosphorylation, diabetes.

## 1. WANAD I JEGO BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ

W przeciwieństwie do wielostronnego i powszechnego działania prostaglandyn opisanego poprzednio [28], pochodne wanadu działają 'normalizująco' w jednym, jak dotąd poznanym przypadku, tzn. w cukrzycy.

Intensywne badania nad wanadem i jego pochodnymi rozpoczęły się z końcem lat siedemdziesiątych, kiedy zauważono hamujący wpływ tego pierwiastka na ATP-azę  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  [9,10]. Były to jedne z pierwszych doniesień, w pewnym sensie przypadkowe, sugerujące pewną aktywność wanadu na poziomie molekularnym. Dalsze badania potwierdziły to, iż wanad jest pierwiastkiem śladowym koniecznym do wzrostu szczurów [10] i utrzymania hodowli komórkowych ssaków [55]. Jego stężenie w organizmie waha się od 0,1 do 1,0  $\mu\text{M}$  w zależności od tkanki [10,58].

W ostatnich latach najbardziej intensywnie badana jest zdolność wanadu do naśladowania działania insuliny *in vivo*, jak również *in vitro*. Kliniczne objawy cukrzycy wywołanej streptozotocyną (STZ) [3,8,15] lub alloksanem [51,52] są normalizowane po 3–4 dniach podawania roztworów soli tego metalu. Niektóre efekty, jak np. wzrost syntezy pewnych enzymów, zachodzą po 10–15 dniach. Stwierdzono to w:

- a) wątrobie [2,5,22,34,41–44],
- b) mięśniu serca [45,46,59],
- c) nerkach [8,30,38,51],
- d) mięśniach szkieletowych [48, 60],
- e) trzustce [17,40].

Doświadczenia obejmują przede wszystkim hepatocyty szczurze, adipocyty i komórki mięśniowe. W doświadczeniach przeprowadzanych na zwierzętach roztwory soli tego metalu najczęściej podaje się do picia. Jest to dużym udogodnieniem i zaletą w stosunku do insuliny, która musi być dostarczana w formie zastrzyków. Podawanie wanadu zwierzętom kontrolnym nie powoduje żadnych zmian w ich metabolizmie [22, 33].

W wielu pracach są używane te same pochodne wanadu, głównie są to orto- i metawanadany ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\text{NaVO}_3$ ), wanad na piątym stopniu utlenienia ( $\text{V}^{5+}$ ) lub siarczan wanadylu  $\text{VOSO}_4$  (wanad  $\text{V}^{4+}$ ) [3,8,15,40,46, 50,51,56]. Na uwagę zasługuje praca, w której użyto obojętnego jonu wanadu ( $\text{V}^{4+}$ ), koordynacyjnie związanego z pochodną maltolu, który według tych autorów ulegał o wiele lepszemu wchłanianiu w organizmie szczura [33]. Maltolowe pochodne wanadu były, jak podkreślają autorzy, nietoksyczne w przeciwieństwie do meta- i orto-wanadanów, które mogą wywierać również efekt toksyczny obok korzystnego, tj. obniżenia poziomu cukru we krwi. Według sugestii autorów struktura tej podawanej pochodnej wanadu, a szczególnie inne atomy wiążące ten metal, mogą mieć wpływ na jego biologiczne działanie. Wydaje się również, że niezbędne jest doustne wprowadzenie pochodnych wanadu, gdyż podanie siarczanu wanadylu przez zgłębnik nie normalizuje objawów cukrzycy doświadczalnej u zwierząt [14]. Atom wanadu w wątrobie jest otoczony 4 atomami tlenu, może występować w połączeniu z białkami i może być zredukowany z  $\text{V}^{5+}$  do  $\text{V}^{4+}$ , co wykazano przy zastosowaniu metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [49,50]. Podobna redukcja jonów wanadu zachodzi w krwinkach. Jony wanadylowe mogą łączyć się z hemoglobiną, ale są znacznie gorszymi inhibito-



rami ATP-azy niż jony  $V^{5+}$  [9]. Jon  $VO^{2+}$  ma zdolność łączenia się w stosunku 1:1 ze zredukowanym glutationem [57]. Większość autorów uważa, że właśnie jon  $V^{4+}$  jest odpowiedzialny za podobne do insuliny działanie w komórce [16,46,48,57, 58]. Należy podkreślić strukturalne podobieństwo tego jonu do jonu fosforanowego, co umożliwia mu przyłączanie do miejsc wiążących fosforany [10]. W większości przeprowadzonych doświadczeń, po zaprzestaniu podawania wanadu objawy cukrzycy powracały po kilku dniach [ 31,57 ]. Istnieją jednak inne doniesienia świadczące o przedłużonym działaniu wanadu, tzn. do 13 tygodni po zaprzestaniu podawania tego pierwiastka i jego trwałej funkcji ochronnej względem trzustki [8, 40,45].

## 2. EFEKTY PODAWANIA POCHODNYCH WANADU NA OBJAWY CUKRZYCY

Jak wspomniano, wanad normalizuje kliniczne objawy cukrzycy. Stosowane dawki tego metalu w roztworach wahają się od 0,2 do 0,8 mg/ml w NaCl dodawanego w celu zredukowania do minimum efektów toksycznych [22,31]. Wanad normalizuje zarówno morfologię różnych tkanek, jak również aktywność enzymów i procesy metaboliczne zmienione pod wpływem cukrzycy.

Na przykład: a) w **wątrobie**:

- normalizuje aktywność kluczowych enzymów metabolizmu glukozy: glukokinazy, 6-fosfofrukto-2-kinazy, heksokinazy, kinazy tyrozynowej, 6-fosfofrukto-fosfatazy, kinazy pirogronianu, dehydrogenazy 6-fosfoglukozy [5,22,34,42,52,59] oraz syntetazy glikogenu, co powoduje zwiększenie ilości glikogenu do wartości zbliżonej do kontrolnej [3,22,43,48,62];

- zwiększa wiązanie insuliny z receptorem i przedłuża jej działanie (tylko przy podaniu pochodnych wanadu w niskim stężeniu < 200 nM) w adipocytach szczura [20,42]; według poglądów części autorów badających adipocyty odporne na insulinę, dodatkowe podanie pochodnych wanadu już w bardzo krótkim czasie, bo po 5 min, zwiększa wiązanie tego hormonu do receptorów; sądzą oni, że wynika to raczej ze wzrostu ilości receptorów insuliny niż ze zwiększenia powinowactwa receptorów do ligandu [7,11,18,19];

- zwiększa transport heksozy [16,31,58];

- stymuluje utlenianie glukozy [2,4,58];

- obniża poziom glukozy we krwi do wartości bardzo zbliżonej do kontrolnej [2–8,11,20,31–34,58];

- zwiększa lipogenezę, co powoduje unormowanie gospodarki fosfolipidów, lipidów i lipoprotein [29,33,54,55,62];

- normalizuje metabolizm kwasów żółciowych [39];

b) w **nerkach** powoduje [31,33,38,57]:

- obniżenie poziomu białek w moczu [38];
- obniżenie poziomu mocznika, kreatyniny i transaminazy acetoctowo-glutaminowej.

Wprawdzie większość autorów podaje, że wpływ wanadu na wymienione powyżej enzymy jest porównywalny z tym, jaki wywiera na nie insulina, lecz często jest on mniejszy lub znacznie większy w stosunku do insuliny [5,17,59]. Stosowanie jednocześnie wanadu i insuliny nie jest addytywne, tzn. nie powoduje większej aktywności enzymów niż sama insulina czy wanad [18,21,26,63].

Sugeruje się, że na pewnym etapie mechanizm oddziaływania insuliny i wanadu jest wspólny i niezbyt odległy od siebie. Świadczyć może o tym obniżenie poziomu insuliny immunoreaktywnej we krwi zwierząt kontrolnych pod wpływem podawania pochodnych wanadu. Podobne dawki wanadu są bez wpływu na obniżony poziom insuliny we krwi zwierząt z cukrzycą doświadczalną [8,41–43,52]. Opisane efekty stwierdzono również u myszy z genetycznie uwarunkowaną cukrzycą (ob/ob, db/db) oraz w cukrzycy insulino-niezależnej. Taki efekt działania jest szczególnie interesujący ze względu na różnice w etiologii powstawania tych trzech odmian choroby (cukrzyca insulinozależna, cukrzyca insulinoniezależna oraz cukrzyca uwarunkowana genetycznie) [2,4,32,41,48].

Jedną z licznych nieprawidłowości występujących w cukrzycy jest upośledzenie mechanizmów antyutleniających, co manifestuje się obniżeniem aktywności takich enzymów, jak: peroksydaza glutationu, katalaza, dysmutaza nadtlenkowa Cu-Zn czy dysmutaza nadtlenkowa Mn i GSH. Po kuracji wanadem aktywność większości tych enzymów wzrasta do wartości kontrolnej z wyjątkiem katalazy i GSH. Dla tych dwóch oznaczeń różni autorzy podają różne wyniki [53,56].

Interesujące jest pytanie o toksyczność wanadu, w przypadkach długoterminowego stosowania. W większości przeprowadzonych do tej pory badań, w których wanad był podawany do 5 miesięcy, u gryzoni nie stwierdzono toksycznych ani innych ubocznych skutków [6,8,31–33,35,42,57]. Należy jednak dodać, że istnieją obserwacje świadczące o toksycznym działaniu tego pierwiastka i negatywnych efektach ubocznych [12,13].

## 2.1. MOLEKULARNE ASPEKTY STOSOWANIA WANADU

Mimo dobrze poznanej sekwencji aminokwasów w insulinie (a zatem struktury ligandu) oraz dość dokładnie znanej struktury receptorów tego hormonu w błonie komórkowej, oddziaływanie insuliny z komórką nie jest wyjaśnione do końca.

Wpływa to zatem na niejasny nadal mechanizm działania wanadu, efekt podobny do działania insuliny. W przypadku hormonu niewyjaśniony do końca jest problem, w jaki sposób związanie insuliny powoduje autofosforylację domeny wewnątrzkomórkowej receptora. Prawdopodobnie podjednostki  $\alpha$  pełnią funkcję supresora fosforylacji podjednostek  $\beta$ . Uniemożliwienie fosforylacji przez podanie przeciwciał prze-



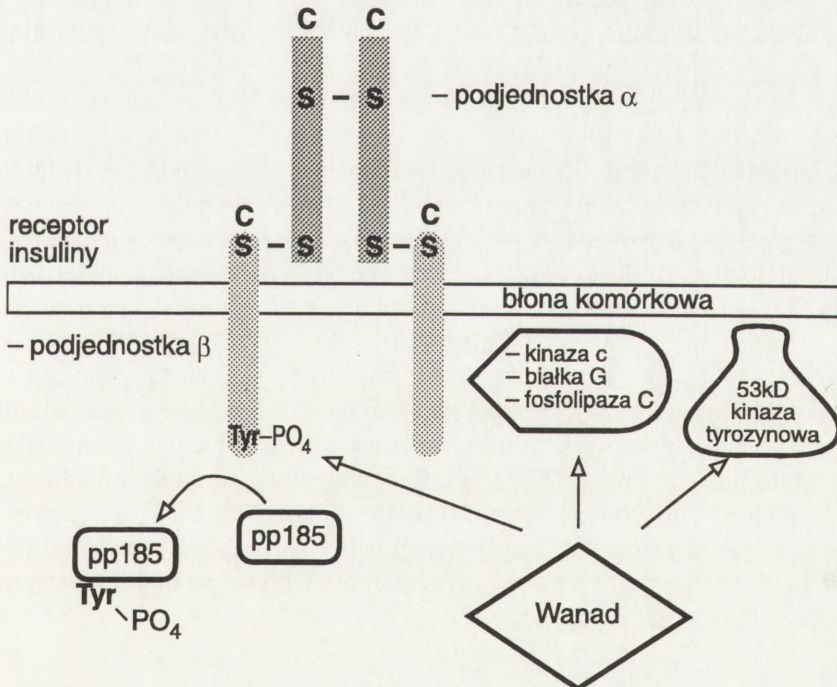
ciwko podjednostkom  $\beta$  upośledza działanie insuliny. Kahn i White [27] sugerują dwa sposoby dalszego przekazywania informacji, które zachodzi po związaniu insuliny z receptorem i autofosforylacji receptora:

1. Kaskada fosforylacji, w której kinaza tyrozynowa receptora insuliny fosforyluje kolejne białko. Bezpośrednim substratem dla tego enzymu jest białko pp 185 (185 kD). Jest to, jak się wydaje, główny, lecz nie jedyny mechanizm działania insuliny.

2. System, w którego skład wchodzi kinazy fosfatydyloinozytolu lub/i fosfolipaz, które są aktywowane w wyniku niekwalencyjnych oddziaływań (fosfolipaza C, białka G, kinaza C).

Fosforylacji ulegają również reszty seryny i treoniny receptora insuliny, które w przeciwieństwie do reszt tyrozyn hamują działanie kinazy tyrozynowej. Ten proces jest stymulowany przez estry forbolu i analogi cAMP, które aktywują kinazę C. Istnieje również doniesienie o aktywacji receptora insuliny bez aktywacji i fosforylacji kinazy tyrozynowej [24,37].

Rysunek 1 przedstawia schematycznie budowę receptora insuliny i prawdopodobne miejsca działania wanadu.



Rys 1. Schemat możliwego oddziaływania wanadu na komórkę przez: aktywację kinazy tyrozynowej receptora insuliny (podjednostki  $\beta$ ), aktywację cytozolowej kinazy tyrozynowej, przez stymulację lub hamowanie innych efektorów wewnątrzkomórkowych; typ oddziaływania zależy od rodzaju tkanki; schemat opracowano na podstawie cytowanej literatury

## 2.2. SPOSÓB DZIAŁANIA WANADU

Ciągle nie jest znany molekularny mechanizm oddziaływania wanadu z komórką. Nie wiadomo, czy ma on charakter oddziaływania na receptor insuliny (A), czy działa niezależnie od tych receptorów (B) czy być może działa równolegle obu drogami, gdyż istnieją fakty potwierdzające jedną, jak i drugą hipotezę.

### A. Fosforylacja $\beta$ podjednostek receptora insuliny

W adipocytach szczura stwierdzono, że wanad aktywuje fosforylację  $\beta$  podjednostek receptorów [11,21,26,62] lub brak tego procesu [36,61,63]. W modelu cukrzycy insulino-niezależnej stosowanie wanadu nie zmienia stanu ufosforylowania  $\beta$  podjednostek w wątrobie, w przeponie myszy [61] i nie powoduje fosforylacji białka pp 185, które jest bezpośrednim substratem dla kinazy tyrozynowej [2,32,61].

Fosforylacja  $\beta$  podjednostek lub jej brak może być spowodowana aktywnością fosfatazy fosfotyrozyny. Według jednych autorów [4,21] nadtlenuki wanadu, jak i wanadylo powodują inaktywację fosfatazy fosfotyrozyny, natomiast według innych są bez wpływu na aktywność tego enzymu [2,32,41,61].

### B. Pozareceptorowy mechanizm działania wanadu

Jest to hipoteza dość często sugerowana przez wielu autorów. Przemawia za nią wpływ wanadu na hepatocyty całkowicie pozbawione receptorów [23], brak fosforylacji substratów kinazy tyrozynowej receptora insuliny i aktywacja kinazy C [32,42].

Ostatnio sugeruje się istnienie kinazy tyrozynowej 53 kD niezależnej od kinazy receptora insuliny, którą może aktywować wanad [47], co w pełni potwierdza tę ostatnią hipotezę. Bardzo trudno jest jednoznacznie stwierdzić, jaki układ efektorowy jest zaangażowany w oddziaływanie z wanadem, gdyż prawdopodobnie jest ich kilka.

Pewną uwagę poświęcono również zależności pomiędzy zwiększeniem aktywności enzymów a poziomem danego mRNA. Taką pozytywną korelację stwierdzono dla amylazy [25] komórek trzustki. Podobną proporcję stwierdzono dla jednego z izoenzymów cytochromu P-450 w wątrobie [15], także dla 6-fosfofruktozo-2 kinazy również w wątrobie. Zwiększona aktywność kluczowych enzymów glikolizy wynika ze wzrostu ich ilości, którą poprzedza zwiększenie ilości odpowiadających mRNA. Dotyczy to takich enzymów, jak: glukokinaza, karboksykinaza fosfoenolopirogronianu czy kinaza pirogronianu [5,22,33,62]. Podobnie pod wpływem wanadu zachodzi wzrost ilości mRNA dla białka transportującego glukozę (GLUT2) do wnętrza hepatocytów, co mogłoby tłumaczyć wpływ na poziom glukozy we krwi [5,60]. Należy jednak dodać, że wg innych autorów [1] wanad nie wpływa na białka transportujące glukozę do adipocytów (GLUT-4).



### 3. ZAKOŃCZENIE

Z przeglądu prac doświadczalnych, które ukazały się w ciągu ostatnich 10 lat, wynika, że pewne pochodne wanadu po przejściu przez stadium prób na zwierzętach, poznaniu zasad ich działania oraz wyeliminowaniu lub zredukowaniu do minimum toksyczności tych pochodnych mogłyby być doskonałym "lekiem" w cukrzycy u ludzi. Sposób podawania wanadu (w formie płynu do picia) pozwoliłby wyeliminować bardzo kłopotliwe, codzienne iniekcje insuliny oraz wykluczyć ryzyko reakcji alergicznych, które zawsze mogą wystąpić przy stosowaniu polipeptydu na ogół obcogatunkowego. Dodatkowo można oczekiwać, że podawanie odpowiedniej pochodnej wanadu byłoby skuteczne w obu formach cukrzycy u ludzi tak insulino-zależnej, jak i insulino-niezależnej.

Z opisanych wyżej powodów wiele uwagi poświęca się w ostatnim piecioleciu badaniom mechanizmów oddziaływania wanadu na poziomie komórkowym. Można stwierdzić z całą pewnością, że będą one zdecydowanie różne od ochronnego działania prostaglandyn tak PGE<sub>2</sub>, jak i 16,16'-dmPGE<sub>2</sub> [28]. Podczas gdy działanie prostaglandyn ma charakter zapobiegawczy wanad, niezależnie od stosowanej pochodnej, działa już po wystąpieniu objawów choroby przez podanie streptozotocyny lub alloxanu zwierzętom lub u zwierząt obarczonych genetycznie cukrzycą. Dlatego jego działanie można określić jako "lecnicze", a nie jako "zapobiegające". Niezbędne są jednak dalsze intensywne badania wynikające z toksyczności pochodnych wanadu oraz jego oddziaływania na organizm zwierzęcy, a tym bardziej ludzki.

### LITERATURA

- [1] BEGUM N, DRAZNIN B. Effect of streptozotocin-induced diabetes on GLUT-4 phosphorylation in rat adipocytes. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1254–1262.
- [2] BLONDEL O, SIMON J, CHEVALIER B, PORTHA B. Impaired insulin action but normal insulin receptor activity in diabetic rat liver: effect on vanadate. *Am J Physiol* 1990; **258**: E459–467.
- [3] BOLLENM, MIRALPEIX M, VENTRA F, TOTH B, BARTRONS R. Oral administration of vanadate to streptozotocin-diabetic rats restores the glucose-induced activation of liver glycogen synthase. *Biochem J* 1990; **267**: 269–271.
- [4] BRICHARD SM, BAILEY CJ, HENQUIN JC. Marked improvement of glucose homeostasis in diabetic ob/ob mice given oral vanadate. *Diabetes* 1990; **39**: 1326–1332.
- [5] BRICHARD SM, DESBUQUOIS B, GIRARD J. Vanadate treatment of diabetic rats reverses the impaired expression of genes involved in hepatic glucose metabolism: effect on glycolytic and gluconeogenic enzymes, and on glucose transporter GLUT-2. *Molec Cell Endocrinol* 1993; **91**: 91–97.
- [6] BRICHARD SM, OKITOLONDA W, HENQUIN JC. Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate treatment in diabetic rats. *Endocrinol* 1988; **123**: 2048–2053.

- [7] BRICHARD SM, ONGEMBA LN, KOLANOWSKI J, HENQUIN JC. The influence of vanadate on insulin counter-regulatory hormones in obese fa/fa rats. *J Endocrinol* 1991; **131**: 185–191.
- [8] CAM MC, PEDERSON RA, BROWNSEY RW, McNEIL JH. Long-term effectiveness of oral vanadyl sulphate in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1993; **36**: 218–224.
- [9] CANTLEY LC, jr, AISEN P. The fate of cytoplasmic vanadium. *J Biol Chem* 1979; **254**: 1781–1784.
- [10] CANTLEY LC jr, JOSEPGSON L, WARNER R, YANAGISAWA M, LECHENE C, GUIDOTTI G. Vanadate is a potent (Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP-derived from muscle. *J Biol Chem* 1977; **252**: 7421–7423.
- [11] CORDERA R, ANDRAGHETTI G, DeFRONZO RA, ROSSETTI L. Effect of in vivo vanadate treatment on insulin receptor tyrosine kinase activity in partially pancrea tectomized diabetic rats. *Endocrinology* 1990; **126**: 2177–2183.
- [12] DOMINGO JL, GOMEZ M, LLOBET JM, CORBELLA J, KEEN CL. Improvement of glucose homeostasis by oral vanadyl treatment in diabetic rats is accompanied by negative side effects. *PharmaToxic* 1991; **68**: 249–253.
- [13] DOMINGO JL, GOMEZ M, LLOBET JM, CORBELLA J, KEEN CL. Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology* 1991; **66**: 279–287.
- [14] DOMINGO JL, SANCHEZ DJ, GOMEZ M, LLOBET JM, CORBELLA J. Administration of vanadyl sulphate by gavage does not normalize blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1992; **75**: 369–372.
- [15] DONAHUE BS, MORGAN ET. Effects of vanadate on hepatic cytochrome P-450 expression in streptozotocin-diabetic rats. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*. 1990; **18**: 519–526.
- [16] DUBYAK GR, KLEINZELLER A. The insulin-mimetic effect of vanadate in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 1980; **255**: 5306–5312.
- [17] DUCKWORTH WC, SOLOMON S, LIEPNIKES J, HAMEL FG, HAND S, PEAVY DE. Insulin-like effects of vanadate in Isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 1988; **122**: 2285–2289.
- [18] ERIKSSON JW, LONNROTH P, SMITH U. Vanadate increases cell surface insulin binding and improves insulin sensitivity in both norml and insulin-resistand rat adipocytes. *Diabetologia* 1992; **35**: 510–516.
- [19] ERIKSSON JW, LONNROTH P, SMITH U. Insulin can rapidly increase cell surface insulin binding capacity in rat adipocytes. *Diabetes* 1992; **41**: 707–714.
- [20] FANTUS G, AHMAD F, DERAGON G. Vanadate augments insulin binding and prolongs insulin action in rat adipocytes. *Endocrinology* 1990; **127**: 2719–2725.
- [21] FANTUS G, KADOTA S, DERAGON G, FOSTER B, POSNER B. Pervanadate [peroxide(s) of vanadate] mimics insulin action in rat adipocyt via activation of insulin receptor tyrosine kinase. *Biochem* 1989; **28**: 8864–8871.
- [22] GIL J, MIRALPEIX M, CARRERAS J, BARTRONS R. Insulin-like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose bisphosphate levels in the liver of diabetic rats. *J Biol Chem* 1988; **263**: 1868–1871.
- [23] GREEN A. The insulin-like effect of sodium vanadate on adipocyte glucose transport is mediated at a post-insulin-receptor level. *Biochem J* 1986; **238**: 663–669.
- [24] HAWLEY DM, MADDUX BA, PATEL RG, WONG KY, MAMULA PW, FIRESTONE GL, BRUNETTI A, VERSPOHL E, GOLDFINE ID. Insulin receptor monoclonal antibodies that mimic insulin action without activating tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1989; **264**: 2438–2444.
- [25] JOHNSON TM, MEISLER MH, BENNETT MI, WILLSKY GR. Vanadate induction of pancreatic amylase mRNA in diabetic rats. *Diabetes* 1990; **39**: 757–759.



- [26] KADOTA S, FANTUS G, DERAGON G, GUYDA HJ, POSNER BI. Stimulation of insulin-like growth factor II receptor binding and insulin receptor kinase activity in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8252–8256.
- [27] KAHN CR, WHITE MF. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest* 1988; **82**: 1151–1156.
- [28] KORDOWIAK AM, TRZOS R. Cytoprotekcyjne działanie prostaglandyn. *Post Biol Kom* 1994; **3**: 275–291.
- [29] LEVY E, BENDAYAN M. Lipoprotein lipase in experimental diabetic rats: beneficial effect of vanadate treatment. *Diabete et Metabolisme* 1991; **17**: 44–48.
- [30] LOHR JW, BENNETT MI, POCHAL MA, McREYNOLDS J, ACARA C, WILLISKY GR. Effect of vanadate on renal hypertrophy and sorbitol accumulation in streptozotocin induced diabetes in rats. *Res Comm in Chem Pathol Pharmacol* 1991; **72**: 191–202.
- [31] MEYEROVITCH J, FARFEL Z, SACK J, SCHECHTER Y. Administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. *J Biol Chem* 1987; **262**: 6658–6662.
- [32] MEYEROVITCH J, ROTHENBERG P, SCHECHTER Y, BONNER-WEIR S, KAHN CR. Vanadate normalizes hyperglycemia in two mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1286–1294.
- [33] McNEILL JH, YUEN VG, HOVEYDA HR, ORVIG C. Bis(maltolato) oxovanadium (IV) is a potent insulin mimic. *J Med Chem* 1992; **35**: 1489–491.
- [34] MIRALPEIX M, CARBALLO E, BARTRONS R, CREPIN K, HUE L, ROUSSEAU GG. Oral administration of vanadate to diabetic rats restores liver 6-phosphofructo-2-kinase content and mRNA. *Diabetologia* 1992; **35**: 243–248.
- [35] MONGOLD JJ, CROS GH, VIAN L, TEP A, RAMANDHAM S, SIOU G, DIAZ J, McNEILL JH, SERRANO JJ. Toxicological aspects of vanadyl sulphate on diabetic rats: effects on vanadium levels and pancreatic B-cell morphology. *Pharmacol Toxicol* 1990; **67**: 192–198.
- [36] MOONEY RA, BORDWELL KL, LUHOWSKYJS, CASNELLIE JE. The insulin-like effect of vanadate on lipolysis in rat adipocytes is not accompanied by an insulin-like effect on tyrosine phosphorylation. *Endocrinology* 1989; **124**: 422–429.
- [37] MORRISON BD, PESSIN JE. Insulin stimulation of the insulin receptor kinase can occur in the complete absence of  $\beta$  subunit autophosphorylation. *J Biol Chem* 1987; **262**: 2861–2868.
- [38] NAKAZAWA A, IGARASHI K, TANI N, MOMOTSU T, ITO S, SHIBATA A. Effect of vanadate on renal function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Diabet Complicat* 1991; **5**: 179–180.
- [39] OGURA Y, SUZUKI T, YAMAMOTO Y, OGURA M. Effect of vanadate on the metabolism of bile acids in diabetic rats. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991; **372**: 345–349.
- [40] PEDERSON RA, RAMANADHAM S, BUCHAN AM, McNEILL JH. Long term effects of vanadyl treatment on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 1989; **38**: 1390–1395.
- [41] PUGAZHENTHI S, ANGEL JF, KHANDELWAL RL. Long-term effects of vanadate treatment on glycogen metabolizing and lipogenic enzymes of liver in genetically diabetic (db/db) mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 1991; **40**: 941–946.
- [42] PUGAZHENTHI S, KHANDELWAL RL, ANGEL JF. Insulin-like effect of vanadate on malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1083**: 310–312.
- [43] PUGAZHENTHI S, KHANDELWAL RL. Insulinlike effects of vanadate on hepatic glycogen metabolism in nondiabetic and streptozotocin-induced rats. *Diabetes* 1990; **39**: 821–827.
- [44] PUGAZHENTHI S, MANTHA SV, KHANDELWAL RL. Decrease of liver protein kinase C in streptozotocin-induced diabetic rats and restoration by vanadate treatment. *Biochem Int* 1990; **21**: 651–657.

- [45] RAMANADHAM S, BROWNSEY RW, CROS GH, MONGOLD JJ, McNEILL JH. Sustained prevention of myocardial and metabolic abnormalities in diabetic rats following withdrawal from oral vanadyl treatment. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 1989; **38**: 1022–1028.
- [46] RAMANADHAM S, BROWNSEY RW, CROS GH, MONGOLD JJ, McNEILL JH. Oral vanadyl sulphate in treatment of diabetic mellitus in rats. *Am J Physiol* 1989; **257**: H904–H911.
- [47] ROBERTSON RP, KLEIN DJ. Treatment of diabetes mellitus. *Diabetol* 1992; **35**: S8–S17.
- [48] ROSETTI L, LAUGLIN MR. Correction of chronic hyperglycemia with vanadate, but not with phlorizin, normalizes in vivo glycogen repletion and in vitro glycogen synthase activity in diabetic skeletal muscle. *J Clin Invest* 1989; **84**: 892–899.
- [49] SAKURAI H, SHIMOMURA S, FUKUZAWA K, ISHIZU K. Detection of oxovanadium (VI) and characterization of its ligand environment in subcellular fraction of the liver of rats treated with pentavalent vanadium. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; **96**: 293–298.
- [50] SAKURAI H, TSUCHIYA K, NUKATSUKA M, SOFUE M, KAWADA J. Insuline-like effect of vanadyl ion on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol* 1990; **126**: 451–459.
- [51] SAXENA AK, SRIVASTAVA P, KALE RK, BARQUER NZ. Effect of vanadate administration on polyol pathway in diabetic rat kidney. *Biochem Int* 1992; **26**: 59–68.
- [52] SAXENA AK, SRIVASTAVA P, KALERK, BARQUER NZ. Effect of vanadate on glycolytic enzymes and malic enzymes in insulin-dependent and -independent tissues of diabetic rats. *Europ J Pharmacol* 1992; **216**: 123–126.
- [53] SAXENA AK, SRIVASTAVA P, KALE RK, BARQUER NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**: 539–542.
- [54] SEKAR N, GOVINDASAMY S. Effect of vanadate on plasma lipoprotein profiles in experimental diabetic rats. *Biochem Int* 1991; **23**: 935–940.
- [55] SEKAR N, GOVINDASAMY S. Insulin mimetic role of vanadate on plasma membrane insulin-receptors. *Biochem Int* 1991; **23**: 461–466.
- [56] SEKAR N, KANTHASAMAY A, WILLIAM S, BALASUBRAMANYIAN N. Antioxidant effect of vanadate on experimental diabetic rats. *Acta Diabetol Lat* 1990; **27**: 285–293.
- [57] SHECHTER Y. Insulin-mimetic effect of vanadate. Possible Implications for future treatment of diabetes. *Diabetes* 1990; **39**: 1–5.
- [58] SHECHTER Y, KARLISH SJD. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions. *Nature* 1980; **284**: 556–558.
- [59] SOCHOR M, KUNJARA S, ALI M, McLEAN P. Vanadate treatment increases the activity of glycolytic enzymes and raises fructose 2,6-bisphosphate concentration in hearts from diabetic rats. *Biochem Int* 1992; **28**: 525–531.
- [60] STROUT HV, VICARIO PP, BISWAS C, SAPERSTEIN R, BRADY EJ, PILCH PF, BERGER J. Vanadate treatment of streptozotocin diabetic rats restores expression of the insulin-responsive glucose transporter in skeletal muscle. *Endocrinology* 1990; **126**: 2728–2732.
- [61] STROUT HV, VICARIO PP, SAPERSTEIN R, SLATER EE. The insulin-mimetic effect of vanadate is not correlated with insulin receptor tyrosine kinase activity nor phosphorylation in mouse diaphragm in vivo. *Endocrinology* 1989; **124**: 1918–1924.
- [62] TAMURA S, BROWN TA, WHIPPLE JH, FUJITA-YAMAGUCHI, DUBLER RE, CHEN K, LARNER J. A novel mechanism for the insulin-like effect of vanadate on glycogen synthase in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1984; **259**: 6650–6658.
- [63] VENKATESAN N, AVIDEN A, DAVIDSON MB. Antidiabetic action of vanadyl in rats independent of in vivo insulin-receptor kinase activity. *Diabetes* 1991; **40**: 492–498.

Otrzymano: 16.11.1993 r.

Przyjęto: 20.07.1994 r.

Adres autorów: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3



## GENETYCZNE REGULACJE APOPTOZY, PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓREK\*

### GENE REGULATION OF APOPTOSIS, PROGRAMMED CELL DEATH

Danuta ROŻYNKOWA

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie

*Streszczenie.* W ostatnich latach zaznaczył się znaczący postęp w molekularnych badaniach apoptozy, śmierci programowanej komórek. Przegląd nawiązuje wprawdzie do genów śmierci u *Caenorhabditis elegans*, jednakże omawia dalej głównie te badania *in vitro*, w których zaznaczył się wpływ regulacyjny ekspresji protoonkogenów i genów przeciwnowotworowych na proces apoptozy w komórkach somatycznych ssaków. Podkreślono hamujący apoptozę wpływ rodziny genu *bcl-2*, udział czynników transkrypcji i rolę *p53* w aktywacji apoptozy. Większość badań dotyczyła komórek linii hemo- i limfopoetycznych. Zrozumiałe zainteresowanie budzi postać apoptozy indukowanej w warunkach uszkodzenia komórek czynnikami chemo- i radioterapii onkologicznej. Dlatego zostały przedstawione doświadczenia, w których strategie genowe, m.in. wymuszające stałą ekspresję jednych genów (*bcl-2*) lub powodujące inaktywację innych (*p53*) wpływają decydująco na regulację tej postaci apoptozy. Omówiono zwięźle rolę rodziny białek przezłonowych APO/FAS.

*Słowa kluczowe:* apoptoza, śmierć programowana, geny śmierci *CED*, *bcl-2*, czynniki transkrypcji, *p53*, antygen APO/FAS, protoonkogeny, geny przeciwnowotworowe.

*Summary.* Last years studies brought new information about molecular biology of apoptosis, the programmed cell death. Although this review refers to the cell death genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*, its content however centres predominantly on experimental *in vitro* studies concerning regulatory influences of proto-oncogenes and tumor suppressor genes on apoptosis in mammalian cells cultivated *in vitro*. Suppressor effect of *bcl-2* gene family as well stimulatory effect of *p53* gene on apoptotic cell death and the involvement of transcription factors have been reviewed. Reported investigations were engaged mainly with haemopoiesis- and immune system-derived cells. Natural interest was paid to apoptosis in response to cell damage using non-physiological stimuli some of which

\*Przegląd dotyczy w dużej mierze problematyki finansowanej przez Komitet Badań Naukowych, projekt nr 4 0700 91 01.

are ionising radiation and cancer chemotherapy agents. Experiments were reported which took advantage of gene strategies enforcing constant expression of some genes (*bcl-2*) or leading to inactivation of other (*p53*). The importance of these genes in cell survival or apoptosis has been stressed. Reports on cell surface molecules: APO/FAS antigen and tumor necrosis factor receptor family were included.

*Key words:* apoptosis, cell death genes, programmed cell death, *bcl-2*, *p-53*, transcription factors, APO/FAS antigen, protooncogenes, tumor suppressor genes.

## WSTĘP

Mechanizm i wewnątrzkomórkowe regulacje "programowanej" śmierci komórki są na ogół jeszcze nie wyjaśnione. Śmierć programowana zwana też fizjologiczną lub przenośnie apoptozą (z greckiego: opadanie, np. płatków, kwiatów lub liści) [25] stanowi aktywną samozagładę nadmiernych liczebnie, bezużytecznych i niewłaściwych komórek i jest kluczowym zjawiskiem w tkankach zwierząt w pewnych okresach ich fizjologicznego kształtowania w rozwoju embrionalnym w ontogenezie i organogenezie [48, 70]. Program obumierania komórek w dorosłym ustroju utrzymuje homeostazę tkankową przeciwdziałając niefortunnym rozrostom hiperplastycznym i neoplastycznym, a także zapewniając selekcję komórek o najwłaściwszym repertuarze receptorów w hemopoëzie i układzie odpornościowym [2, 63, 64]. Apoptoza jest przeciwieństwem mitozy, symbolu proliferacji [69].

Jak podkreślili w swoich opisach apoptozy Kerr, Wyllie i Currie [25, 69, 70], cechy cytologiczne śmierci fizjologicznej różnią się od martwicy, czyli śmierci patologicznej, w której dochodzi do obrzmienia, utraty ciągłości błony plazmatycznej i przedostawania się zawartości komórki do przestrzeni pozakomórkowej z wyzwoleniem odpowiedzi zapalnej. W proces martwicy komórki wciągnięte są wszystkie organele cytoplazmatyczne, podczas gdy obraz jądra nie wskazuje początkowo na uchwytnie odchylenia. Natomiast w fizjologicznej śmierci komórki w pierwszym etapie jądro obkurcza się, a chromatyna zagęszcza, dochodzi do jej fragmentacji i degradacji DNA do fragmentów nukleosomowych, porównywalnych w obrazie elektroforetycznym do "drabinki" DNA [69]. Obkurczeniu błony plazmatycznej mogą towarzyszyć niewielkie uwypuklenia (ang. *blebbing*) przy jej powierzchni. W drugim etapie ciała apoptotyczne, otoczone błoną komórkową i zawierające fragmenty jądra oraz dobrze zachowane organele komórkowe ulegają szybko fagocytozie przez monocyty i makrofagi, rozpoznające ginące komórki za pośrednictwem m.in. receptora vitronektyny [53].

Nie dochodzi do procesu zapalnego. Ta normalna śmierć komórek zazwyczaj uchodzi obserwacji histologicznej, chyba że jest uwikłana w procesy inwolucji i zaniku różnych populacji komórkowych tkanek i narządów.



Zjawiska apoptozy rozgrywają się w obecności wewnątrzkomórkowych procesów biosyntetycznych, co wskazuje, że w ginącej komórce aktywna jest transkrypcja i translacja [26,54]. Usiłowano wyróżnić wczesne markery apoptozy:

- endonukleazę błony okołojądrowej zależną od kationów dwuwartościowych [52, 61, 69] i uruchamianą przez nieznaną regulator;
- swoistą wczesną proteolizę polipeptydu pADPR (polimerazy poli ADP rybozy) [23];
- transglutaminazy, wpływające na sieciowanie białek brzeżnej partii cytoplazmy [37] lub szereg wtórnych przekaźników, jak np. C<sub>2</sub> – ceramid z rozpadu sfingomieliny [43].

Badania molekularnych podstaw apoptozy, rozpoczęte w ostatnich latach, są bardzo ciekawe i ogromnie różnorodne.

Co programuje te czynności? Aktualne teorie apoptozy sprowadzają się do założenia, że komórki z natury swej umierają, jeśli nie są pobudzane do przeżycia lub do proliferacji przez sygnały z otaczających komórek [2]. W tym znaczeniu Raff określił kontrolę apoptozy i przeżycia komórek jako lokalną kontrolę środowiskową (ang. *social control*). Przeżycie lub śmierć mogą zależeć od tych samych kontroli, które rządzą proliferacją [19, 48]. Nie dziwi zatem obserwacja, że wrażliwość na apoptozę indukowaną *in vitro* zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego [14].

U wszystkich badanych tkankowców (*Metazoa*) śmierć fizjologiczna powtarza się w czasie i przestrzeni, co dowodzi, że geny warunkujące jej program zostały zachowane w ewolucji [55].

Przedmiotem tego przeglądu jest omówienie udziału genów, których ekspresja uczestniczy w grze molekularnych procesów apoptozy. Samo pojęcie genów śmierci: *ced* (z ang. *cell death*) wywodzi się z badań genetycznych prostszych systemów, takich jak: mały nicien *Caenorhabditis elegans* i niektóre owady [16, 55]. Do tych modeli nawiązały badania regulacji i modulacji śmierci komórek w hodowlach komórek ssaków. Wyniki tych ostatnich wskazują dobitnie na sieć wzajemnych powiązań między genami rozwoju: proto-onkogenami i antyonkogenami. Podział artykułu odpowiada tej kolejności.

## "GENY ŚMIERCI" KOMÓREK

### U *CAENORHABDITIS ELEGANS* I *MANDUCA SEXTA*

Od stadium larwy do dorosłego organizmu nicien *C. elegans* bytuje w glebie jako saprofit. Obiektem badań genetycznych Hengartnera i wsp. [16] były komórki mięśni, neuroblasty i neurony motoryczne. Genami śmierci *ced-3* i *ced-4* określono te geny efektorowe, których mutacje, zidentyfikowane wcześniej przez Ellisa i Horvitz [16] uniemożliwiały realizację "samozagłady", będącej zwykłym losem grupy 131 komó-

rek na 1090 w przebiegu prawidłowego rozwoju larwy tego nicienia. Były to mutacje inaktywujące geny *ced-3* i *ced-4*, których produkty białkowe są potencjalnymi receptorami dla aktywnych kinaz w wewnątrzkomórkowym torze sygnalizacji i wiązania jonów wapnia. W ubiegłym roku Hengartner i wsp. [16] przedstawili nowy gen *ced-9*, jako kandydata regulującego aktywność poprzednich genów na terenie komórek przeznaczonych do utraty drogą apoptozy. Zaobserwowano, że mutacje genu *ced-9* zapewniające jego stałą zwiększoną ekspresję zapobiegają apoptozie. Natomiast w razie mutacji unieczyniających gen *ced-9* komórki giną i w dodatku w wyniku niekontrolowanej aktywności tych genów śmierci dochodzi do dużej śmiertelności embrionów oraz wad rozwoju. W następnych badaniach autorzy udowodnili, że funkcja dzikiego allelu genu regulatorowego *ced-9* polega na blokowaniu i odblokowaniu ekspresji genów efektorowych apoptozy w określonych fazach rozwoju nicienia. Przy włączonej transkrypcji *ced-9* geny efektorowe realizują program śmierci. *Ced-9* byłby więc regulatorem typu podwójnego przełącznika, którego włączenie uniemożliwia samolikwidację komórek, a wyłączenie może manifestować się apoptozą.

Zarówno dominujące, jak recesywne mutacje *ced-9* cechuje efekt matczyzny, co sugeruje, że produkt *ced-9* znajduje się w komórce jajowej. Wypadnięcie funkcji *ced-9* u matki heterozygoty jest widoczne dopiero w drugim pokoleniu w letalnych homozygotycznych komórkach pod względem genu *ced-9*. Hipotetyczna funkcja genu *ced-9* miałaby się sprowadzać do zastąpienia nieobecnego sygnału międzykomórkowego i do supresji programu śmierci komórki. Skutki mutacji trójki genów *ced-9*, *ced-3* i *ced-4* są tak dalece szkodliwe dla rozwoju embrionalnego i dalszej funkcji dorosłych osobników *C. elegans*, że w roli tych genów upatruje się regulacje rozwoju w wymiarach ogólnoustrojowych.

Innym modelem do badań inwolucji komórek w drodze programowanej śmierci są motyle. U motyla nocnego zawisaka (*Mantuca sexta*), którego formy larwalne – gąsienice żerują na liściach tytoniu, badano korelacje między wahaniami poziomu ekdysonu, hormonu przepoczwarczenia a zmianami mRNA w komórkach mięśni larwy w tych segmentach (pierwsze i ostatnie), które znikają w określonych etapach rozwoju. W odróżnieniu od transkryptów stałych, typu podstawowych przemian (*house keeping*), Schwartz i wsp. wykryli zmienną ekspresję 4 typowych transkryptów w toku rozwoju w przemianach tkanki mięśniowej [55]. Autorzy zwracają uwagę na fakt, że jeden z nich koduje ubikwitynę, znajduwaną m. in. w składzie cytoplazmatycznych inkluzji w mózgu w chorobie Alzheimera i innych schorzeniach neurodegeneracyjnych człowieka.

Przechodząc do genetyki komórek somatycznych *in vitro* należy zwrócić uwagę na jeszcze jedno zjawisko, mianowicie opisy apoptozy indukowanej w warunkach nefizjologicznych, czyli w wyniku uszkodzenia komórek. Fizjologiczna indukcja apoptozy polega na dramatycznej zmianie czynników odżywczych, wzrostowych, np. cytokin, hormonów, surowicy w podłożu itp., podczas gdy w doświadczeniach z



uszkodzeniem komórki używa się najczęściej promieniowania jonizującego, glukokortykosterydów, czynników alkilujących i innych substancji chemicznych, stosowanych w terapii onkologicznej. Szerokiego spektrum induktory apoptozy w warunkach patologicznych są stosowane w bardzo małych dawkach, podczas gdy ich kilkakrotne przekroczenie doprowadza komórki do martwicy [67]. W mechanizmie indukcji tego typu apoptozy kryją się rearanżacje i częściowe delecje różnych genów, jak np. po promieniowaniu jonizującym i etopozydzie, inhibitorze topoizomerazy II [4]. Tego typu doświadczenia dominują w części poświęconej roli genu *p53* w doświadczalnej apoptozie *in vitro*.

## HAMOWANIE APOPTOZY: WPŁYW GENU *BCL-2*

Ludzki onkogen *bcl-2* jest w swym działaniu intrygująco podobny do *ced-9* [29]. Jego zwiększona ekspresja zapobiega lub opóźnia wystąpienie śmierci apoptotycznej zarówno w limfocytach, jak komórkach hemopoetycznych [42]. Jego produkt jest wprawdzie znany, ale mechanizm działania ciągle zagadkowy [18]. Dlatego przypominę w skrócie badania tego genu wraz z ostatnimi odkryciami pozostałych członków rodziny *bcl-2*.

Gen *bcl-2* został odkryty, sklonowany i nazwany przez Tsujimoto i Croce (z ang. *B-cell leukemia/lymphoma*) jako część genu fuzyjnego w regionie złamania chromosomu 18q21, którego translokacja do regionu 14q21 stała się cytogenetycznym markerem chłoniaków grudkowych o umiarkowanym stopniu złośliwości nowotworu. Opisaliśmy szczegóły w artykule przeglądowym [27].

Produkt p26-Bcl-2 jest białkiem błonowym, obecnym w wewnętrznej i zewnętrznej błonie mitochondrialnej, a przy wzmożonej ekspresji także w siateczce endoplazmatycznej oraz otoczce jądrowej [18, 21]. Praca Jacobsona i wsp. udowodniła, że p26-Bcl-2 nie spełnia swej roli przez mitochondrialny łańcuch oddechowy [21], ponieważ apoptoza może zostać zahamowana przez wprowadzony konstrukt *bcl-2*, funkcjonujący w linii zmutowanych komórek fibroblastycznych człowieka, których defekt polega na braku mtDNA i mitochondriów.

Pierwszorzędowa struktura aminokwasowa Bcl-2 nie ma homologii ani ze znanymi kinazami białkowymi, ani ze znanymi czynnikami wzrostowymi lub ich receptorami czy z białkami wiążącymi GTP. Ekspresję *bcl-2* obserwuje się w komórkach stymulowanych do proliferacji, np. pobudzonych limfocytów krwi obwodowej, migdałków podniebiennych oraz linii komórkowych głównie limfoblastoidalnych. Początek ekspresji przypada na doświadczalny przełom G0/G1 cyklu komórkowego i osiąga znaczne wartości w pierwszej dobie hodowli [28, 50]. Ostatecznie ocenia się jednak, że p26-Bcl-2 nie jest białkiem cyklu (cykliną), lecz że jego wahania towarzyszą pobudzeniu i proliferacji komórek [49]. Zwiększona i stała ekspresja *bcl-2* jest typowa dla limfocytów B u większości chorych z przewlekłą białaczką limfocytową

i chłoniakami nieziarniczymi [28], nawet bez rearanzacji tego locus genu. Pozwala to przypuszczać, że małe limfocyty białaczkowe we krwi obwodowej tych chorych niekoniecznie przedstawiają populację spoczynkowych komórek nagromadzonych w wyniku bloku różnicowania. Leczenie może być utrudnione faktem stałej zwiększonej ekspresji genu *bcl-2* [30, 51].

Wymuszona wprowadzonym konstruktom stała ekspresja genu *bcl-2* w limfocytach B w sposób wybiórczy przedłuża życie komórek w ośrodkach rozmnażania węzłów *in vivo* [33, 34, 38], przedłuża odpowiedź immunologiczną [41, 60] i umożliwia przeżycie linii hemopoetycznych *in vitro* mimo pozbawienia ich dopływu czynników wzrostowych [65, 66]. Natłok tych informacji jest nieustanny. Dane pochodzą z doświadczeń, w których indukowano stałą nadmierną ekspresję genu *bcl-2* przez wprowadzenie do komórek linii limfoidalnych konstruktów złożonego z genu *bcl-2* i sekwencji wzmacniających (*enhancer*) genu *IgH* imitujących łącznie nadmiernie aktywny gen fuzyjny w ludzkich chłoniakach nieziarniczych. Odwrotny skutek odniósł konstrukt oligonukleotydowy, antysensowy do kodonu inicjacji genu *bcl-2*, wprowadzony do hodowanych komórek linii B-limfoblastycznej Raji z translokacją t [14, 18]. Ustał wzrost komórek i działanie przeciw apoptozie, jednakże tylko w warunkach pożywki o niskiej zawartości surowicy [1].

Transfekcja genu *bcl-2* z wektorem wirusowym zwiększała względną odporność transformowanych komórek limfoidalnych S49,1 i WEHI7,2 na apoptozę mierzoną fragmentacją DNA, indukowaną glikokortykosterydami [39]. Tym samym sposobem modyfikowania genomu udało się znacznie obniżyć skutki narażenia komórek na metotreksat, winkrystynę, arabino-furanozylo-cytozynę i inne antymetabolity [22, 40]. Nietrudno wyobrazić sobie trudności terapii w regresji nowotworów, jeśli zakłócony jest proces apoptozy. Przy odporności na apoptozę komórek układu immunologicznego może rozwinąć się zespół autoimmunologiczny, którego patogenezę sugerują Strasser i wsp. [60] w pracy na myszach transgenicznym. Konstrukt genowy *E $\mu$ -bcl-2/bcl-2* pod kontrolą sekwencji wzmacniających (*enhancer*) locus *IgM*, wprowadzony do linii zarodkowej powoduje, że myszy transgeniczne mają stały duży nadmiar długo żyjących limfocytów B, plazmocytów i wysoki poziom immunoglobulin surowicznych. Immunizowane myszy transgeniczne reagowały wzmożoną i przedłużoną produkcją przeciwciał. Jednakże produkowały one także przeciwciała przeciwko antygenom jąder komórkowych, histonom i podwójnie niciowemu DNA. Zaburzenia w homeostazie tkanki limfoidalnej kończyły się zespołem letalnego autoimmunologicznego kłębkowego zapalenia nerek [60].

Levine i wsp. [32] zajmowali się wpływem *bcl-2* na zmianę litycznego potencjału wirusów w stosunku do komórek gospodarza. Komórki neuroblastomy myszy z transgenem *pZip-bcl-2* przeżywały długotrwałą "produkowaną" infekcję wirusem RNA-SV (wirus Sindbis z rodziny wirusów alfa), podczas gdy kontrolne komórki ulegały po zakażeniu lizie [32].



Podobnie w neuronach postmitotycznych ma miejsce produktywna infekcja SV. Powstało pytanie, czy komórkowy onkogen *bcl-2* blokuje programowaną śmierć neuronów [32]. Odpowiada na to częściowo praca I. Garcia i wsp. którzy skonstruowali jeszcze inny wektor ekspresji: EB-2, składający się z sekwencji DNA flankujących miejsce promotora genu enolazy neurospecyficznej i połączonego z nim DNA kodującym ludzki *bcl-2* [12]. Drogą mikroiniekcji wprowadzono ten konstrukt do jąder neuronów współczulnych szczura hodowanych *in vitro*. Neurony przeżyły dzięki temu konstruktowi dalszych 10 dni w hodowli bez dodatku czynnika wzrostowego NGF, nie straciwszy nawet receptorów NGF. Nie można wykluczyć, że *bcl-2* może być znaczącym mediatorem wpływu czynników neurotropowych na przeżycie neuronów.

Dalszy ciąg badań dotyczących *bcl-2* nabiera wymiarów rewelacji. Publikacje tegoroczne w *Cell* [7, 46] donoszą o odkryciu dalszych członków rodziny *bcl-2* i proponują zmiany w umiejscowieniu produktów genowych w tkankach, które są poddane szybkiej fizjologicznej wymianie przez apoptozę (np. limfoidalna) w odróżnieniu od tych tkanek, których przeżycie po ostatniej mitozie jest bardzo długie, np. mózg i inne komórki neuronalne. Najprawdopodobniej białka *bcl-2* funkcjonują jako człony wieloskładowego kompleksu i ta okoliczność utrudniała dotychczas jednoznaczną ocenę ich roli. Poniżej w skrócie metody i wyniki.

Jedna grupa (Korsmayera w Waszyngtonie) [7] przy pomocy sondy mysiego cDNA, w dużej mierze homologicznego z ludzkim genem *bcl-2*, przystąpiła do hybrydyzacji molekularnej w warunkach niezbyt rygorystycznych (*low stringency conditions*), aby zidentyfikować spokrewnione struktury genowe w tkance limfoidalnej kurcząt: grasicy i torebce Fabrycjusza. Znaleziony hybrydujący DNA nazwano *bcl-X*. Koduje on białko o zgodności 44% sekwencji aminokwasowej z *bcl-2* człowieka i myszy. Analiza genomu metodą *Southern blot* potwierdziła odrębność genów *bcl-2* i *bcl-x*. Gen *bcl-x* kurczęcia był następnie użyty do wyszukania odpowiednika w bibliotekach genowych człowieka. Sklonowano homologiczne cDNA i wyodrębniono dwa oddzielne typy, mianowicie *bcl-x<sub>L</sub>* (*large*), kodujący 233 aminokwasy oraz mniejszy *bcl-x<sub>S</sub>* (*small*) kodujący 170 aminokwasów. Pierwszy odnaleziono tylko w dojrzałych strukturach tkankowych, głównie tkance nerwowej. Zawiera on domeny w dużej mierze homologiczne z domenami w Bcl-2. Drugie białko Bcl-x<sub>S</sub> jest mniej podobne do poprzednich, przy czym transkrypt mRNA cechuje duża delecja obejmująca odpowiednio 64 aminokwasy. Ten fragment, jak porównywali autorzy, jest ewolucyjnie zachowany w pozostałych członkach rodziny *bcl*. Główną lokalizacją tego białka jest grasica.

Druga grupa (Nuneza w Chicago) [46], posługując się metodą immunoprecypitacji białka wyznakowanego metioniną <sup>35</sup>S i analizy białek metodą *Western blotting* wykryła w ludzkich i mysich komórkach limfoidalnych białko o masie 21 kDa, strącające się razem z Bcl-2. Po elektroforezie i elektroblottingu do błony poliwinylidwuchlorkowej określono sekwencje aminokwasowe tego białka, które nazwano

p21-BAX (z ang. *Bcl-2 associated protein x*). Sklonowano cDNA *bax*, zwielokrotniono je *in vitro* przy pomocy PCR i znowu po przeszukaniu w ludzkiej bibliotece genowej znaleziono jego odpowiednik, m.in. w linii komórkowej Namalva. Otwarta ramka odczytu ludzkiego i mysiego genu *bax* ma 5766 par zasad w 90% identycznych. Białko BAX ma 7 reszt seryny i treoniny, potencjalnych miejsc fosforylacji. Domena C terminalna BAX jest częścią przezbłonową tego białka. Informacja o nim znajduje się na odcinku 4,5 tysięcy par zasad w 6 egzonach genu *bax*. Bax jest homodimerem i tworzy heterodimery z Bcl-2. Białko BAX nie jest ograniczone do tkanki limfoidalnej, znajduje się w mózgu, płucach, żołądku, nerce, grasicy, węzłach chłonnych, szpiku, śledzionie, sercu, mięśniach gładkich i trzustce.

Duże zaskoczenie przyniosły badania wpływu *bcl-2* i *bax*, *bcl-2* i *bcl-x* (w wersji L i S) w liniach komórkowych. Autorzy używali do tych badań hodowli linii komórkowych zależnych od interleukiny 3. Komórki te umierają z objawami apoptozy po przerwaniu dodatku tej cytokiny do hodowli. Wymuszona ekspresja badanych genów była spowodowana przez wprowadzenie ich konstruktów osobno lub razem. Jedna linia – RL-7 była wyprowadzona od pacjenta z chłoniakiem, a druga z mysiej białaczki limfoblastycznej FL5,12. Stabilność transfekcji została potwierdzona badaniem mRNA *bcl* metodą *Northern blot*. Konstrukt *bcl-2* zapewnił przeżycie komórek pozbawionych interleukiny-3. Podobną odporność na samozagładę pomimo braku interleukiny-3 wykazały komórki transfekowane *bcl-xL*. Konstrukt *bcl-xS*, podobnie jak *bax* przyspieszyły program śmierci komórek pozbawionych IL-3. Stosunek białka BAX do Bcl-2 był decydujący i krytyczny dla wyników apoptozy.

Dynamiczna interakcja członków rodziny *bcl* przywodzi na myśl interakcję wewnątrz rodziny zasadowych białek Myc, czynników transkrypcyjnych o strukturze *helix-loop-helix*. Ostateczna aktywność transkrypcyjna Myc też zależy od kompleksu Myc/Max [7]. Konkurencyjna dimeryzacja między podobnymi białkami jest coraz częściej spotykana jako mechanizm regulowania funkcji komórkowych. Myślę więc, że identyfikacja białek, zdolnych do swobodnego wiązania się z białkiem Bcl-2, mogłaby pomóc w wyjaśnieniu mechanizmu, przez który *bcl-2* reguluje apoptozę.

## AKTYWACJA APOPTOZY: UDZIAŁ CZYNNIKÓW TRANSKRYPCJI I ROLA *p53*

Produkty protoonkogenów były badane dotychczas głównie w procesach polifekcji i różnicowania [19]. W ostatnim czasie ukazały się prace wskazujące na znaczenie czynników transkrypcji w apoptozie. Chodzi przede wszystkim o produkty protoonkogeny *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* i genów przeciwnowotworowych *rb* i *p53*. Okazało się, że wszystkie te geny są aktywnie wyrażone tak w komórkach proliferujących, jak w komórkach ulegających apoptozie [56]. Sikora i wsp. wykazali ponadto, że heterodi-



meryczny czynnik transkrypcji AP-1, składający się z produktów protoonkogenów *c-fos* i *c-jun* [3] ma aktywność wiązania DNA zarówno w tymocytach szczura pobudzonych do proliferacji, jak i tych, które zostały "skazane" na apoptozę działaniem deksametazonu [57]. Proces śmierci komórkowej jest więc kontrolowany przez białkowe produkty genów, które są ważne także w nowotworowej transformacji.

Szczególnie pozycja endogennego *c-myc* znana była dotychczas głównie z badań proliferacji, cyklu komórkowego i transformacji nowotworowej [15, 24]. *C-myc* uczestniczy także w apoptozie [70]. Wyjaśnienie tej dwoistej roli zdaje się wynikać z poniższych doświadczeń: Bisonette i wsp. [5] posłużyli się komórkami jajnika chomika chińskiego, które w warunkach szoku termicznego reagują obniżeniem ekspresji endogennego *c-myc*. Jeżeli wprowadzono do tej linii komórkowej konstrukt genowy złożony z wielokrotnych kopii *c-myc* oraz regionu promotorowego genów białek szoku termicznego, to w warunkach 45°C nastąpiła znacznie wzmożona ekspresja *c-myc* i śmierć komórek. Do dwóch podlinii takich komórek wprowadzono dodatkowo ludzki gen *bcl-2* z wektorem wirusowym i stałym promotorem. W klonach transfekowanych przy stałej ekspresji *bcl-2* utrzymywała się dobra żywotność komórek pomimo wzmożonej ekspresji *c-myc* i realizacji szoku termicznego [5].

Następna praca potwierdza, że *c-myc* może być induktorem apoptozy niezależnie od roli ustalonej w mitogenezie. Fanidi i wsp. [11] wybrali do tych badań linię fibroblastów szczura, które cechują się stałą ekspresją hybrydowego produktu białkowego C-Myc-ER, złożonego z polipeptydu C-Myc i receptora estrogenu. Aktywność C-Myc zaznaczała się tylko w obecności beta-estradiolu w pożywce, podczas gdy brak estradiolu w warunkach bezsurowiczego podłoża zatrzymywał komórki w stanie GO. Dodanie beta estradiolu powodowało nagły wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego białka C-Myc i śmierci przez apoptozę. Powstało pytanie, czy konstrukt genowy *bcl-2* zahamuje apoptozę indukowaną przez *c-myc* i czy wpłynie jednocześnie na aktywność mitotyczną zależną od *c-myc*. Autorzy wyjaśnili, że ekspresja *bcl-2* uchyla apoptozę indukowaną przez ekspresję *c-myc* w fibroblastach szczura, nie wywiera jednakże wpływu hamującego na mitogenną funkcję *c-myc* [11]. Jeżeli więc te same domeny *c-myc* wyrażają się tak we wpływie na proliferację, jak we wpływie na apoptozę, mechanizm działania produktów *bcl-2* i *c-myc* jest przykładem czułego systemu regulacji. Komórkowe rozwiązanie jest prawdopodobnie zależne od innych sygnałów, m.in. od dostępności czynników przeżycia. Wpływ *c-myc* podobnie jak *p53*, jest specyficzny dla typu komórki i bodźca apoptozy i jest porównywany do podwójnego przełącznika kierunku reakcji.

### ZNACZENIE *p53*

Hamowanie apoptozy przez gen *bcl-2* jest realizowane przez wzmożoną ekspresję genu. Odwrotnie się ma sprawa z genem supresorowym *p53*, którego brak uniemożliwia indukcję apoptozy. Innymi słowy eliminacja genu *p53* przez delecję lub jego inaktywacja przez mutację uniemożliwia przebieg apoptozy. Normalny dziki allel *p53*

jest warunkiem realizacji apoptozy w wielu różnych warunkach doświadczalnych [3, 9, 68, 71]. Brak ekspresji genu *p53* zdarza się w nowotworach i białaczkach, co może przyczyniać się do zaburzeń apoptozy w hemopoetycznych komórkach nowotworowych [35, 47].

W linii komórek mielopoetycznych myszy M1 z mutacją, określającą zwiększoną wrażliwość na temperaturę udało się indukować apoptozę dopiero po przywróceniu ekspresji *p53*. Wpływ hamujący apoptozę wywierała interleukina 6, promująca różnicowanie mieloblastów do monocytów [71]. Podobnie do uruchomienia procesu apoptozy limfocytów człowieka, indukowanej promieniowaniem jonizującym uszkadzającym DNA, wymagana była obecność prawidłowego allelu *p53* [36]. Z licznych opracowań poświęconych temu zagadnieniu wynika, że *p53* jest nieodzownym składnikiem w mechanizmie wykonawczym apoptozy jednych komórek, podczas gdy w innych utrzymuje wzrost, stan spoczynku lub pobudza syntezę naprawczą [9, 19, 31].

Clarke i wsp. badali zależność indukcji apoptozy w tymocytach kory grasicy u myszy od stałej ekspresji genu *p53*, wprowadzonego do linii zarodkowej. W tymocytach, pobranych od myszy – homozygot dzikiego allelu *p53* – doszło do apoptozy w wyniku promieniowania jonizującego, glukokortykosterydu metyloprednisolonu, etopozyd i estrów forbolu z jonoforem  $\text{Ca}^{2+}$ . Natomiast w tymocytach pobranych od homozygot delekcji *p53* nie było oznak apoptozy po napromieniowaniu ani po etopozydzie. Apoptoza wystąpiła jednak w doświadczeniach z glukokortykosterydami i zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  aktywacji estrami forbolu. W komórkach pochodzących od heterozygot *p53* efekt był pośredni. Autorzy doszli do przekonania, że *p53* wywiera znaczący i zależny od dawki (*dose dependent*) wpływ na apoptozę, lecz tylko wtedy, gdy czynnik indukcyjny powoduje uszkodzenie nici DNA [9]. Podobne wyniki uzyskali Lowe i wsp. na mysich fibroblastach embrionalnych (MEFs), poddanych działaniu genotoksycznych substancji używanych jako chemioterapeutyki: 5-fluorouracyl, etopozyd adriamycyna i promieniowanie jonizujące. Fibroblasty o homozygotycznym i heterozygotycznym genotypie *p53* sprawdzone pod względem braku ekspresji mRNA-*p53* systematycznie badano i udowodniono, że brak ekspresji *p53* dramatycznie zwiększa odporność komórek na leki i napromieniowanie [35]. W tych ostatnich dwóch pracach do inaktywacji genu *p53* posłużono się strategią doświadczalną celowanego (*targeting*) modyfikowania genomu komórek przez zastąpienie sekwencji genu *p53* od 2.-6. egzonu genem odporności neomycynowej (*neo*). Wyselekcjonowane klony komórek z nieaktywnym genem *p53* były wstrzykiwane do blastocysty pokolenia F<sub>2</sub>. Uzyskano w ten sposób mieszańce w linii zarodkowej. Myszy heterozygotyczne przebyły cykl reprodukcji międzymieszańcowej, a ich potomstwo, sprawdzone na brak lub obecność dzikiego allelu *p53*, było dawcami tymocytów do doświadczeń *in vitro*, podanych tutaj za Clarke i wsp. [9] i Lowe i wsp. [35]. Wskazują one jeszcze raz na fakt, że status genu *p53* może być znaczącym determinantem nieskuteczności terapii przeciwnowotworowej [35], zwłaszcza w tych sytuacjach, gdy bodźce toksyczne w dawkach zbyt niskich dla ogólnej dysfunkcji



metabolicznej komórki mogłyby jednak wzbudzić sygnały inicjujące program śmierci.

Nie znalazłam wyjaśnienia, jak produkt *p53* realizuje apoptozę popromienną. Podobnie brak jest informacji, jak realizuje ochronę apoptozy popromiennej *bcl-2*. Kamesaki i wsp. [22] udowodnili, że *bcl-2* hamuje proces apoptozy w wyniku promieniowania jonizującego na etapie pośrednim pomiędzy złamaniami jedno- i dwuniciowymi DNA a wtórną końcową fragmentacją DNA. Zastosowano wymuszoną ekspresję *bcl-2* przy pomocy konstruktów genowych do komórek mysich CH31 i spodziewano się znaleźć ten etap apoptozy, w którym różnice pomiędzy komórkami transfekowanymi konstruktami *bcl-2* a komórkami rodzicielskimi okazały się znaczące. Jednakże nie było różnic w utworzeniu lub naprawie krzyżowego usieciowania DNA/białko, w liczbie złamań pojedynczych nici DNA ani w liczbie złamań podwójnych nici DNA. Różnice były dopiero we fragmentacji DNA i śmierci komórek [22].

Dotychczasowe postępy w wyjaśnieniu regulacji apoptozy odnoszą się głównie do komórek układu krwiotwórczego. Dla tkanek pochodzenia nabłonkowego – wątroby, gruczołu sutkowego, gruczołu krokowego, endometrium macicy – TGF-beta 1 (*transforming growth factor beta 1*) z nadrodziny receptorów kinaz serynowych przez błonowych jest uważany za negatywny regulator wzrostu. Z badań Burscha wynika, że indukuje on apoptozę w czasie eliminacji hepatocytów w hormonalnej hiperplazji i zmianach preneoplastycznych wątroby [8]. Określenie peptydów TGF-beta 1 metodami immunocytochemicznymi pozwala śledzić ekspresję tego genu w doświadczalnych badaniach uszkodzeń komórek wątrobowych i apoptozie hiperplastycznej wątroby [8].

## RODZINA BIAŁEK PRZEBŁONOWYCH APO/FAS, TNFR I NGFR

Badania jeszcze innej rodziny genów wiążą się z procesem apoptozy, jednak szersze opracowania dotyczą hematologii onkologicznej. Chodzi o antygen APO/FAS i receptory TNF (*tumor necrosis factor*) oraz NGF (*nerve growth factor*), białka przez błonowe o masie ok. 48 kDa.

W latach dziewięćdziesiątych odkryto dwa antygeny powierzchni komórki limfoidalnej, których związanie przez monoklonalne przeciwciała indukuje apoptozę. Pierwsze przeciwciało, nazwane anty Apo-1 zostało wytworzone przeciwko antygenowi ludzkiej linii B-limfoblastycznej SKW6,4. Antygen ten jest wykrywany w aktywowanych limfocytach krwi obwodowej, komórkach ostrych i przewlekłych białaczek T- i B-limfocytowych szeregu guzów litych m.in. glioblastoma [30]. Dodanie przeciwciała anty-APO-1 powodowało całkowitą blokadę proliferacji i indukcję śmierci przez apoptozę. Trauth i wsp. obserwowali także regresję ksenogenicznego przeszczepu

pu ludzkiego chłoniaka u bezwłosej myszy w rezultacie dodania tego przeciwciała [62]. Drugie przeciwciała zostało wytworzone w odpowiedzi na antygen wielkości 200 kDa, nazwany FAS. Ten antygen znaleziono na powierzchni aktywowanych limfocytów szeregu linii hemopoetycznych, łącznie z komórkami prekursorowymi granulocyty, limfoblastów T i fibroblastów [20].

Analiza sekwencji aminokwasowej wskazała na przynależność antygeny FAS do białkowej rodziny receptorów, takich jak TNF-R (receptor czynnika martwicy nowotworów), NGF-R (receptor czynnika wzrostu nerwów) oraz antygen CD40 limfocytów B. Apoptoza komórek z ekspresją antygeny FAS jest dodatkowo wzmożona obecnością interferonu gamma [20]. Białko przezbłonowe FAS wykryto również u myszy. Na jego udział w procesie apoptozy komórek wątrobowych zwraca uwagę praca Ogasawara. Ekspresję mRNA antygeny FAS zanotowano w grasicy, wątrobie, sercu, płucach i jajniku [45].

Oehm i wsp. udowodnili, że te dwa antygeny: FAS i APO-1 są identyczne [44]. Wykazano to na podstawie pełnej długości sekwencji cDNA APO-1 i FAS oraz kolejnych sekwencji aminokwasów APO-1 i FAS [44].

Debatin wykazał, że ekspresja antygeny APO-1 w limfocytach T i B krwi obwodowej człowieka oraz wrażliwość tych komórek na indukcję apoptozy są zależne od stanu aktywacji i różnicowania [10]. Na przykład odporność APO-1 na działanie monoklonalnego przeciwciała może obrócić się we wrażliwość, jeśli zostanie zahamowana biosynteza białka. I na odwrót: można zapobiec apoptozie przez mechanizmy aktywacji limfocytów, np. przez CD3, TCR lub CD40 limfocytów T i B odpowiednio.

Dalszy ciąg prac nad regulacją apoptozy zmierza do możliwości zastosowania indukowanej apoptozy w leczeniu nowotworów.

UWAGA (dodana podczas korekty): W zeszycie Nature z 26 maja br. Hengartner i Horvitz wyjaśnili, że mutacja genu *ced-9* nicienia zapewniająca jego stałą zwiększoną ekspresję polega na prostej substytucji Gly-na-Glu w kodonie 169. Ten kodon genu *ced-9* odpowiada kodonowi 145 ludzkiego genu *bcl-2* w jego ewolucyjnie zachowanej domenie.

Autorzy ci stwierdzili też, że dziki allel ludzkiego genu *bcl-2* może chronić przed apoptozą komórki nicienia z defektem *ced-9*. Obydwa te geny należą do tej samej rodziny [Nature 369: 318–320, 1994].

## LITERATURA

- [1] AIELLO A, DELIA D, FONTANELLA E, LOMBARDI L, MELANI C, COLOMBO MP, PIEROTTI MA. Inhibition of Bcl-2 expression by antisense oligodesoksy-nucleotides: Effect on growth and survival of malignant hemopoietic cell lines. *Cancer Res* 1993; in press
- [2] ALLEN PD, BUSTIN SA, NEWLAND AC. The role the apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Rev* 1993; 7: 63–73.



- [3] ANGEL P, KARIN M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1072**: 129–157.
- [4] BERGER NA, CHATTERJE S, SCHMOTZER JA, HELMS SR. Etoposide (VP-16-213) induced gene alterations: Potential contribution to cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8740–8743.
- [5] BISONETTE RP, ECHEVERRIF, MAHBOUBIA, GREEN DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; **359**: 552–553.
- [6] BLACKWOOD EM, EISENMANN RW. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence DNA-binding complex with Myc. *Science* 1991; **251**: 1211–1217.
- [7] BOISE LH, GONZALEZ-GARCIA M, POSTEMA CE, DING L, LINDSTEN T, TURKA LA, MAO X, NUNEZ G. Bcl-X, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; **74**: 597–608.
- [8] BÜRSCH W, OBERHAMMER F, JIRTLE RL, OSKARI M, SEDIVY R, GRASL-KRAUPP B, PURCHIO AF, SCHULTE-HERMANN R. Transforming growth factor  $\beta$  1 as a signal for induction of cell death by apoptosis. *Br J Cancer* 1993; **67**: 531–536.
- [9] CLARE AR, PURDIE CA, HARRISON DJ, MORRIS RG, BIRD CC, HOOPER ML, WYLLIE AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; **362**: 849–852.
- [10] DEBATIN KM. Induction of apoptosis in lymphoid leukemias: basic principles and therapeutic perspectives. *Ann Hematol (Suppl)* 1993; **67**: A20.
- [11] FANIDI A, HARRINGTON EA, ERAN GI. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogene. *Nature* 1992; **359**: 554–556.
- [12] GARCIA L, MARTINOU I, TSUJIMOTO Y, MARTINOU JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 protooncogene. *Science* 1992; **258**: 302–304.
- [13] GINSBERG M, OWEN M, YANIV M, PIETTE J. Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene. *Oncogene* 1990; **5**: 1285–1290.
- [14] GORCZYCA W, GONG J, ARDELT B, FRAGANOC F, DARŻYŃKIEWICZ Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various tumor agents. *Cancer Res* 1993; **53**: 3186–3192.
- [15] GOWDA SD, KOLAR RD, RAGBY GC jr. Regulation of C-myc expression during growth and differentiation of normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *J Clin Invest* 1986; **77**: 271–278.
- [16] HENGARTNER MO, ELLIS RE, HORVITZ HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced 9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; **356**: 494–498.
- [17] HIBVER U, BENKAMON LE, HENRY M, CAZENAVE PA, SARTHOU P. Signalling of programmed cell death induction in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 2821–2825.
- [18] HOCKENBERRY D, NUNEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORMEYER SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; **348**: 334–336.
- [19] HORST A. Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 3–22.
- [20] ITCH N, YONEHARA S, ISHII A. The polypeptide encoded by the cDNA for the human cell surface antigen FAS can mediate apoptosis. *Cell* 1991; **66**: 233–243.
- [21] JACOBSON MD, BURNE JF, KING MP, MIYASHITA T, REED JC, RAFF MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993; 361–368.
- [22] KAMESAKI S, KAMESAKI H, JÖRGENSEN TJ, TANIZAWA A, POMMIER Y, COSSMAN J. Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase-II induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res* 1993; **53**: 4251–4256.

- [23] KAUFMAN SH, DESNOYERS S, OTTAVIANO Y, DAVIDSON NE, POIRIER GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADPribose)/polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; **53**: 3976–3985.
- [24] KELLY K, COCHRAN BH, STILES CD, LEDER P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 1993; **35**: 603–610.
- [25] KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–257.
- [26] KNOX KA, GORDON J. Protein tyrosine phosphorylation is mandatory for CD40-mediated rescue of germinal center B cells from apoptosis. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 2578–2584.
- [27] KOCKI J, ROŻYŃKOWA D. Gen *bcl-2* w patafizjologii limfocytów B. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 169–182.
- [28] KOCKI J, ROŻYŃKOWA DM, RUPNIEWSKA ZM, WOJCIEROWSKI J. Cell cycle linked expression of the proto-oncogene *Bcl-2*. *Ann Hematol (Suppl)* 1992; A81.
- [29] KORSMEYER SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; **80**: 879–886.
- [30] KRAMMER PH. APO-1 mediated apoptosis in normal and malignant lymphocytes. *Ann Hematol* 1993; **67**(suppl):A69.
- [31] LANE DP. p-53, Guardian of the genome. *Nature* 1992; **358**: 15–16.
- [32] LEVINE B, HUANG Q, ISAACS JT, REED JC, GRIFFIN DE, HARDWICK JM. Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the *bcl-2* cellular oncogene. *Nature* 1993; **361**: 739–742.
- [33] LIU YJ, JOSHUA DE, WILLIAMS GT, SMITH CA, GORDON J, MACLENNAN ICM. Mechanisms of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989; **342**: 929–931.
- [34] LIU YJ, MASON DY, JOHNSON GD, ABBOTT S, CHRISTOFER G, HARDIE DL, GORDON J, MACLENNAN JCM. Germinal center cells express *bcl-2* protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1905–1910.
- [35] LOWE WS, RULEY HE, JACKS T, HOUSMAN DE. p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; **74**: 957–967.
- [36] LOWE SW, SCHMIDT SW, OSBORNE BA, JACKS T. p53 Is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; **362**: 847–852.
- [37] MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M. Nowy aspekt metabolizmu poliamin-posttranslacyjne, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy. *Post Biochem* 1993; **39**: 118–126.
- [38] McDONNELL TJ, DEANE N, PLATT FM, NUNEZ G, JAEGER U, MCKEARN JP, KORSMEYER SJ. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; **57**: 79–83.
- [39] MIYASHITA T, REED JC. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992; **52**: 5407–5411.
- [40] MIYASHITA T, REED JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; **81**: 151–157.
- [41] NUNEZ G, HOCKENBERRY D, McDONNELL TT, SORENSEN CM, KORSMEYER SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 1991; **353**: 71–73.
- [42] NUNEZ G, LONDON L, HOCKENBERRY D, ALEXANDER M, MCKEARN JP, KORSMEYER SJ. Deregulated *bcl-2* gene expression selectively prolongs survival of growth factor deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; **144**: 3602–3605.
- [43] OBEID LM, LINARDIC CM, KAROLAK LA, HANNUN YA. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 1993; **259**: 1769–1771.
- [44] OEHM A, BEHRMANN J, FALK W, PAWLITA M, MAIER G, KLAS C, LI-WEBER M, RICHARDS S, OHEIN J, TRAUTH BC. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell



- surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/ nerve growth factor receptor superfamily. Identity with the Fas Antigen. *J Biol Chem* 1992; **267**: 10709–10715.
- [45] OGASAWARA J, WANATABE-FUKUNAGA R, ADACHI M, MATUZAWA A, KASUGUIT, KITAMURA Y, ITOH N, SUDA T, NAGATA S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; **364**: 806–809.
- [46] OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog: BAX that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; **74**: 609–619.
- [47] PROKOCIMER M, SHAKLAI M, BASSAT B, WOLF D, GOLDFINGER N, ROTTER V. Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; **68**: 113–119.
- [48] RAFF MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; **356**: 397–400.
- [49] REED JC, TANAKA S, CUDDY M. Cell cycle analysis of p26-Bcl-2 protein levels in proliferating lymphoma and leukemia cell lines. *Cancer Res* 1992; **52**: 2802–2805.
- [50] REED JC, TSUIMOTO Y, ALPERS JC, CROCE CM, NOWELL PC. Regulation of the bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science* 1987; **236**: 1295–1299.
- [51] ROBERTSON LE, CHUBB S, MEYN RE, STORY M, FORBI R, HILTELMAN WN, PLUNKETT W. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- $\beta$ -D arabinosyl-2-fluorocadenine. *Blood* 1993; **81**: 143–150.
- [52] RZEPECKI R, SZMIDZIŃSKI R, SZOPA J. Rola endogennych endonukleaz w programowanym obumieraniu komórek. *Post Biochem* 1991; **37**: 18–23.
- [53] SAVILL J, DRANSFIELS I, HOGG N, HASLETT C. Vitronectin receptormediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990; **343**: 170–173.
- [54] SEN S, D'INCALCIM. Apoptosis. Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *Fed Eur Biochem Soc* 1992; **307**: 122–127.
- [55] SCHWARZ LM, KOSZ L, KAY BK. Gene activation is required for developmentally programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6594–6598.
- [56] SIKORA E. Transcription factors in cellular senescence and death. *Acta Biochem Pol* 1993; **40**: 389–394.
- [57] SIKORA E, GRASSILLI E, BELLESIA E, TORINO L, FRANCESCHI C. Studies of the relationship between cell proliferation and cell death. III. AP-1 DNA binding activity during Concanavalin A-induced proliferation or dexamethasone induced apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **192**: 386–391.
- [58] STRASSER A, HARRIS AW, BATH ML, CORY S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 1990; **348**: 331–333.
- [59] STRASSER A, HARRIS AW, CORY S. The role of oncogenes and tumour suppressor genes in cell survival and neoplastic transformation. *Ann Hematol* 1993; **67** (Suppl): A123.
- [60] STRASSER A, WHITTINGHAMS S, VAUXDL, BATH ML, ADAMS JM, CORY S, HARRIS AW. Enforced CL-2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8661–8665.
- [61] SZOPA J, ADAMIEC R. Is the 65 kDa protein a direct signal the nuclear matrix, starting the apoptotic cascade? *Acta Biochim Polon* 1993; **40**: 209–212.
- [62] TRAUTH BC, KLAS C, PETERS AMJ, MATZKU S, MÖLLER P, FALK W, DEBATIN KM, KRAMMER PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; **245**: 301–304.
- [63] TSUBATA T, WU J, HONJO T. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 1993; **364**: 645–648.
- [64] UEHARA T, MIYAWAKI T, OHTA K, TAMARU Y, YOKOI T, NAKAMURA S, TANIGUCHI A. Apoptotic cell death of primed CD45RO+ T lymphocytes in Epsteinbarr Virus induced infectious mononucleosis. *Blood* 1992; **80**: 452–458.
- [65] VAUX DL, CORY S, ADAMS S. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; **335**: 440–444.

- [66] WILLIAMS GT, SMITH CA, SPOONER E, DEXTER TM, TAYLOR DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990; **343**: 76–79.
- [67] WILLIAMS GT, SMITH C. Molecular regulation of apoptosis. Genetic control of cell death. *Cell* 1993; **74**: 777–779.
- [68] WOLF D, ROTTER V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 790–794.
- [69] WYLLIE AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; **284**: 555–556.
- [70] WYLLIE AH. Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *J Pathol* 1987; **153**: 313–321.
- [71] YONISH-ROUACH E, RESNITZKY D, LOTEM J, SACHS L, KIMCHI A, OVEN M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemia cell that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; **352**: 345–347.

*Otrzymano:* 16.12.1993 r.

*Przyjęto:* 20.07.1994 r.

*Adres autora:* 20-090 Lublin, ul. Radziwiłłowska 11



# TRANSPORT JONÓW WAPNIA PRZEZ BŁONY EUKARIOTYCZNE: I. KANAŁY WAPNIOWE\*

## CALCIUM IONS TRANSPORT THROUGH EUKARYOTIC MEMBRANES. I. CALCIUM CHANNELS

Andrzej TRETYN\*\*

Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin Instytutu Biologii  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

*Streszczenie.* W komórkach eukariotycznych funkcjonują mechanizmy precyzyjnie kontrolujące cytoplazmatyczny poziom wolnego wapnia ( $[Ca^{2+}]_c$ ). Towarzyszący indukcji komórki wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  następuje w wyniku aktywacji zlokalizowanych w błonie komórkowej i w błonach różnych struktur wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych. Po okresie pobudzenia obserwuje się spadek poziomu jonów wapnia w cytoplazmie podstawowej wynikający z aktywacji pomp i wymienniczy wapniowych, które usuwają  $Ca^{2+}$  na zewnątrz komórki lub do wnętrza różnych organelli. W prezentowanej pracy omówione zostały poglądy na temat budowy, mechanizmu działania i kontroli kanałów wapniowych funkcjonujących w błonach komórek zwierzęcych i roślinnych.

*Summary.* In eukaryotic cells, mechanisms which precisely control the concentration of free cytoplasmic calcium ( $[Ca^{2+}]_c$ ) have been found. It has been shown that many stimuli induce increases in  $[Ca^{2+}]_c$  as a result of the activation of calcium channels located both in the plasma membrane and the endomembranes. After stimulation of a cell, a rapid decrease in  $[Ca^{2+}]_c$  is observed as a result of calcium pump and calcium exchanger activation. Both these transport mechanisms are utilized to remove calcium ions from the cytoplasm to the outside of the cell or into different intracellular structures. In this paper, the present status of our knowledge concerning the structure, mechanism of action and control of calcium channels, both in animal and plant cells, are presented.

\*Praca powstała w trakcie realizacji Grantu 6-6068-92-03 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (KBN).

\*\*Obecny adres: Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Frontier Research Program, Laboratory for Photoperception and Signal Transduction, Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-01, Japan.

## WSTĘP

Jony wapniowe odgrywają kluczową rolę w reakcjach komórek eukariotycznych na bodźce zewnętrzne. Wykazano, że hormony zwierzęce [1, 10, 58] i roślinne [14], światło [41, 54] oraz inne czynniki środowiskowe [14, 58] stymulują szybki, przejściowy wzrost wolnego, cytoplazmatycznego wapnia ( $[Ca^{2+}]_c$ ). Po okresie indukcji komórki obserwuje się spadek  $[Ca^{2+}]_c$  do wartości wyjściowej i jego stabilizację. Podwyższenie  $[Ca^{2+}]_c$  spowodowane jest wzrostem przepuszczalności błony komórkowej dla jonów wapnia oraz ich uwalniania z wnętrza pewnych przedziałów cytoplazmatycznych. Obydwa wymienione procesy zachodzą w wyniku stymulacji tzw. kanałów wapniowych. Podwyższeniu  $[Ca^{2+}]_c$  towarzyszy aktywacja różnych procesów wewnątrzkomórkowych, prowadzących do powstania odpowiedzi komórkowej. Na rysunku 1 przedstawiono struktury uczestniczące w regulacji  $[Ca^{2+}]_c$  oraz ogólny mechanizm działania jonów wapnia w komórce eukariotycznej.

U roślin mechanizm kontroli  $[Ca^{2+}]_c$  jest podobny jak u zwierząt. Jednakże, ze względu na duże różnice strukturalne i funkcjonalne, w komórkach roślinnych funkcjonować mogą dodatkowe, w porównaniu do zwierzęcych, mechanizmy regulacji poziomu wolnego, cytoplazmatycznego wapnia (patrz opis rys. 1).

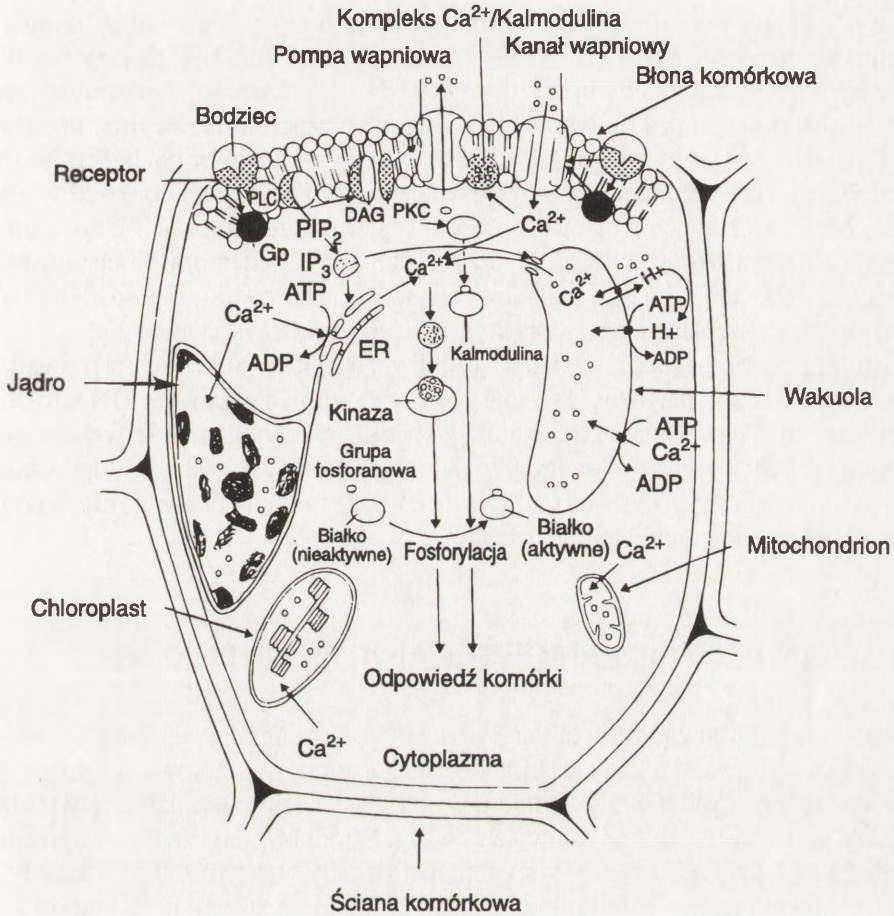
## 1. METODY BADAŃ KANAŁÓW JONOWYCH

Poznanie budowy molekularnej i mechanizmu działania kanałów jonowych stało się możliwe po wprowadzeniu do badań nad nimi wielu różnorodnych metod badawczych. Niektóre z nich, jak np. technika *patch-clamp*, zostały opracowane w celu badania przewodności oraz mechanizmów otwierania się i zamykania indywidualnych kanałów jonowych.

Powszechne użycie "klasycznych" metod elektrofizycznych pozwoliło badać podstawy procesów zachodzących na poziomie błon komórkowych, zwłaszcza dotyczące mechanizmów utrzymywania ich stałego (spoczynkowego) potencjału elektrycznego, jego obniżania (depolaryzacji; np. w czasie generacji tzw. potencjałów czynnościowych), jak i wzrostu (hyperpolaryzacji). Po wprowadzeniu metody *voltage-clamp*, umożliwiającej kontrolę napięcia na całym obszarze błony, poprzez który przepływa prąd, bądź dokonywaniu dowolnych zmian jego wielkości możliwym stało się badanie fizyko-chemicznych parametrów błon, np. transportu jonów. Bardziej precyzyjna od niej, metoda *patch-clamp* (w polskim tłumaczeniu metoda "łatkowa") umożliwia badanie zarówno dużych obszarów błon, jak i niewielkich jej "łatek" zawierających pojedyncze kanały jonowe [37].

Duży postęp w badaniach nad molekularną budową kanałów wapniowych nastąpił po wykryciu, że pewna grupa substancji chemicznych wiąże się z dużym powinowac-





Rys.1. Ogólny schemat ilustrujący mechanizm działania jonów wapnia w komórce eukariotycznej. W kontroli wolnego cytoplazmatycznego wapnia ( $[Ca^{2+}]_c$ ) uczestniczą zlokalizowane w błonie komórkowej (plazmalemie), błonach siateczki śródplazmatycznej ER (zwierzęta) oraz wakuoli (rośliny) kanały wapniowe oraz występujące w plazmalemmie i w błonach ER pompy wapniowe. W usuwaniu  $Ca^{2+}$  z cytoplazmy biorą udział funkcjonujące w plazmalemmie oraz tonoplazmie (rośliny) wymiennicze wapniowe. W regulacji  $[Ca^{2+}]_c$  mogą również uczestniczyć inne organelle, takie jak: jądro, mitochondria i chloroplasty (rośliny). W wyniku przyłączenia agonisty do receptora następuje bezpośrednia (lub pośrednia przez białko G) aktywacja kanałów wapniowych, co prowadzi do wzrostu  $[Ca^{2+}]_c$ . Otwarcie kanału może nastąpić również w wyniku zmian potencjału błonowego. W pewnych przypadkach kompleks agonista-receptor aktywuje białko G, które wpływając na fosfolipazę C (PLC) prowadzi do rozkładu fosfatydyloinozytolu(4,5)bisfosforanu i uwolnienia dwóch wtórnych przekazników informacji: trisfosfoinozytolu ( $IP_3$ ) i diacyloglicerolu (DAG). Pierwszy z wymienionych związków łączących się z występującymi w błonach ER (zwierzęta) lub w tonoplazmie (rośliny) receptorami mobilizuje zgromadzone w nich  $Ca^{2+}$ . Uwalniany do cytoplazmy wapń łączy się z białkami wiążącymi ten kation, np. kalmoduliną lub kinazami białkowymi, które katalizują fosforylację białek docelowych. Kalmodulina oddziałuje na zależne od niej kinazy, co prowadzi do fosforylacji innych typów białek docelowych. Ufosforylowane białka biorą udział w powstaniu odpowiedzi komórkowej (na podstawie [51], zmodyfikowane)

twem z białkami wchodzącymi w skład kanałów jonowych, powodując zmiany ich przepuszczalnych właściwości. Wśród wspomnianych związków najczęściej stosowane były pochodne dwuhydropirydynowe (DHP), wykazujące zarówno antagonistyczne (hamujące; np. nifedypina), jak i agonistyczne (stymulacyjne; np. Bay-K 8644) działanie na przewodność kanałów wapniowych. Również pochodne fenyloalkilaminowe (np. verapamil), benzotiozepanowe (np. diltiazem) oraz pewne jony ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) oddziałując na kanał powodują spadek jego drożności. Użycie znakowanych antagonistów wapnia oraz technik służących badaniom biochemii białek pozwoliło na izolację kanałów wapniowych oraz na opracowanie metod identyfikacji ich składników białkowych podczas kolejnych etapów oczyszczania.

Ostatnio do badań nad molekularną budową kanałów jonowych wprowadzona została inżynieria genetyczna. Izolacja i analiza komplementarnych DNA (cDNA), kodujących białkowe składniki kanałów pozwoliła na określanie pierwszorzędowej struktury ich białkowych składników. Z drugiej strony translacja odpowiednich mRNA, np. w oocytach płazów, umożliwiła badanie funkcji poszczególnych podjednostek kanałów wapniowych (patrz [57]).

## 2. PLAZMALEMOWE KANAŁY WAPNIOWE

Badania nad budową i mechanizmem działania plazmalemowych kanałów wapniowych zapoczątkowane zostały już kilkadziesiąt lat temu i początkowo dotyczyły tylko komórek zwierzęcych [56–57]. Dopiero w połowie lat osiemdziesiątych stwierdzono istnienie podobnych struktur w błonach siateczki śródplazmatycznej/sarkoplazmatycznej (ER/SR)[57]. Pod koniec wspomnianej dekady wykryto również kanały wapniowe funkcjonujące w tonopląście – błonie otaczającej wakuole komórek roślinnych [2–3, 22, 32–33, 40](rys. 1).

### 2.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ZWIERZĘCYCH KANAŁÓW WAPNIOWYCH

Kanały wapniowe umożliwiają bierne poruszanie się  $\text{Ca}^{2+}$  w kierunku zgodnym z gradientem elektrochemicznym dla danego jonu. Choć ich przemieszczanie się przez światło kanału nie wiąże się bezpośrednio z konsumpcją energii, utrzymywanie wspomnianego gradientu możliwe jest w wyniku podtrzymywania pewnych, zależnych od energii procesów metabolicznych, uczestniczących np. w pompowaniu jonów wapnia na zewnątrz komórki i utrzymywaniu stałego potencjału elektrycznego plazmalemy.

Kanał wapniowy zbudowany jest z białka, którego średnica jest przypuszczalnie nieco mniejsza od 5 nm, a światło kanału, w swym najwęższym miejscu, nie przekracza 0,6 nm. Wartość ta jest sześć razy większa od średnicy nieuwodnionego i zbliżona



do wielkości uwodnionego kationu wapniowego. W środowisku pozbawionym  $\text{Ca}^{2+}$  największą cząsteczką, która może przenikać poprzez światło kanału, jest tryetyloamina; TEA [57].

Średnica światła kanału wapniowego jest większa od kanału potasowego i sodowego. W środowisku pozbawionym  $\text{Ca}^{2+}$  omawiany kanał charakteryzuje się małą selektywnością; poprzez jego wnętrze przenikać mogą zarówno drobne związki organiczne, jak i pewne kationy [64]. W obecności  $\text{Ca}^{2+}$  kanał zyskuje swoją selektywność bez względu na występowanie innych jonów w środowisku zewnątrzkomórkowym. Wyniki badań prowadzonych nad przemieszczaniem się  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  poprzez tę strukturę zaprzeczają możliwości funkcjonowania kanału wapniowego jako sita molekularnego. Wykazano, że przenikanie mniejszego po uwodnieniu kationu sodowego jest znacznie powolniejsze niż uwodnionego kationu wapniowego [64].

W ciągu sekundy przez światło kanału przemieszcza się od  $10^6$  do  $10^8$  jonów wapniowych [64]. Szybkość przepływu  $\text{Ca}^{2+}$  przez światło kanału ulega modyfikacji w wyniku działania na nie różnych, farmakologicznie aktywnych substancji. Pewne z nich (tzw. antagoniści wapnia) obniżają prawdopodobieństwo występowania kanałów w konfiguracji otwartej. Z drugiej strony tzw. agoniści wapnia podwyższają prawdopodobieństwo przejścia kanału z konfiguracji zamkniętej do otwartej, przedłużają czas jego otwarcia lub podwyższają ich przewodność właściwą. Tempo przepływu jonów wapnia przez kanał jest ok. 1000 razy (trzy rzędy wielkości) szybsze w porównaniu do tempa transportu tego samego jonu przez pompy i nośniki jonowe i około 11 rzędów wielkości wyższe od tempa dyfuzji tych kationów przez dwuwarstwę lipidową [56]. Ponieważ czas otwarcia kanału jest rzędu milisekund, do uzyskania znaczącego wzrostu cytoplazmatycznego  $[\text{Ca}^{2+}]$  niezbędne jest jednoczesne otwarcie wielu kanałów lub/i ich wielokrotna aktywacja.

#### 2.1.a. KLASYFIKACJA ZWIERZĘCYCH KANAŁÓW WAPNIOWYCH

Ze względu na:

- 1) sposób aktywacji,
- 2) szybkość aktywacji i deaktywacji,
- 3) przepuszczalność dla  $\text{Ca}^{2+}$  (przewodność właściwą),
- 4) wrażliwości na pewnego typu związki chemiczne (farmakologicznie czynne)

oraz

- 5) rozmieszczenie komórkowe i tkankowe

wyróżnia się kilka typów zwierzęcych kanałów wapniowych. Uwzględniając wymienione kryteria można je podzielić na:

- 1) kanały wrażliwe na zmiany potencjałów błonowych (*voltage-operated channels*, VOCs),
- 2) kanały receptorowe (*receptor operated channels*, ROCs),
- 3) kanały zależne od wtórnych przekaźników (*second messenger-operated channels*, SMOCs),

4) kanały wrażliwe na bodźce mechaniczne (*mechanically operated channels*, MOCs)[6, 35, 56].

**Kanały wrażliwe na napięcie (VOC).** Ten typ kanałów otwierany jest w wyniku zmian potencjału błony komórkowej, a ich aktywność modulowana jest przez antagonistów i agonistów  $Ca^{2+}$ , neurotransmitery, białka wiążące GTP (białka G) oraz drugie przekaźniki informacji [56].

Ich obecność stwierdzono w komórkach wszystkich organizmów zwierzęcych i pierwotniaków [35]. Tabela 1 przedstawia ogólną charakterystykę 3 zasadniczych subtypów zależnych od potencjału zwierzęcych kanałów wapniowych. Każdy z nich ma charakterystyczny dla siebie zakres potencjału błonowego, przy którym ulega on aktywacji i deaktywacji.

Pierwszy z wyodrębnionych na tej podstawie rodzaj kanału, określany jako "L" (od *long lasting*), ulega aktywacji przy wysokim potencjale błonowym (dlatego

TABELA 1. Ogólna charakterystyka zależnych od napięcia kanałów wapniowych (VOC) występujących w plazmalemie komórek zwierzęcych (na podstawie [31, 56], zmodyfikowane, patrz również opis w tekście)

Typ	Mechanizm aktywacji	Przewodność właściwa	Modulacja aktywności	Funkcja	Lokalizacja
L	HVA	20–27 pS	Hamowanie przez pochodne DHP (nifedypina), fenylalkilami nowe (vera-pamil) i benzotiazepanowe oraz aktywacja przez Bay-K	Udział w regulacji i powstawaniu skurczów komórek mięśniowych oraz inne	Komórki elektrycznie pobudliwe i wiele typów komórek niepobudliwych
T	LVA	8–9 pS	Mało wrażliwe na pochodne DHP, hamowane przez pochodne fenylalkilaminowe i niskie stężenia $Ni^{2+}$	Regulacja wpływu $Ca^{2+}$ przy negatywnym potencjale błonowym	Wiele typów komórek elektrycznie pobudliwych i niepobudliwych
N	HVA	11–20 pS	Niewrażliwe na pochodne DHP, hamowane przez $\omega$ -konotoksynę	Udział w sekrecji neurotransmiterów	Występowanie ograniczone jedynie do pewnego typu komórek nerwowych
P	HVA	brak danych	Brak wrażliwości na pochodne DHP i $\omega$ -konotoksynę, hamowane przez FTX (patrz tekst)	Udział w uwalnianiu neurotransmiterów	Komórki Purkiniego mózdzku pewne typy komórek nerwowych owadów, głowonogów i kręgowców



określany jest również jako HVA, *high voltage-activated*)[56]. Aktywność kanału L modulowana jest (hamowana bądź stymulowana) przez pochodne dwuhydropirydynowe (DHP) oraz obniżana przez pochodne fenyloalkiloaminowe i benzotiozepanowe. Mierzona techniką *patch-clamp* (patrz powyżej) przewodność właściwa pojedynczego kanału L w środowisku zawierającym 100 mM  $Ba^{2+}$  wynosi 20–27 pS (pikosimensów)[31, 56].

Kanał wapniowy typu T (od *transient*), aktywowany jest poprzez słabą depolaryzację błony (stąd często określany jest jako *low-voltage activated*; LVA). Jego inaktywacja jest szybka i zależna od napięcia. Ten typ kanału VOC jest mało wrażliwy na pochodne DHP i stosunkowo selektywnie blokowany przez  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  oraz pochodne fenyloalkiloaminowe i benzotiozepanowe. Przewodność właściwa opisywanego kanału wynosi 8–9 pS (dla 100 mM  $Ba^{2+}$ )[31, 56, 57].

Kanał typu N (od *neuronal*) aktywowany jest w wyniku silnej depolaryzacji błony. Zmiana potencjału elektrycznego znacznie wolniej powoduje inaktywację kanału N, w porównaniu do kanału typu T. Podobnie jak kanał typu T wykazuje on małą wrażliwość na działanie pochodnych DHP, ulega natomiast selektywnemu blokowaniu przez konotoksynę ( $\omega$ -CgTX, izolowaną z *Conus geographus*) i kationy lantanowe ( $La^{3+}$ ) oraz w mniejszym stopniu przez  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  [31, 56, 57]. Przewodność właściwa kanału typu N (13 pS [31]) jest o połowę niższa w porównaniu do typu L i o podobną wartość większa w odniesieniu do kanału wapniowego typu T [31].

Ostatni, najmniej poznany, zależny od napięcia zwierzęcy kanał wapniowy określany jest jako P. Jest on niewrażliwy na działanie pochodnych DHP i konotoksynę, natomiast jego aktywność ulega zablokowaniu przez FTX (niskocząsteczkową toksynę występującą w jadzie jednego ze skorpionów)[56].

**Kanały receptorowe (ROC).** W zależności od wrażliwości na zmiany potencjału błonowego kanały receptorowe dzieli się na dwie kategorie:

NMDAR (od ang. *N-metyl-D-aspartate receptor*). Na stymulowane przez glutaminian otwieranie się pierwszego z nich ma również pośredni wpływ potencjał błonowy. Przepuszczalność tego kanału dla jonów wapnia wzrasta w wyniku jej depolaryzacji [56]. Ten typ kanału blokowany jest przez  $Mg^{2+}$ .

W przeciwieństwie do niego zależne od receptorów kanały typu ATPR są niewrażliwe na działanie jonów magnezowych i ulegają aktywacji przez ATP nawet przy bardzo negatywnym potencjale błonowym. Kanały typu ROC charakteryzują się ok. 1000 razy mniejszą przepuszczalnością dla  $Ca^{2+}$  w porównaniu do VOC [56]. Poza glutaminianem i ATP również inne związki chemiczne, takie jak: histamina, wazopresyna, acetylocholina i adrenalina, aktywują różnego typu kanały receptorowe [35, 56].

**Kanały zależne od drugich przekaźników informacji (SMOCs).** Aktywacja tej grupy kanałów wapniowych zachodzi w wyniku oddziaływania na nie niskocząsteczkowych związków chemicznych określanych mianem drugich (lub wtórnych) prze-

każników informacji. Substancje te, jak np. trisfosfoinozytol ( $IP_3$ ), powstają w wyniku łączenia się określonych ligandów (agonistów) z receptorami błonowymi. Otwieranie się SMOCs indukowane jest w wyniku hyperpolaryzacji błony komórkowej [56]. Ten typ kanałów powszechnie występuje w komórkach wątroby, krwinkach, leukocytach i płytkach krwi oraz pewnych typach komórek nerwowych.

**Kanały wrażliwe na bodźce mechaniczne (MOCs).** W komórkach nabłonkowych, mięśni gładkich naczyń krwionośnych i mięśni sercowym oraz w komórkach mięśni szkieletowych stwierdzono występowanie kanałów wrażliwych na naprężenie i tonus. Ich aktywacja prowadzi do wzrostu cytoplazmatycznego poziomu jonów wapnia [56]. Ten typ kanałów nie ma struktury typowego kanału jonowego [35].

Poza omówionym, istnieją jeszcze inne kryteria podziału zwierzęcych kanałów wapniowych [35, 56]. Między innymi ze względu na tempo otwierania i inaktywacji można je podzielić na szybkie i powolne (*fast-* i *slow-operated*). Do pierwszej z wymienionych klas można zaliczyć kanały typu VOC, do drugiej natomiast – typu ROC.

#### 2.1.b. MOLEKULARNA BUDOWA ZWIERZĘCYCH KANAŁÓW WAPNIOWYCH

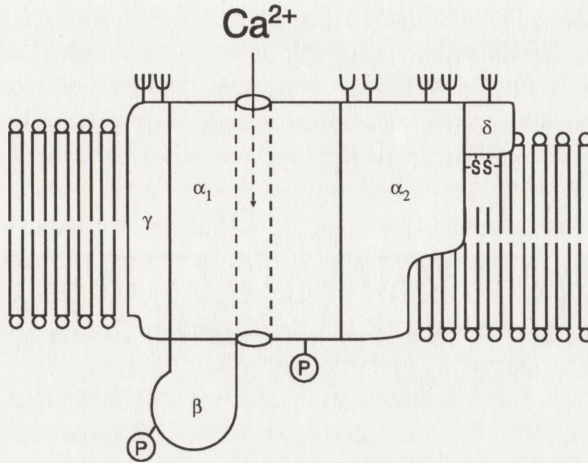
Na podstawie badań biochemicznych oraz analizy bibliotek odpowiednich cDNA (komplementarnych DNA) stosunkowo dobrze poznano molekularną budowę różnego typu kanałów wapniowych.

Wykazano, że kanały typu ROC mają na powierzchni błony dużą domenę N-kończącą przechodzącą w trzy blisko siebie położone i tworzące jego światło fragmenty transbłonowe, które przy udziale dużej pętli cytoplazmatycznej łączą się z czwartą, hydrofobową domeną C-kończącą [6, 36].

Napięciowo zależne kanały jonowe (VOC) mają podobnie zbudowane N- i C-końcowe odcinki polipeptydu oraz pętle łączące jego transbłonowe segmenty. Przypuszczalnie pierwotny względem innych typów kanał potasowy zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydu, w skład którego wchodzi 6 domen transbłonowych. Kanały wapniowe i sodowe zbudowane są natomiast z 4 tego typu domen [36].

Ze wszystkich znanych, najlepiej opisanym od strony molekularnej jest kanał typu L. Analizując biblioteki cDNA otrzymane z mięśni szkieletowych ssaków oraz różnych typów komórek zwierzęcych (np. mięśni szkieletowych karpia, serca królika i mózgu szczura) określono pierwszorzędową strukturę białek wchodzących w skład poszczególnych podjednostek kanału. Z drugiej strony ekspresja odpowiednich mRNA w oocytach *Xenopus* doprowadziła do określenia ich funkcji. Obecnie wiadomo, że występujący w komórkach mięśni szkieletowych kanał wapniowy typu L zbudowany jest z dwu dużych:  $\alpha_1$  (175 kDa) i  $\alpha_2$  (143 kDa) oraz trzech małych:  $\beta$  (54 kDa),  $\gamma$  (30 kDa) i  $\delta$  (27 kDa) podjednostek [36]. Posiadające hydrofobowy charakter podjednostki  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\gamma$  wbudowane są w błonę komórkową (rys. 2). Od strony cytoplazmatycznej podjednostka  $\alpha_1$  wiąże się z  $\beta$ , natomiast występująca po stronie zewnętrznej błony podjednostka  $\delta$  związana jest z  $\alpha_2$  (rys. 2) [36]. Podjednostka  $\alpha_1$  zbudowana jest z czterech powtarzających się domen, w których występuje sześć





Rys. 2. Podjednostkowa budowa zwierzęcego kanału wapniowego typu L; opis w tekście (na podstawie [36], zmodyfikowane): P – oznacza miejsca fosorylacji, podczas gdy  $\psi$  – glikolizacji poszczególnych podjednostek kanału, podjednostka  $\alpha_2$  połączona jest z podjednostką  $\delta$  kanału za pomocą mostków dwusiarczkowych ( $-S-S-$ )

transbłonowych segmentów, oznaczanych jako S1–S6. We wszystkich czterech wspomnianych domenach każdy segment S4 zawiera 5 lub 6 reszt argininowych i lizynowych, które uczestniczą w koordynacyjnym wiązaniu  $Ca^{2+}$  [56]. Światło kanału tworzą segmenty S4 wszystkich czterech domen wspomnianego polipeptydu [36]. Na podjednostce  $\alpha_1$  zlokalizowano miejsca receptorowe dla wszystkich klas antagonistów wapniowych mających wpływ na aktywność kanału L [31]. Podjednostka  $\alpha_2$  jest glikoproteina o unikalnym składzie aminokwasowym. Prawdopodobnie uczestniczy ona w regulacji aktywności podjednostki  $\alpha_1$ . Podobną funkcję może spełniać również niehomologiczna w stosunku do innych znanych białek podjednostka  $\beta$  [56]. Najmniej dotąd poznana jest podjednostka  $\gamma$ . W jej skład wchodzi tworzący 4 transbłonowe segmenty, 222-aminokwasowy polipeptyd. Jak się wydaje, występowanie wspomnianej podjednostki może być jedynie ograniczone do mięśni szkieletowych, a jej funkcja może być związana z mechanizmem powstawania ich skurczy [56].

Ekspresja  $\alpha_1$  mRNA w oocytach *Xenopus* indukuje pojawienie się w ich błonie komórkowej aktywności kanału wapniowego. Pozostałe podjednostki kodowane są przez odmienne geny, a ich koekspresja z  $\alpha_1$  mRNA prowadzi do modulacji przepuszczalnych właściwości  $\alpha_1$  [56].

#### 2.1.c. MECHANIZM DZIAŁANIA ZWIERZĘCYCH KANAŁÓW WAPNIOWYCH

Ostatnio poczyniono znaczący postęp w poznaniu mechanizmu działania kanałów wapniowych, zwłaszcza zależnego od potencjału kanału wapniowego typu L (patrz powyżej)[63,64].

Pierwotnie zakładano, że światło kanału zawiera dwa miejsca wiążące  $\text{Ca}^{2+}$ : o wysokim i niskim powinowactwie, oddalone od siebie o ok. 1,1 nm, tj. na taką odległość, w której zachodzi wzajemne odpychanie się kationów wapniowych [57]. Przypuszczano, że wzrost siły elektrostatycznego odpychania oraz odpowiednio wysoki gradient elektrochemiczny powodują "przesuwanie" jonów wapniowych poprzez światło kanału [57].

Duża selektywność kanału względem  $\text{Ca}^{2+}$  wskazuje, że w skład miejsc wiążących ten kation wchodzi reszty aminokwasów zawierające grupy karboksylowe, tworzące z nim wiązania o wysokiej liczbie koordynacyjnej. Wyniki badań przeprowadzonych nad mechanizmem działania kanałów wapniowych typu L [63] wskazują, że wspomniane grupy pochodzą z reszt glutaminianowych (pozycje 393, 736, 1145 i 1446) zlokalizowanych w każdej z czterech, wchodzących w skład kanału, transbłonowych domen (region SS1-SS2) podjednostki  $\alpha_1$  (patrz rys. 2). Zamiana reszt glutaminianowych na lizynowe prowadzi do spadku selektywności kanału dla jonów wapniowych [63]. Wszystkie cztery reszty glutaminianowe uczestniczą w tworzeniu charakteryzującego się dużym powinowactwem miejsca wiążącego pojedynczy, dwuwartościowy kation, np. wapniowy (rys. 3A). Takie rozmieszczenie pochodzących od reszt glutaminianowych grup karboksylowych powoduje, że w warunkach fizjologicznych kanał jest bardziej selektywny dla  $\text{Ca}^{2+}$  niż kationów jednowartościowych, takich jak  $\text{K}^+$  i  $\text{Na}^+$  (rys. 3B)[64]. Wspomniane grupy mogą również jednocześnie oddziaływać z dwoma kationami wapniowymi (rys. 3C). Jednakże w tym przypadku powinowactwo do obu jonów ulega znacznemu obniżeniu (do ok.  $K_d=14$  mM), co prowadzi do szybszego ich oddysocjowania z miejsc wiążących i podwyższenia tempa przepływu przez światło kanału [63].

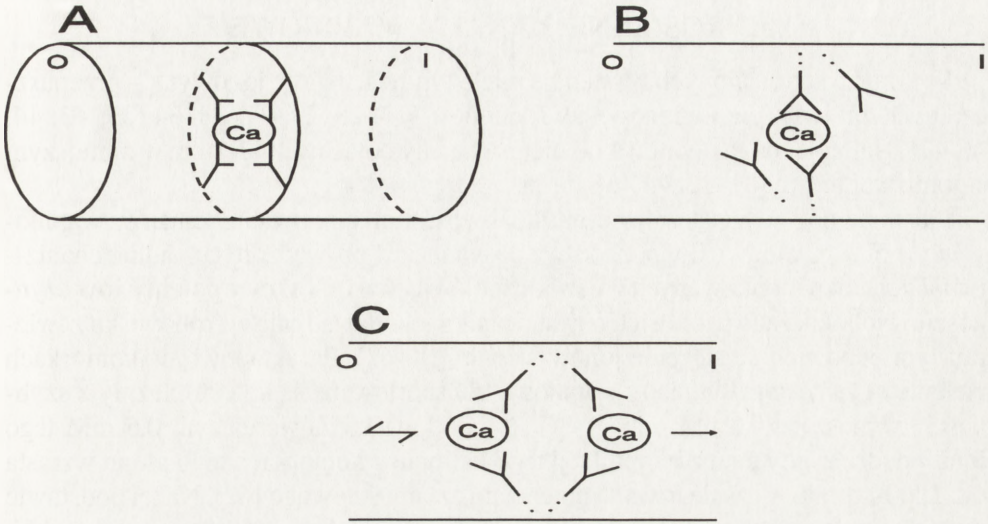
Transportowi  $\text{Ca}^{2+}$  poprzez kanał nie towarzyszą zmiany konformacyjne wchodzących w jego skład podjednostek [57, 63,64]. Kation ten dostaje się do wnętrza kanału w drodze dyfuzji i tą samą drogą opuszcza miejsca wiążące występujące w jego wnętrzu [63-64]. Podwyższenie selektywności kanału i tempa przepływu  $\text{Ca}^{2+}$  przez jego światło może następować poprzez zgromadzenie w jego pobliżu ujemnie naładowanych grup funkcyjnych białka samego kanału, jak i otaczających go fosfolipidów [57]. Czas otwarcia kanału skraca się wraz ze wzrostem  $\text{Ca}^{2+}$  w środowisku zewnątrzkomórkowym [56,57].

#### 2.1.d. REGULACJA KANAŁÓW WAPNIOWYCH

Kanał wapniowy może być otwierany poprzez odpowiednich jego agonistów (ROC), jak i przy określonych zmianach potencjału błonowego (VOC) [1,10,56].

Aktywność kanałów zależnych od receptorów (ROC) regulowana jest poprzez białko wiążące GTP (białko G) [13, 36, 56, 59]. W wyniku pobudzenia receptorów przez odpowiednie hormony następuje aktywacja białka G, które wpływając na określone enzymy indukuje wewnątrzkomórkowy metabolizm drugich przekaźników informacji [10], powstających w wyniku aktywacji cykazy adenylanowej (cAMP), cykazy guanylanowej (cGMP), fosfolipazy C (diacyloglicerol) lub  $\text{A}_2$  [10, 13].





Rys.3. Schemat ilustrujący budowę i mechanizm działania kanału wapniowego typu L. Jon wapniowy dostaje się do światła kanału, gdzie wiązany jest przez grupy karboksylowe reszt glutaminianowych (A). Wspomniane grupy mogą tworzyć z pojedynczym jonem wapniowym wiązanie o wysokim (B) lub jednocześnie z dwoma jonami wiązanie o niskim powinowactwie (C). Dalszy opis w tekście (na podstawie [63], zmodyfikowane)

Zależne od cAMP lub cGMP kinazy białkowe poprzez fosforylację białka kanału powodują jego aktywację [25]. W pewnych okolicznościach aktywacja kanału typu ROC może zająć z pominięciem drugich przekaźników informacji, w wyniku bezpośredniego oddziaływania kompleksu agonista-receptor-białko G z samym kanałem. Podobny do opisanego mechanizm aktywacji dotyczy również zależnego od potencjału kanału wapniowego typu L.

W przypadku kanałów zależnych od potencjałów (VOC) zarówno ich otwieranie, jak i inaktywacja uzależnione są od potencjału błonowego. Jak już wspomniano powyżej, wszystkie typy znanych obecnie napięciowo-zależnych kanałów wapniowych ulegają aktywacji i deaktywacji w zakresie charakterystycznych dla nich potencjałów błonowych.

Poza potencjałem elektrycznym i stanem fosforylacji/defosforylacji białka kanału również inne czynniki mogą kontrolować jego aktywność. Glikolizacja zewnątrzkomórkowej części kanału może podwyższyć gęstość ujemnego ładunku przy wejściu do kanału, a tym samym zwiększenie tempa dyfuzji jonów wapniowych w kierunku obecnych w świetle kanału miejsc wiążących. W przypadku zwierzęcych kanałów wapniowych typu L regulacja ich aktywności może odbywać się zarówno w wyniku glikolizacji, jak i fosforylacji jego poszczególnych podjednostek (odpowiednio  $\delta$  oraz  $\alpha_1$  i  $\beta$ ) (patrz rys. 2) [25,36].

## 2.2 ROŚLINNE KANAŁY WAPNIOWE

W komórkach roślinnych występuje wiele typów kanałów jonowych – przepuszczalnych zarówno dla kationów, jak i anionów [14, 28–29, 31, 33–34, 37, 43, 44, 46–47]. Najlepiej poznanymi wśród nich są kanały potasowe [47] oraz w mniejszym stopniu wapniowe [31–33, 44, 46].

Pierwsze dowody wskazujące na możliwość funkcjonowania kanałów wapniowych w plazmalemie roślin pochodzą z doświadczeń prowadzonych nad mechanizmami generacji indukowanych przez bodźce zewnątrzkomórkowe potencjałów czynnościowych. Jak zauważono, ich powstawanie zachodzi jedynie w środowisku zawierającym odpowiednie stężenie jonów wapnia [61–62]. Przykładowo, w komórkach zielenicy *Chara corallina* jony wapniowe transportowane są do cytoplazmy z szybkością wynoszącą  $0,3 \text{ nM} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (w środowisku zawierającym  $0,5 \text{ mM}$  tego jonu), podczas gdy tempo akumulacji tego kationu w komórkach tego glonu wzrasta ok. 1000-krotnie w czasie trwania potencjału czynnościowego [42]. Na tej podstawie wnioskowano, że powstawaniu potencjałów czynnościowych towarzyszy szybki, dokomórkowy przepływ jonów wapnia. Prędkość, z jaką zachodzi ten proces, sugerowała, że przenikanie  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplazmy odbywa się poprzez odpowiednie kanały jonowe [42, 47]. Również wyniki badań prowadzonych nad wpływem agonistów i antagonistów zwierzęcych kanałów wapniowych na pobieranie radioaktywnego wapnia [7, 31, 38, 42, 49, 52, 60, 65] dostarczyły pośrednich dowodów potwierdzających możliwość istnienia ich odpowiedników u roślin. Wspomniane substancje zostały również użyte w celu izolacji białek roślinnych mających właściwości kanałów wapniowych [5, 17–19, 23, 26, 40–50]. Stosując tę metodę wykazano między innymi, że frakcja mikrosomalna uzyskana z komórek dyni w sposób odwracalny wiąże [ $^3\text{H}$ ]verapamil ( $K_d = 130 \text{ nM}$ ), a proces ten hamowany jest przez nifedypinę i diltiazem. Białka wiążące inhibitory zwierzęcych kanałów wapniowych wyizolowano z koleoptyli kukurydzy [26] oraz z zawiesin komórkowych marchwi [49]. W pierwszym przypadku był to 169-, natomiast w drugim 75-kilodaltonowy polipeptyd wchodzący w skład błon komórkowych wspomnianych gatunków roślin [26, 49].

Poza roślinami wyższymi kanały wapniowe mogą funkcjonować w błonach niektórych glonów. W surowym ekstrakcie otrzymanym z komórek *Chlamydomonas reinhardtii* odkryto istnienie miejsc wiążących [ $^3\text{H}$ ]-nimodipinę [17]. Związek ten łączył się z białkami plazmalemy ( $K_d = 9 \text{ nM}$ ) i błon wewnątrzkomórkowych ( $K_d = 36 \text{ nM}$ ). Wiązanie [ $^3\text{H}$ ]nimodipiny przez obie frakcje błonowe hamowane były przez verapamil i stymulowane przez D-cis-diltiazem. Specyficzny chelator jonów wapnia, EGTA hamował wiązanie się omawianej substancji jedynie z frakcją wzbogaconą w błony komórkowe [17]. We frakcji błonowej izolowanej z komórek omawianego glonu stwierdzono również występowanie miejsc specyficznie wiążących inny bloker kanałów wapniowych – [ $^3\text{H}$ ]verapamil [18–19].

Jak dotąd opublikowano niewielką ilość prac opisujących elektrofizjologiczne i molekularne właściwości plazmalemy kanałów wapniowych roślin (patrz [31,



44, 47]). Pionierskie prace z tego zakresu przeprowadzone zostały w pracowni Berestowskiego [4, 8–9, 24, 65]. W 1978 roku Aleksandrov i inni [4] z komórek *Nitellopsis obtusa* wyizolowali białko kanału przewodzącego jony wapniowe i sodowe, które następnie zostało wbudowane w sztuczną błonę lipidową [8–9]. Uzyskany kanał był lepiej przepuszczalny dla jonów wapnia niż magnezu, jednakże, podobnie do zwierzęcych kanałów wapniowych typu L, najwyższą selektywność wykazywał względem  $Ba^{2+}$  [8, 24]. W środowisku zawierającym niskie stężenia dwuwartościowych kationów przez kanał ten mogły również przenikać kationy jednowartościowe. Autorzy omówionych prac przypuszczali, że analizowany przez nich kanał zbudowany jest z kilku niskocząsteczkowych (20 kDa) białek [8]. Wyniki opisanych badań nie zostały powszechnie zauważone i zaakceptowane.

Z koleoptyli kukurydzy wyizolowano białko wiążące verapamil [26]. Związek ten prawdopodobnie wiązał się z 169 kDa glikoproteina, która masą swą zbliżona jest do podjednostki wiążącej ten związek występującej w zwierzęcym kanale wapniowym typu L. Otrzymany kanał okazał się bardziej przepuszczalny dla  $Ba^{2+}$  niż  $Ca^{2+}$  (podobne właściwości wykazuje zwierzęcy kanał typu L) [26].

Thuleau i inni [49] wykazali, że pochodna fenyloalkiloaminowa, [ $^3H$ ]LU 49888 wiąże się z frakcją błon komórkowych protoplastów marchwi oraz z wyizolowaną i oczyszczoną z nich 75-kilodaltonową glikoproteina. Białko to zostało wbudowane do liposomów, a jego "transportujące" właściwości przeanalizowano przy użyciu techniki *patch-clamp* (patrz powyżej). Na tej podstawie ustalono, że oczyszczone białko, w sposób podobny do zwierzęcych kanałów wapniowych reguluje przemieszczanie się  $Ca^{2+}$  przez sztuczną błonę lipidową [50]. Aktywność selektywnego dla  $Ca^{2+}$  kanału zanikała po 2–10 minutach i w jego miejsce rejestrowano pojawienie się kanału charakteryzującego się znacznie niższą przepuszczalnością dla tych jonów [50]. Bloker kanałów wapniowych – bepridil powodował obniżenie prawdopodobieństwa występowania kanału w konfiguracji otwartej. Autorzy przedstawionych prac sugerują, że wyizolowane przez nich białko może być składnikiem plazmalemowego kanału wapniowego [50].

Dostępne dotąd informacje na temat roślinnych kanałów wapniowych są fragmentaryczne, budzące wiele kontrowersji, a ponadto na ich podstawie trudno wyciągać ogólniejsze wnioski. Jak się wydaje, w plazmalemie komórek roślinnych funkcjonować mogą co najmniej dwa typy kanałów wapniowych. Pierwszy z nich wykazuje podwyższoną wrażliwość na działanie pochodnych dihydropirydynowych [53], drugi natomiast może być hamowany przez verapamil [52] i diltiazem [38, 48]. Ponadto ustalono, że pierwszy z wymienionych typów kanałów stymulowany jest przez bepridil [38], drugi natomiast hamowany przez tę substancję [48, 50].

Roślinne kanały wapniowe swą budową molekularną, przepuszczalnością dla jonów oraz wrażliwością na związki farmakologiczne różnią się w porównaniu do ich odpowiedników występujących w komórkach zwierzęcych. We wszystkich dotąd przeprowadzonych doświadczeniach stwierdzono, że różnorodne blokery zwierzę-

cych kanałów wapniowych wiązą się ze stosunkowo niską stałą powinowactwa z białkami występującymi w plazmalemie roślin [31]. Ponadto wykazano, że przeciwciała skierowane przeciw zwierzęcym kanałom wapniowym nie reagują z białkami frakcji błonowych roślin [23].

### 3. WEWNĄTRZKOMÓRKOWE KANAŁY WAPNIOWE

Poza plazmalemą, w której funkcjonuje wiele typów kanałów jonowych [1, 6, 13, 28, 35–37, 43, 47], w tym również wapniowe [1, 10, 14, 25, 31, 35–37, 44, 46–48], podobne struktury wykryto w błonach otaczających różne przedziały komórkowe. Jak dotąd najlepiej poznanymi są kanały wapniowe działające w ER/SR komórek zwierzęcych [10, 39, 45, 56] i w tonoplaście u roślin [2–3, 11–12, 22, 32–33, 40].

#### 3.1. ZWIERZĘCE KANAŁY WAPNIOWE SIATECZKI ŚRÓDPLAZMATYCZNEJ

W błonach SR/ER mięśni gładkich i poprzecznie prążkowanych oraz innych typów komórek zwierzęcych stwierdzono występowanie kanałów uwalniających  $\text{Ca}^{2+}$  z wnętrza ich cystern. Ze względu na wrażliwość na różne endo- i egzogenne substancje wyróżnia się dwa typy kanałów:

- aktywowane przez  $\text{Ca}^{2+}$  (nazywane również rianodinowymi) oraz
- wrażliwe na działanie  $\text{IP}_3$  [39, 45].

Pierwszy z wyżej wymienionych typów kanałów wykryto w błonach SR komórek mięśni szkieletowych i gładkich, mięśnia serca oraz komórek mózgu i wątroby. Ten typ kanału podlega na przykład szybkiej aktywacji podczas skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych i gładkich. Ponieważ podczas depolaryzacji błon komórek mięśniowych do ich cytoplazmy przedostaje się niewystarczająca do indukcji skurczu ilość  $\text{Ca}^{2+}$ , kation ten jest również uwalniany z wnętrza cystern SR. To tzw. indukowane  $\text{Ca}^{2+}$  uwalnianie jonów wapnia (CICR, od ang. *calcium-induced calcium release* [10, 56, 58]) zachodzi w wyniku aktywowania występujących w błonach SR kanałów mobilizujących  $\text{Ca}^{2+}$ . Jak wyliczono, progowe stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  niezbędne do indukcji wspomnianego procesu wynosi  $3 \mu\text{M}$ . W obecności kofeiny uwalnianie jonów wapnia zachodzi przy bardzo niskim poziomie cytoplazmatycznego  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Ponadto wykazano, że prokaina hamuje stymulowane  $\text{Ca}^{2+}$  uwalnianie jonów wapnia z SR, natomiast cAMP potęguje ten proces [45, 59]. Omawiany rodzaj kanału wapniowego jest bardzo wrażliwy na działanie roślinnego alkaloidu, rianodiny [36, 39, 45, 56]. Przy użyciu tego związku z błon ER komórek zwierzęcych wyizolowano białko receptrowe wiążące ten związek. To homotetramerowe białko (MM monomeru wynosi ok. 565 kDa [45]), tworzące kanał dla jonów wapnia, ma 4 miejsca wiążące rianodinę, po jednym na monomer [56].



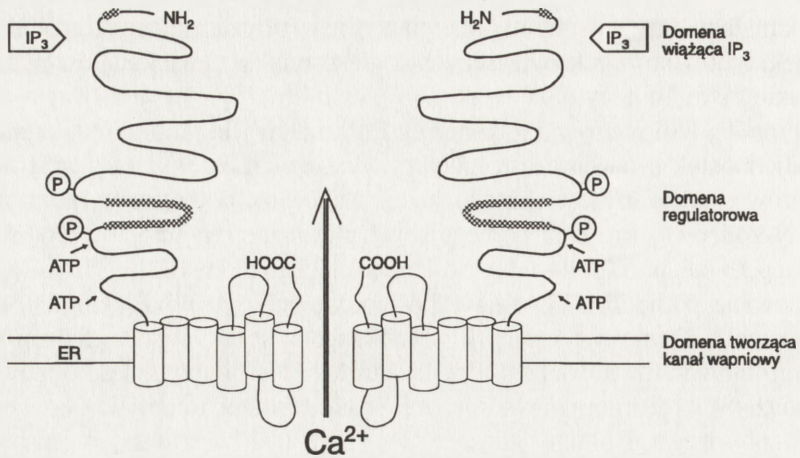
Poza kanałami aktywowanymi przez rianodinę w błonach siateczki śródplazmatycznej wielu typów komórek zwierzęcych stwierdzono istnienie kanałów wrażliwych na działanie trisfosfoinozytolu ( $IP_3$ ).

Receptor  $IP_3$  izolowany z ER komórek Purkiniego jest tetramerem składającym się z podjednostek o masie cząsteczkowej wynoszącej ok. 313 kDa [45]. Każdy z monomerów zbudowany jest z bardzo dużej, liczącej ok. 650 reszt aminokwasowych domeny N-końcowej, krótkich, podlegających glikolizacji fragmentów C-końcowych oraz kilku pętli łańcucha polipeptydowego penetrującego błonę ER [39] (rys. 3). Cztery, tak zbudowane podjednostki, mające po jednym miejscu wiążącym  $IP_3$ , otaczają wewnątrz kanału. Domeny wiążące  $IP_3$  wzbogacone są w mające dodatni ładunek reszty argininowe i lizynowe [39]. Przyłączanie trisfosfoinozytolu do odpowiednich miejsc wiążących receptora powoduje zmianę konformacji tetramery i otwieranie się kanału wapniowego. Domeny wiążące  $IP_3$  mogą być blokowane przez heparynę, znosząc działanie tego polifosfoinozytolu [39].

W wyniku użycia permeabilizowanych mięśni gładkich stwierdzono, że uwalnianie  $Ca^{2+}$  z SR stymulowane jest submikromolowymi stężeniami  $IP_3$ . Przypuszcza się, że do aktywacji omawianego receptora i otwarcia sprzężonego z nim kanału wapniowego niezbędne jest przyłączenie co najmniej trzech cząsteczek  $IP_3$ . Wydaje się, że w regulacji stymulowanego trisfosfoinozytolem uwalniania  $Ca^{2+}$  uczestniczy białko G [59]. Na aktywność receptorów  $IP_3$  wpływa także fosforylacja jego białka przez kinazę zależną od cAMP (PKA) (rys. 4). Ufosforylowanie receptora powoduje zmianę jego konformacji, przeciwdziałając tym samym indukowanemu przez  $IP_3$  uwalnianiu  $Ca^{2+}$  z wnętrza cystern ER. Aktywność omawianych kanałów, w sposób pośredni, regulowana jest przez kinazę białkową C (PKC) oraz kinazę białkową zależną od  $Ca^{2+}$  (CDKP) (rys. 3 i 4), jak również przez ATP (tab. 2) [39]. Również czynniki blokujące wiązanie się  $IP_3$  z receptorem:  $Mg^{2+}$ ,  $H^+$  i heparyna hamują uwalnianie jonów wapnia z wnętrza cystern ER [36].

Aktywność występujących w błonach ER/SR kanałów wapniowych może być regulowana przez występujące w świetle ich cystern białko wiążące  $Ca^{2+}$  – aneksynę VI. Wzrostowi poziomu wolnego wapnia wewnątrz ER towarzyszyć może aktywacja aneksyny VI, która poprzez wpływ na kanały wapniowe powoduje uwalnianie do cytoplazmy podstawowej nadmiaru zgromadzonych w cysternach tej struktury  $Ca^{2+}$ . Aneksyna VI podwyższa prawdopodobieństwo otwarcia się kanału i średni czas jego otwarcia [27].

Receptory wiążące rianodinę oraz  $IP_3$  izolowane z błon siateczki sarkoplazmatycznej mięśnia sercowego lub mięśni szkieletowych wykazują znaczące różnice molekularne oraz odmienną wrażliwość na związki farmakologicznie czynne, jak i różny sposób regulacji ich aktywności *in vivo* [45]. Pierwszy typ receptorów reaguje na działanie kofeiny (stymulacja), czerwieni rutenowej i prokainy (hamowanie aktywności), natomiast jest zupełnie niewrażliwy na  $IP_3$  i heparynę (tab. 2). Receptory  $IP_3$  wykazują dokładnie odwrotną wrażliwość na wymienione substancje [45].



Rys. 4. Budowa receptora trisfosfoinozytowego (przedstawiono jedynie dwie z czterech jego podjednostek): ATP→ – oznacza miejsca przyłączające ATP, P – domeny podlegające fosforylacji, natomiast IP<sub>3</sub> – fragmenty polipeptydu przyłączające cząsteczki trisfosfoinozytoli, ER – błona siateczki śródplazmatycznej (na podstawie [39], zmodyfikowane)

TABELA 2. Porównanie właściwości receptorów rianodiniowych i trisfoinozytowych (IP<sub>3</sub>), symbole "+" i "-" oraz "+/-" oznaczają odpowiednio stymulację, hamowanie lub efekt pośredni danego związku na aktywność receptora, natomiast PKA to kinaza białkowa zależna od cyklicznego AMP (na podstawie [45], zmodyfikowane)

Właściwości	Receptor rianodiniowy	Receptor IP <sub>3</sub>
Struktura	4x566 kDa	4x313 kDa
Przewodność właściwa	80–100 pS	20–80 pS
<b>Regulatory:</b>		
IP <sub>3</sub>	brak wpływu	+
cADP-ryboza	+	brak wpływu
Cytozolowy Mg <sup>2+</sup>	–	–
Cytozolowy Ca <sup>2+</sup>	+	+/-
Laminalny Ca <sup>2+</sup>	+	+
Nukleotydy adeninowe	+	+/-
Kalmodulina	–	brak wpływu
PKA <sub>2</sub>	?	+/-
<b>Wrażliwość na:</b>		
Rianodinę	+/-	brak wpływu
Czerwień rutenową	–	brak wpływu
Prokainę	–	brak wpływu
Kofeinę	+	+/-
Heparynę	brak wpływu	–
Aniony wanadanowe	?	–



Kanały związane z obydwoma omawianymi typami receptorów znacznie różnią się pod względem przepuszczalności dla jonów wapniowych. Przemieszczanie  $\text{Ca}^{2+}$  przez pojedynczy kanał receptora stymulowanego przez  $\text{IP}_3$  jest ok. 10 razy wolniejszy w porównaniu do kanału aktywowanego przez rianodinę [56]. Wynika to z faktu, że kanały wapniowe związane z receptorami rianodinowymi wykazują znacznie wyższą przewodność właściwą dla  $\text{Ca}^{2+}$  w porównaniu do aktywowanych przez trisfosfoinozytol (tab. 2) [45].

### 3.2. WEWNĄTRZKOMÓRKOWE ROŚLINNE KANAŁY WAPNIOWE

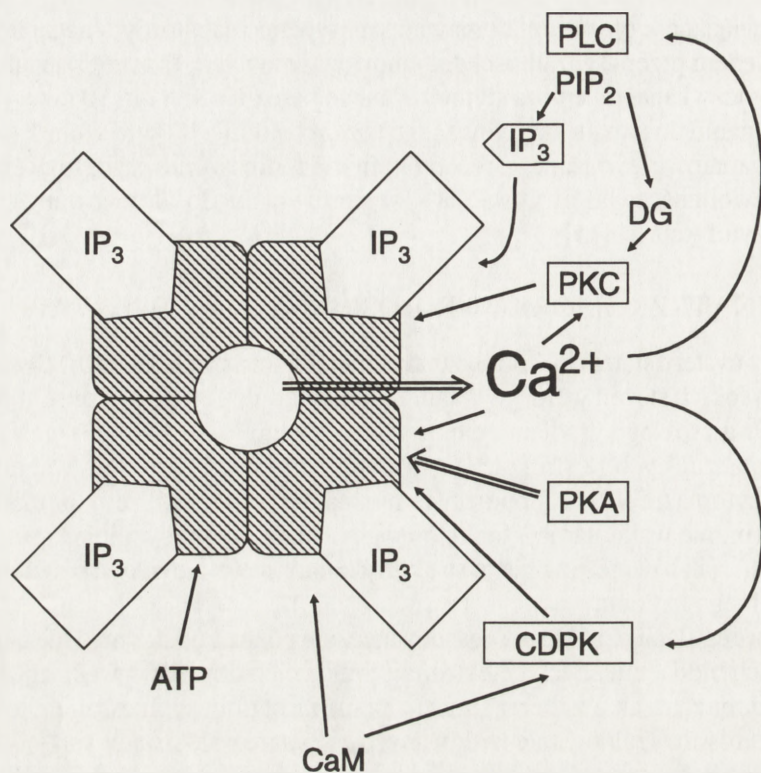
Wewnątrz cystern siateczki śródplazmatycznej [15] oraz wakuoli [20] stwierdzono obecność wysokich stężeń wolnego wapnia (odpowiednio 5–10  $\mu\text{M}$  i ok. 5 mM) [15, 20]. Istnienie wysokiego gradientu elektrochemicznego  $\text{Ca}^{2+}$  (200–300 mV) w poprzek błon otaczających te struktury [14] faworyzuje wypływ jonów wapnia z ich wnętrza do cytoplazmy. Na tej podstawie można przypuszczać, że w błonach ER i tonoplaście (błonie wakuolarnej) funkcjonują mechanizmy precyzyjnie kontrolujące transport  $\text{Ca}^{2+}$ , jak również iż obie te struktury komórkowe mogą być potencjalnymi magazynami tego kationu.

Rola ER w regulacji  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  nie jest dostatecznie poznana. Jak dotąd nie uzyskano bezpośrednich biochemicznych i elektrofizjologicznych dowodów wskazujących na istnienie podobnych, jak u zwierząt, mechanizmów regulujących uwalnianie  $\text{Ca}^{2+}$  z cystern ER u roślin. Traktowanie izolowanych z komórek aleuronowych jęczmienia pęcherzyków ER związkami indukującymi uwalnianie  $\text{Ca}^{2+}$  z cystern ER/SR komórek zwierzęcych (np. rianodina,  $\text{IP}_3$  lub kofeina) nie prowadziło do mobilizowania z ich wnętrza zakumulowanego tam wapnia [14, 16].

Choć jak dotąd brak jest dowodów wskazujących na obecność kanałów wapniowych w błonach ER, szereg autorów [30, 55] nie wyklucza udziału tych struktur w homeostazie komórkowego poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  u roślin. Mogą one być szczególnie aktywne w niewyróżnicowanych, pozbawionych centralnej wakuoli komórkach oraz w komórkach charakteryzujących się szczytowym wzrostem. Hepler i inni [30] zwrócili uwagę na istnienie w komórkach roślinnych cystern ER o ułożeniu równoległym do błony komórkowej. Natomiast Tretny i inni [55] wykazali, że cysterny te mogą bezpośrednio zlewać się z plazmalemą i usuwać na zewnątrz komórki zakumulowane w ich świetle jony wapniowe. Zrozumienie znaczenia siateczki śródplazmatycznej w regulacji cytoplazmatycznego stężenia wolnego wapnia u roślin wymaga dalszych, bardziej intensywnych badań.

#### 3.2.a. KANAŁY WAPNIOWE TONOPLASTU

Wakuola zajmuje 90–95% objętości w pełni zróżnicowanej komórki roślinnej [32], a w soku komórkowym wypełniającym tę strukturę, stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  może dochodzić nawet do 5 mM [20]. Uwzględniając fakt, iż cytoplazmatyczny poziom wolnego wapnia wynosi ok. 200 nM różnica stężeń tego kationu po obu stronach tonoplastu



Rys. 5. Współdziałanie receptora trisfosfoinozytowego (IP<sub>3</sub>) z innymi systemami sygnałowymi, opis w tekście, DG – diacylglicerol, PKC – kinaza białkowa C, PKA – kinaza białkowa A, CaM – kalmodulina, CDPK – zależna od jonów wapnia kinaza białkowa, pozostałe skróty jak na rys. 1 (na podstawie [35], zmodyfikowane)

jest rzędu 25000 razy. Aby przeciwdziałać niekontrolowanemu przepływowi Ca<sup>2+</sup> przez błonę wakuolarną, w jej obrębie muszą funkcjonować mechanizmy regulujące ten proces. W tonoplacie stwierdzono występowanie pomp i wymiennicy wapniowych, biorących udział w akumulacji Ca<sup>2+</sup> wewnątrz wakuoli [21], jak i kanałów wapniowych, uczestniczących w jego uwalnianiu do cytoplazmy podstawowej [14].

Obecność zależnych od potencjału i stymulowanych przez IP<sub>3</sub> kanałów wapniowych stwierdzono w błonach wakuolarnych buraka cukrowego [32–33]. Na podstawie danych uzyskanych techniką *patch-clamp* (patrz powyżej) wydedukowano, że w średniej wielkości wakuoli (o średnicy ok. 45 μm) może występować ok. 1200 aktywowanych przez IP<sub>3</sub> kanałów wapniowych [11]. Biorąc pod uwagę wielkość wakuoli taka ich liczba umożliwia uwalnianie przez trisfosfoinozyt jedynie niewielkiej części (ok. 20%) zakumulowanego w jej wnętrzu wolnego Ca<sup>2+</sup> [11–12].

Obok stymulowanych przez IP<sub>3</sub>, w wakuolach izolowanych z buraka cukrowego zidentyfikowano drugą klasę kanałów wapniowych. Ich otwieranie się zachodzi w



wyniku depolaryzacji tonoplastu (tj. wzrostu pozytywnego ładunku elektrycznego we wnętrzu wakuoli)[32-33]. Wykazano, że przedostawaniu się do wakuoli lipofilnego kationu trzymetylofosfoniowego (TPMP<sup>+</sup>) towarzyszy uwalnianie znacznej części zawartego w niej Ca<sup>2+</sup>. Ponadto ustalono, że TPMP<sup>+</sup> użyty po uprzednim podaniu IP<sub>3</sub> powodował uwalnianie dodatkowych ilości Ca<sup>2+</sup> z tej struktury. Stymulacyjny wpływ TPMP<sup>+</sup> na mobilizację wapnia z wnętrza wakuol hamowany był przez gadolin (Gd<sup>3+</sup>) i cynk (Zn<sup>2+</sup>) [32]. Do hamowania kanału prowadziło również podwyższenie stężenia Ca<sup>2+</sup> (> 1 μM) po cytoplazmatycznej stronie tonoplastu [22]. Heparyna i TMB-8, inhibitory zależnych od IP<sub>3</sub> zwierzęcych kanałów wapniowych [45, 56] nie wpływały w znaczący sposób na aktywność badanych kanałów tonoplastowych [32]. Z drugiej strony agonista zwierzęcych kanałów wapniowych typu L, związek Bay K-8644, podwyższał częstotliwość otwierania się, podczas gdy antagoniści: nifedypina, verapamil i La<sup>3+</sup> obniżały prawdopodobieństwo ich aktywacji [22]. Wszystkie wymienione związki działały jedynie w przypadku, gdy stosowano je po wakuolarnej stronie tonoplastu [22].

Obecność w błonie wakuolarnej dwóch odrębnych typów kanałów wapniowych zostało potwierdzone metodą *patch-clamp* [2-3, 29, 32-33]. Przy jej użyciu wykryto, że niskie stężenia IP<sub>3</sub> stymulują przepływ Ca<sup>2+</sup> przez pojedyncze kanały wapniowe tonoplastu buraka czerwonego [2]. Wpływ innych polifosforanów inozytolu na otwieranie się badanego kanału był mało skuteczny.

Zależne od potencjału tonoplastowe kanały wapniowe charakteryzują się znacznie niższą przewodnością właściwą (12,5 pS) [32] w porównaniu do kanałów aktywowanych przez IP<sub>3</sub> (30,0 pS) (przy stężeniu 5 mM Ca<sup>2+</sup> od strony wakuolarnej i 1 mM od strony cytoplazmatycznej) [2]. Ponadto ich aktywację obserwuje się w wyniku wzrostu poziomu [Ca<sup>2+</sup>] po wakuolarnej stronie tonoplastu. Opisywane kanały są nierównomiernie rozmieszczone w błonie wakuolarnej i najprawdopodobniej występują w postaci pakietów (ok. 10 kanałów w jednym pakiecie) [11]. Poza odpowiednimi zmianami w różnicy potencjału tonoplastu i zawartością Ca<sup>2+</sup> w soku komórkowym mogą one być również kontrolowane przez odczyn roztworu wypełniającego wnętrze wakuoli. Biorąc pod uwagę właściwości kinetyczne oraz wrażliwość na związki farmakologicznie czynne omawiany kanał wykazuje duże podobieństwo do rianodionowych IP<sub>3</sub> kanałów wapniowych (patrz powyżej) funkcjonujących w błonach siateczki śródplazmatycznej komórek zwierzęcych [32-33].

## LITERATURA

- [1] ABDEL-LATIF AA. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and generation of second messengers. *Pharmacol Rev* 1986; **38**: 227-272.
- [2] ALEXANDREL, LASSALLES JP, KADO RT. Opening of Ca<sup>2+</sup> channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 1990; **343**: 567-570.

- [3] ALEXANDRE L, LASSALLES JP. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release by  $\text{InsP}_3$  in plants and effect of buffers on  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion. *Phil Trans Roy Soc London, Ser. B* 1992; **338**: 53–61.
- [4] ALEKSANDROV AA, BERESTOVSKY GN, VOLKOVA SP, VOSTRIKOV IY, ZHERELOVA OM, KRAVCHIK S, LUNEVSKY VZ. Reconstruction of a single calcium-sodium channel of a cell in a lipid bilayer. *Doklady Biophysics* 1978; **227**: 37–40.
- [5] ANDREJAUSKAS E, HERTEL R, MARMÉ D. Specific binding of the calcium antagonist [ $^3\text{H}$ ]verapamil to membrane fractions from plants. *J Biol Chem* 1985; **260**: 5411–5414.
- [6] BARNARD EA. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *TIBS* 1992; **17**: 368–378.
- [7] BEDNARSKA E. The effect of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  ions on pollen grain germination and pollen tube growth. Investigations with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  together with Verapamil,  $\text{La}^{3+}$ , and ruthenium red. *Sex Plant Repro* 1989; **2**: 53–58.
- [8] BERESTOVSKY GN, ALEKSANDROV AA. The cluster structure and gating mechanism of reconstructed calcium channel of the cell of characean algae. *Biophysics* 1983; **28**: 865–870.
- [9] BERESTOVSKY GN, ZHERELOVA OM, KATAEV AA. Ionic channels in characean algal cells. *Biophysics* 1985; **32**: 1101–1120.
- [10] BERRIDGE MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; **361**: 315–325.
- [11] BROSANAN JM. Opening plant calcium channels. *Nature* 1990; **344**: 593.
- [12] BROSANAN JM, SANDERS D. Inositol trisphosphate-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release in beet microsomes is inhibited by heparin. *FEBS Lett* 1990; **260**: 70–72.
- [13] BROWN AM. Membrane-delimited cell signalling complexes: Direction channel regulation by G proteins. *J Membrane Biol* 1993; **131**: 93–104.
- [14] BUSH DS. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol* 1993; **103**: 7–13.
- [15] BUSH DS, BISWAS AK, JONES RL. Gibberellic-acid-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone:  $\text{Ca}^{2+}$  transport and steady-state levels. *Planta* 1989; **178**: 411–420.
- [16] BUSH DS, BISWAS AK, JONES RL. Hormonal regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in the endomembrane system of the barley aleurone. *Planta* 1993; **189**: 507–515.
- [17] DOLLE R. Isolation of plasma membrane and binding of the calcium antagonist nimodipine in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plant* 1988; **73**: 7–14.
- [18] DOLLE R, NULTSCH W. Specific binding of the calcium channel blocker [ $^3\text{H}$ ]verapamil to membrane fractions of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch Microbiol* 1988; **149**: 451–458.
- [19] DOLLE R, NULTSCH W. Characterization of D- $^3\text{H}$ ]cis-diltiazem binding to membrane fraction and specific binding of calcium channel blockers to isolated flagellar membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Sci* 1988; **90**: 457–463.
- [20] DUPONT FM, BUSH DS, WINDLE JJ, JONES RL. Calcium and proton transport in membrane vesicles from barley roots. *Plant Physiol* 1990; **94**: 179–188.
- [21] EVANS DE, BRIARS SA, WILLIAMS LE. Active calcium transport by plant cell membranes. *J Exp Bot* 1991; **42**: 285–303.
- [22] GELLI A, BLUMWALD E. Calcium retrieval from vacuolar pools. Characterization of a vacuolar calcium channel. *Plant Physiol* 1993; **102**: 1139–1146.
- [23] GRAZIANA A, FOSSET M, RANJEVA R, HETHERINGTON AM, LAZDUNSKI M.  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors that bind to plant cell membranes block  $\text{Ca}^{2+}$  entry into protoplasts. *Biochemistry* 1988; **27**: 764–768.
- [24] GRISCHENKO VM, ALEKSANDROV AA, BERESTOVSKY GN. Isolation of a fraction of cytoplasmic proteins possessing channel-forming activity from characeous algae. *Soviet Plant Physiol* 1984; **31**: 787–793.
- [25] HARTZELL HC. Filling the gaps in  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation. *Biophys J* 1993; **65**: 1358–1359.
- [26] HARVEY HJ, VENIS MA, TREWAVAS AJ. Partial purification of a protein from maize (*Zea mays*) coleoptile membranes binding the calcium channel antagonist verapamil. *Biochem J* 1989; **257**: 95–100.



- [27] HAZARIKA P, SHELDON A, KAETZEL MA, DIAZMUNOS M, HAMILTON SL, DEMAN JR. Regulation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel requires intact annexin VI. *J Cell Biochem* 1991; **46**: 86–93.
- [28] HEDRICH R, JEROMIN A. A new scheme of symbiosis: ligand and voltage-gated anion channels in plants and animals. *Phil Trans Roy Soc London, Ser. B* 1992; **338**: 31–38.
- [29] HEDRICH R, NEHER E. Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* 1987; **329**: 833–836.
- [30] HEPLER PK, PELEVITZ BA, LANCELLE SA, MCCAULEY MM, LICHTSCHIDEL. *J Cell Sci* 1990; **96**: 355–373.
- [31] HETHERINGTON AM, GRAZIANA A, MAZARS C, THULEAU P, RANJEVA R. The biochemistry and pharmacology of plasma-membrane calcium channels in plants. *Phil Trans Roy Soc London, Ser. B* 1992; **338**: 91–96.
- [32] JOHANNES E, BROSNAN JM, SANDERS D. Parallel pathways for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release from the vacuole of higher plants. *Plant J* 1992; **2**: 97–102.
- [33] JOHANNES E, BROSNAN JM, SANDERS D. Calcium channels in vacuolar membrane of plants: multiple pathways for intracellular calcium mobilization. *Phil Trans Roy Soc London, Ser. B* 1992; **338**: 105–112.
- [34] KATSUHARA M, TAZAWA M. Calcium-regulated channels and their bearing on physiological activities in characean cells. *Phil Trans Roy Soc London, Ser. B* 1992; **338**: 19–20.
- [35] KUŹNICKI J. Transport i funkcje jonów wapnia u *Eukariota*. *Kosmos* 1988; **37**: 197–217.
- [36] KWIATKOWSKA J. Budowa kanałów jonowych: rodziny strukturalne. *Post Biochem* 1991; **37**: 122–128.
- [37] MAATHUIS FJM, SANDERS D. Plant membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 661–669.
- [38] MACROBBIE EAC, BANFIELD J. Calcium influx at the plasmalemma of *Chara corallina*. *Planta* 1988; **176**: 98–108.
- [39] MIKOSHIBA K, FURUICHI T, MIYAWAKI A, YOSHIKAWA S, NAKAGAWA T, YAMADA N, HAMANAKA Y, FUJINO I, MICHIKAWA T, RYO Y, OKANO H, FUJII S, NAKADE S. Inositol trisphosphate receptors and  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. *Trans Roy Soc London, Ser. B* 1993; **340**: 345–349.
- [40] PANTOJA O, GELLY A, BLUMWALD E. Voltage dependent calcium channels in plant vacuoles. *Science* 1992; **255**: 1567–1570.
- [41] PUGH EN jr., LAMB TD. Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1141**: 111–149.
- [42] REID RJ, TESTER M. Measurements of  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes in intact plant cells. *Phil Trans Roy Soc London, Ser B* 1992; **338**: 73–82.
- [43] SATTER R, MORAN N. Ionic channels in plant cell membranes. *Physiol Plantarum* 1988; **72**: 816–820.
- [44] SCHROEDER JL, THULEAU P.  $\text{Ca}^{2+}$  channels in higher plant cells. *Plant Cell* 1991; **3**: 555–559.
- [45] TAYLOR CW, MARSHALL ICB. Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a complex relationship. *TIBS* 1992; **17**: 403–407.
- [46] TAYLOR, AR, ROBERTS SK, BOWNLEE C. Calcium and related channels in fertilization and early development of *Fucus*. *Phil Trans Roy Soc London, Ser B* 1992; **338**: 97–104.
- [47] TESTER M. Plant ion channels: whole-cell and single-channel studies. *New Phytol* 1990; **114**: 305–340.
- [48] TESTER M, MACROBBIE EAG. Cytoplasmic calcium affects the gating of potassium channels in the plasma membrane of *Chara corallina*: a whole-cell study using calcium-channel effectors. *Planta* 1990; **180**: 569–581.

- [49] THULEAU P, GRAZIANA A, CANUT H, RANJEVA R. A 75-kDa polypeptide, located primarily at the plasma membrane of carrot cell suspension cultures, is photoaffinity labeled by the calcium channel blocker LU49888. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 10000–10004.
- [50] THULEAU P, GRAZIANA A, RANJEVA RA, SCHROEDER JI. Solubilized proteins from carrot (*Daucus carota* L.) membranes bind calcium channel blockers and form calcium-permeable ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 765–769.
- [51] TIMMERS ACJ. Imaging of polarity during zygotic and somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, 1993.
- [52] TRETYN A. Influence of red light and acetylcholine on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by oat coleoptile cells. *Cell Biol Int Rep* 1987; **11**: 887–896.
- [53] TRETYN A, KENDRICK RE, BOSSEN ME. The effect of a calcium antagonist, nifedipine and agonist, Bay K-8644, on the phytochrome controlled swelling of etiolated wheat protoplasts. *Physiol Plant* 1990; **78**: 230–235.
- [54] TRETYN A, KENDRICK RE, WAGNER G. The role(s) of calcium ions in phytochrome action. *Photochem Photobiol* 1991; **54**: 1135–1155.
- [55] TRETYN A, KENDRICK RE, KOPCEWICZ J. Cytochemical studies on phytochrome-mediated changes of  $\text{Ca}^{2+}$  localization in etiolated oat coleoptile cells. *J Exp Bot* 1992; **43**: 439–448.
- [56] TSIEN RW, TSIEN RY. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* 1990; **6**: 715–760.
- [57] TSIEN RW, HESS P, MCCLESKEY A, ROSENBERG RL. Calcium channels: Mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Ann Rev Biophys Chem* 1987; **16**: 265–290.
- [58] TSUNODA Y. Receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and crosstalk in stimulus secretion coupling. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1154**: 105–156.
- [59] VanBREEMAN C, SAIDA K. Cellular mechanisms regulating  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 1989; **51**: 314–329.
- [60] WAYNE RO, HEPLER PK. Red light stimulates an increase in intracellular calcium in the spores of *Onoclea sensibilis*. *Plant Physiol* 1985; **77**: 8–11.
- [61] WEISENSEEL MH, RUPPERT HK. Phytochrome and calcium ions are involved in light-induced membrane depolarisation in *Nitella*. *Planta* 1977; **137**: 225–229.
- [62] WILLIAMSON RE, ASHLEY CC. Free  $\text{Ca}^{2+}$  and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* 1982; **296**: 647–651.
- [63] YANG J, ELLINOR PT, SATHER WA, ZHANG J-F, TSIEN RW. Molecular determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity and ion permeation in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Nature* 1993; **366**: 158–161.
- [64] YELLEN G. Calcium channels. Structure and selectivity. *Nature* 1993; **366**: 109–110.
- [65] ZHERELEVA OM, KATAEV AA, BERESTOVSKY GN. Regulation of calcium channels of the plasmalemma of *Nitellopsis obtusa* by intracellular calcium. *Biophysics* 1987; **32**: 348–349.

Otrzymano: 15.03.1994 r.

Przyjęto: 20.07.1994 r.

Adres autora: 87-100, Toruń, ul. Gagarina 9



## SPRAWOZDANIE Z DZIAŁALNOŚCI ZARZĄDU FUNDACJI BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ\* ZA OKRES GRUDZIEŃ 1990 -- MAJ 1994

### 1. ZAŁOŻENIE FUNDACJI I JEJ STATUT

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej (dalej nazywana Fundacją) powstała w grudniu 1990 r. na podstawie aktu notarialnego z dn. 20 marca 1990 r. sporządzonego w Kościanie pod Poznaniem. Profesorowie: Tadeusz Cichocki, Jerzy Kawiak, Andrzej Łukaszyk, Andrzej Myśliwski, Maciej Zabel postanowili założyć fundację o nazwie "Fundacja Postępów Nauki o Biologii Komórki" z funduszem założycielskim 1 mln złotych. Do funduszu założycielskiego dołączyła również udział prof. dr Maria Olszewska, która formalnie nie figuruje jako fundator, ale faktycznie jest fundatorem. Fundacja została zarejestrowana w Sądzie Rejonowym dla Warszawy-Pragi 30 października 1990 r., gdzie powtórzono wolę tych samych fundatorów, zatwierdzono Statut Fundacji, określono cele Fundacji, przyjęto decyzję Min. Zdrowia i Opieki Społecznej wydaną w porozumieniu z Min. Finansów o możliwości prowadzenia przez Fundację działalności gospodarczej. Zatwierdzono skład Zarządu: Jerzy Kawiak – prezes, Maciej Zabel – sekretarz generalny, Maciej Kawalec – skarbnik; zatwierdzono skład Rady Fundacji: Zofia Osuchowska – przewodnicząca, członkowie: Tadeusz Cichocki, Antoni Horst, Józef Kałuża, Aleksander Koj, Włodzimierz Korohoda, Andrzej Łukaszyk, Andrzej Myśliwski, Maria Olszewska, Aleksandra Stojalowska, Jan Steffen.

Podczas sporządzania Statutu nieocenionej pomocy udzieliła pani mecenas Irena Pawlak z Poznania, której Zarząd serdecznie dziękuje.

W czerwcu 1992 r. podczas zebrania Fundatorów, Zarządu i Rady Fundacji postanowiono zmienić nazwę Fundacji na "Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej". Umieszczono też w Statucie zdanie o wspólnym działaniu Fundacji z Polską Siecią Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN (dalej nazywaną Siecią UNESCO/PAN) oraz przyjęto, że wiceprezesem Fundacji będzie aktualny Dyrektor Sieci UNESCO/PAN. Zmiany te zostały odpowiednio zarejestrowane w Sądowym rejestrze Fundacji.

### 2. PRACA CZŁONKÓW ZARZĄDU

Zarząd we wspomnianym składzie i po dołączeniu do niego w 1992 r. doc. Macieja Nałęcza jako wiceprezesa pracował społecznie. Również społecznie pomagały w pracy Zarządu Fundacji przy prowadzeniu wielu prac, a szczególnie przy rozliczaniu

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel 340344, fax 340470

konferencji naukowych wspólnie z Siecią UNESCO/PAN, panie: doc. dr Małgorzata Balińska, panie Jolanta Puzio i Małgorzata Michalik z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego oraz p. Małgorzata Siarnecka z Zakładu Cytologii Klinicznej CMKP przy rozprowadzaniu zeszytów czasopisma "Postępy Biologii Komórki". Zarząd składa tym osobom serdeczne podziękowania.

Zarząd składał roczne sprawozdania Fundatorom.

### 3. DZIAŁALNOŚĆ WYDAWNICZA

#### Postępy Biologii Komórki

Początkowo główną troską Zarządu Fundacji było utrzymanie wydawania czasopisma "Postępy Biologii Komórki" (PBK). Do roku 1990 czasopismo było wydawane przez Państwowe Wydawnictwo Naukowe (PWN) z dotacji otrzymywanych z Polskiej Akademii Nauk dla Polskiego Towarzystwa Anatomicznego (PTA). Nakład czasopisma był przekazywany RSW "Prasa-Ruch" do rozprowadzenia, a fundusze z działalności wydawniczej po odliczeniu należności za opracowanie, druk i kolportaż nie wracały do wydawnictwa ani do PTA. Wobec zmian ekonomicznych zachodzących w kraju PWN na wniosek Redakcji zrezygnowało z druku PBK od stycznia 1991 r. Zawarliśmy umowę z Wydawnictwem SGGW w Warszawie o dalszym drukowaniu czasopisma. Również wycofaliśmy się z kolportażu czasopisma przez "Ruch" wobec dużych kosztów, które próbowała nam narzucić ta instytucja i postanowiliśmy rozprowadzać PBK przez Fundację.

Fundacja pod koniec 1990 r. wystąpiła bezpośrednio do wiceprezesa Polskiej Akademii Nauk, prof. dr hab. Leszka Kuźnickiego o pomoc w dalszym wydawaniu czasopisma i pomoc tę otrzymała (60 mln zł) z Wydziału II PAN jako przedpłatę dla Wydawnictwa SGGW na druk PBK w 1991 r. To umożliwiło systematyczne wydawanie czasopisma w 1991 r., a Wydawnictwo SGGW uczciwie wywiązało się ze zobowiązań. Zarząd Fundacji i Redakcja "Postępów" pragną serdecznie podziękować prof. L. Kuźnickiemu i Wydziałowi II PAN za tą bardzo istotną pomoc, jak również Wydawnictwu SGGW za dobrą współpracę.

Wydawanie PBK w 1991 r. z wcześniej przekazanych funduszy PAN umożliwiło Fundacji w tym okresie gromadzenie funduszy za prenumeratę czasopisma na jej koncie. Ten fundusz stał się rezerwowym "buforem", dzięki któremu możliwe było regularne wydawanie PBK w 1992 r., bowiem dotacje na druk czasopisma w tym okresie otrzymaliśmy z Komitetu Badań Naukowych (dalej w skrócie KBN) w grudniu 1992 r. do rozliczenia w ciągu... 14 dni, do końca 1992 r. Rozliczenie tej dotacji było możliwe tylko dzięki temu, że Fundacja miała gotowe rachunki za kolejno wydawane zeszyty PBK/1992, zapłacone z pieniędzy Fundacji zebranych za ubiegłoroczną prenumeratę.



Od 1993 r. czasopismo ukazuje się w nowej, lepszej szacie graficznej. Zaczęto też wydawać suplementy redagowane bądź pisane przez osoby spoza Redakcji, ale w porozumieniu z nią. Pierwsze dwa suplementy:

Suplement nr 1, autor: A. Klein – "Peptydowe czynniki wzrostowe";

Suplement nr 2, red. Halina Gabryś – "Postęp w badaniach ruchów komórkowych".

### Folia Histochemica et Cytobiologica

Fundacja od początku istnienia proponowała Redakcji czasopisma "Folia Histochemica et Cytobiologica" (FHC) współpracę, która rozpoczęła się dopiero w 1993 r., po przejęciu Redakcji przez doc. dr hab. Jana Litwina i doc. dr hab. Barbarę Bilińską. Pod koniec 1992 r. okazało się, że czasopismo ma długi w PWN za niezapłacony zeszyt 4/91, na który to cel Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików otrzymało fundusze, ale nie wykorzystało ich w terminie z powodu opóźnienia wydania zeszytu. Nie można było otrzymać na ten cel funduszy z KBN, dlatego Fundacja uregulowała ten dług. Umówiła się z Zarządem PTHiC i Redakcją, że pieniądze za prenumeratę FHC będą przekazywane na konto Fundacji dla wspomaganie dalszego wydawania "Folia" oraz zwrócenia należności za zeszyt 4/91. Ten dług został Fundacji zwrócony, a również wspieraliśmy wydawanie zeszytów "Folia" w 1993 r. w okresie, gdy jeszcze Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików nie otrzymało dotacji z KBN na wydawanie czasopisma. Fundacja, a nie jak dotąd PTHiC, wystąpiła do KBN o dotację na wydawanie "Folia" w 1994 r. za zgodą Zarządu PTHiC i Redakcji FHC. Powinno to uprościć operacje finansowe oraz rozliczenia podatkowe, bowiem sprzedaż czasopisma jest działalnością gospodarczą, z której należy się rozliczać co miesiąc oraz rocznie w Urzędzie Skarbowym.

### Wykaz linii komórek ludzkich i zwierzęcych w polskich ośrodkach naukowych

Fundacja wspólnie z Siecią UNESCO/PAN inicjowała wydanie pierwszego katalogu linii komórkowych dostępnych w kraju (70 mln zł). Wykaz został opracowany w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu pod kierunkiem doc. dr hab. Danuty Duś. Zarządowi wydaje się, że opracowanie to może przyczynić się do integracji środowiska naukowego. Zabiegi Zarządu Fundacji w tym kierunku będą szczegółowo przedstawione w dalszej części sprawozdania. Zdaniem Zarządu, powinien być wydany podobny katalog sond molekularnych dostępnych w kraju.

### Biuletyn Informacyjny Sieci UNESCO/PAN 1994

Biuletyn w roku 1994 został opracowany w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego. Koszty wydania (50 mln zł) pokryła Fundacja z dotacji KBN.

## Czasopismo Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. M. Kopernika "Wszechświat"

Fundacja przyczyniła się do unowocześnienia procesu wydawniczego jednego z najstarszych polskich czasopism naukowych "Wszechświat" przez zakupienie dla Redakcji komputera i drukarki w 1992 r. (30 mln zł).

### 4. WYRÓŻNIENIA DLA MŁODYCH PRACOWNIKÓW NAUKOWYCH

Fundacja przyznawała skromne wyróżnienia młodym pracownikom naukowym (do 30 lat) w formie opłacenia uczestnictwa w zjazdach naukowych. Wyróżnienia oraz dyplomy otrzymali:

w 1992 r. podczas Europejskiej Konferencji Anatomów w Krakowie:

**Janitz Michał** z Zakładu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu,  
**Jurgowiak Marek** z Akademii Medycznej w Bydgoszczy,  
**Krasowska Barbara** z Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie,  
**Olenderek Beata** z Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie,  
**Paskiewicz Ewa** z Akademii Medycznej w Warszawie,  
**Wilczyński Grzegorz** z Akademii Medycznej w Warszawie,

w 1993 r. podczas Konferencji Biologii Komórki we Wrocławiu:

**Bukszewicz Wiesława** z Uniwersytetu Warszawskiego,  
**Czyż Jarosław** z Uniwersytetu Jagiellońskiego,  
**Domaradzka-Lech Anna** z Uniwersytetu Warszawskiego,  
**Pierchalska Małgorzata** z Uniwersytetu Jagiellońskiego,  
**Włoga Dorota** z Uniwersytetu Warszawskiego,  
**Zeuschner Ewa** z Akademii Medycznej w Poznaniu,  
**Zimna Katarzyna** z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Osoby wyróżnione przedstawiły podczas konferencji doniesienia bądź plakaty.

W czerwcu 1994 r. została powołana stała Komisja Fundacji, która pod przewodnictwem prof. dr Zofii Osuchowskiej opracowała regulamin przyznawania nagród oraz będzie rozpatrywać wnioski, przyznawać wyróżnienia i dopilnuje ukazywania się komunikatów w tej sprawie w PBK.

### 5. POMOC W ORGANIZOWANIU KONFERENCJI NAUKOWYCH W KRAJU

Wspólnie z Siecią UNESCO/PAN Fundacja wystąpiła w 1992 i 1993 r. do KBN o dofinansowanie poprzez nią wielu krajowych konferencji naukowych. Wynikało to z porozumienia o wspólnym działaniu Fundacji z Siecią UNESCO/PAN, jak o tym wspomniano w punkcie 1. Głównym celem Zarządu Fundacji w tych działaniach było przetarcie nowych dróg i przekonanie odpowiedzialnych osób o konieczności dofinansowywania konferencji naukowych, co wcześniej nie było możliwe. Wymagało to wielu zabiegów i trudu. Obecnie organizatorzy konferencji naukowych mogą już



bezpośrednio występować do KBN o dofinansowanie ich działalności, a Fundacja zrezygnowała z tej aktywności.

Na organizację konferencji naukowych Fundacja otrzymała 300 mln zł w 1992 r. i 260 mln zł w 1993 r. z Komitetu Badań Naukowych. Z tych funduszy Fundacja wspierała organizację następujących konferencji naukowych:

**w 1992 r.:**

XXII seminarium naukowe Instytutu Biologii Molekularnej UJ nt. "Biologia komórki, ze szczególnym uwzględnieniem ruchów komórkowych i roli cytoszkieletu" w dniach 6–14.02.1993 r. organizowane przez prof. dr hab. W. Korohodę oraz dr hab. Halinę Gabryś (pierwsza rata – 15 mln zł);

konferencja nt. "Badania molekularno-genetyczne w diagnostyce nowotworów" w dn. 19.02.1993 r. i kurs nt. "Badania molekularne w diagnostyce" w lutym 1993 r. w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii PAM w Szczecinie organizowane przez dr hab. Jana Lubińskiego (40 mln zł);

konferencje naukowe Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu:

a) Ogólnopolska Sesja Sprawozdawcza Programów Badawczych PONT z zakresu biologii molekularnej i komórkowej w Poznaniu, marzec 1993 r. oraz

b) kurs "Sondy molekularne w biologii, medycynie i rolnictwie" w Poznaniu w marcu 1993 r. Konferencja i kurs były organizowane przez prof. dr hab. A. Legockiego. Na obie konferencje łącznie przekazano 130 mln zł;

konferencja naukowo-szkoleniowa Zakładu Amin Biogennych PAN w Łodzi nt. "Mechanizmy receptorowe i przepływ sygnału w komórce" w marcu 1993 r. zorganizowana przez prof. dr hab. J. Nowaka (15 mln zł);

V Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki w dn. 2–4.07.1993 r. we Wrocławiu organizowana przez prof. dr hab. St. Przystalskiego (pierwsza rata – 40 mln zł);

międzynarodowa konferencja naukowa pt. "Membrane physiology" w dniach 13–16.09.1993 r. w Toruniu organizowana w ramach XIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego przez prof. dr hab. L. Janiszewskiego (pierwsza rata – 30 mln zł);

ponadto przekazano 30 mln zł na unowocześnienie wydawania czasopisma "Wszechświat", jak o tym wspomniano wyżej w punkcie 3;

**w 1993 r.:**

XXII seminarium naukowe Instytutu Biologii Molekularnej UJ nt. "Biologia komórki, ze szczególnym uwzględnieniem ruchów komórkowych i roli cytoszkieletu" w dniach 6–14.02.1993 r. organizowane przez prof. dr hab. W. Korohodę oraz dr hab. Halinę Gabryś (druga rata – 15 mln zł);

V Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki w dn. 2–4.07.1993 r. we Wrocławiu organizowana przez prof. dr hab. St. Przystalskiego (druga rata – 90 mln zł);

międzynarodowa konferencja naukowa nt. "Membrane physiology" w dniach 13–16.09.1993 r. w Toruniu organizowana w ramach XIX Zjazdu Polskiego Towa-

rzystwa Fizjologicznego przez prof. dr hab. L. Janiszewskiego (druga rata – 30 mln zł);

konferencja nt. "Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej" w dn. 28.09.1993 r. w Wyższej Szkole Pedagogicznej w Krakowie organizowana przez prof. prof. H. Lacha i J. Vetulaniego (30 mln zł);

konferencja z zakresu ochrony własności intelektualnej nt. "Biotechnologia – inne oblicze" w dn. 10–12.10.1993 r. w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu organizowana przez prof. dr hab. T. Twardowskiego (40 mln zł);

kurs technik molekularnych nt. "Wybrane techniki molekularne – przygotowanie i wykorzystanie sond molekularnych" w dniach 13–15 grudnia 1993 r., organizowany w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu przez prof. dr hab. A. Legockiego i prof. dr hab. W.T. Markiewicza (30 mln zł);

tygodniowy kurs szkoleniowy pt. "Wybrane techniki in vitro w hodowli roślin" w maju 1994 r. w Zakładzie Botaniki Ogólnej Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, organizowany przez doc. dr hab. Macieja Zenktelea (25 mln zł).

## 6. ORGANIZACJA BANKU LINII KOMÓREK LUDZKICH I ZWIERZĘCYCH ORAZ BANKU SONDEK MOLEKULARNYCH

W Warszawie w dn. 15 kwietnia 1993 r. odbyło się wspólne zebranie Sieci UNESCO/PAN i Fundacji BKiBM w sprawie zorganizowania w kraju kolekcji linii komórkowych. Udział w tych staraniach zadeklarowali:

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu (IITD-PAN; doc. dr D. Duś), Instytut Biologii Molekularnej UJ w Krakowie (doc. dr H. Rokita), Zakład Histologii AM w Gdańsku (prof. A. Myśliwski), Zakład Cytologii Klinicznej CMKP w Warszawie (J. Kawiak). Zaproponowano, aby instytucją centralną był istniejący Bank Linii Komórkowych w IITD-PAN. Pozostałe banki będą filiami ściśle współpracującymi. Zaplanowano współpracę ze znanymi kolekcjami linii komórkowych, takimi jak: amerykańska ATCC i europejska ECACC. Z tą ostatnią instytucją nawiązano kontakt i przeszkolono tam jedną osobę (doc. dr Danutę Duś). Celem organizacji, tutaj skrótowo nazywanej "Bank", jest rejestracja posiadanych w kraju zbiorów, polepszenie ich jakości, ujednoczenie i weryfikacja używanego do badań materiału komórkowego oraz dostosowanie go do wymagań międzynarodowych. Uznano, że podniesie to jakość badań wykonanych na tych liniach oraz pozwoli na obniżenie kosztów weryfikacji linii komórkowych. Dobrze scharakteryzowane linie komórkowe stanowią podstawę do produkcji szczepionek, w biotechnologii oraz w diagnostyce medycznej i weterynaryjnej. Przewidywano też skutki współpracy w zakresie organizacji i prowadzenia banków integrujące środowisko naukowe.

Czyniono próby uzyskania dofinansowania instytucji biorących udział w planach Bank przez KBN, ale otrzymano odmowę. Zwrócono się w tej sprawie do Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, ale i tam otrzymano odmowę i równoczesną propozycję założenia wspólnie z Fundacją na rzecz Nauki Polskiej spółki z o.o. W tym etapie



rozmów dodatkowo zaplanowano utworzenie Banku Sond Molekularnych, który mógłby powstać w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (prof. dr hab. A. Legocki). W tym Banku uczestniczyłyby filie w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu (prof. dr hab. J. Nowak) i Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego (doc. dr hab. L. Kaczmarek). Po kilkukrotnych spotkaniach z przedstawicielami Fundacji na rzecz Nauki Polskiej założenie wspólnej spółki z o.o. przynoszącej dochody, co było warunkiem Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, uznano za nierealne. Planowane są dalsze starania zorganizowania obu wyżej wspomnianych banków.

*Prezes Fundacji*  
*Prof. dr hab. Jerzy Kawiak*

*Wiceprezes Fundacji*  
*Prof. dr hab. Maciej Nałęcz*

*Sekretarz Generalny*  
*Prof. dr hab. Maciej Zabel*

Sprawozdanie zostało przyjęte w dniu 20.05.1994 r. przez Fundatorów prof. prof. T. Cichockiego, A. Łukaszyka i A. Myśliwskiego sprawujących kontrolę nad działalnością Zarządu Fundacji.





## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wystania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację,

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbłki, informacje o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.]. Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

## TREŚĆ

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •	241
Komunikaty	242
WÓJCIK C.: Inhibitory kinaz zależnych od cyklin – Nowe geny przeciwnowotworowe	243
ŚPIEWLA E. J.: Oscylacyjny charakter zmian podstawowych właściwości komórek roślinnych	249
WIRTH-DZIĘCIOŁOWSKA E.: Transpozony i ich ewolucyjne znaczenie	263
KORDOWIAK A. M., TRZOS R.: Cytoprotekcyjne działanie prostaglandyn (na poziomie narządu, komórki oraz w układach <i>in vitro</i> )	275
TRZOS R., KORDOWIAK A. M.: Pochodne wanadu jako czynnik normalizujący kliniczne objawy cukrzycy	293
ROŻYNKOWA D.: Genetyczne regulacje apoptozy – programowanej śmierci komórek	303
TRETYN A.: Transport jonów wapnia przez błony eukariotyczne. I. Kanały wapniowe	319
Sprawozdanie z działalności Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za okres: grudzień 1990 – maj 1994	341

**Warunki prenumeraty kwartalnika  
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

**Prenumerata na rok 1995**

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1995 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 2 suplementy) na rok 1995:

- dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł,
- a dla odbiorców indywidualnych 160 000 zł.

*Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:*

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

*Price per year 40 dollars USA.*

**Indeks 369705**