

Index
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 24 NR-3'97
(301–400)

Postępy Biologii Komórki

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

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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: – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 340 344, fax 340470.

*Recenzenci rocznika PBK są publikowani w zeszycie 4.
Referees of the volume are published in issue 4.*

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 7,5. Ark. druk.6,25. Podpisano do druku w maju 1997 r. Druk ukończono w czerwcu 1997 r.

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- W artykułach na stronach 303 i 315 omówiono metabolizm selenu w komórce. Opisano jego znaczenie jako składnika centrum aktywnego peroksydazy glutationowej. Enzym ten uczestniczy w obronie przed stresem oksydacyjnym. Selen ma też działanie antynowotworowe.
- Najlepiej poznany mechanizm naprawy DNA jest naprawa przez wycinanie. Funkcjonują dwa rodzaje takiej naprawy. Jeden, zależny od transkrypcji, jest specyficzny dla nici przepisywanej. Drugi usuwa uszkodzenia z DNA nieaktywnego transkrypcyjnie. Bliższy opis tych mechanizmów Czytelnik znajdzie na stronie 325.
- Znaczenie ewolucyjne komunikacji międzykomórkowej przez połączenia szczelinowe, jawi się nam w perspektywie ich obecności w większości tkanek (artykuł na stronie 339). Tylko nieliczne populacje komórek są pozbawione połączeń szczelinowych, stanowiących kanały lub ich zespoły. Takie połączenia zapewniają ciągłość cytoplazmatyczną połączonych komórek. Nie mają takich połączeń komórki krwi oraz mięśni szkieletowych.
- Budowę i funkcje białek surfaktantu płucnego znajdzie Czytelnik na stronie 375.

METABOLIZM SELENU W KOMÓRCIE I ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

METABOLISM OF SELENIUM IN CELL AND ORGANISM

Halina Małgorzata ŻBIKOWSKA

Katedra Biochemii Ogólnej, Instytut Biochemii UŁ, Łódź

Streszczenie: Selen jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym znanym przede wszystkim jako składnik centrum aktywnego peroksydazy glutationowej – enzymu uczestniczącego w procesie obrony organizmu przed stresem oksydacyjnym. Selen jest dostarczany do organizmu w formie organicznej głównie jako selenometionina i selenocysteina oraz nieorganicznej w postaci seleninów i selenianów. Biologiczna aktywność Se zależy zarówno od ilości, jak i formy spożywanego selenu, a także od sposobu metabolizowania tego pierwiastka w organizmie. W niniejszej pracy przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący metabolizmu związków selenu u bakterii i roślin oraz u ssaków, ze szczególnym uwzględnieniem roli grup tiolowych w tym procesie. Omówiono też sposoby oznaczania selenu w organizmie człowieka.

Słowa kluczowe: selenin, selenian, glutation, selenodiglutation, metabolizm selenu, selenobiałka

Summary: Selenium is an essential trace element known to constitute an active center of glutathione peroxidase – an enzyme protecting different compartments of the organism from oxidative stress. Selenium enters the organism either in organic form (e.g. selenomethionine and selenocysteine) or as inorganic compounds mainly sodium selenite and selenate. Biological activity of selenium depends on the amount and chemical forms of the element in the diet as well as its metabolic pathways in human organism. In this paper metabolism of selenium compounds in bacteria, plants and mammals, and especially the role of thiols in this process are described. Some ways of determination of selenium status in humans are also discussed.

Key words: selenite, selenate, glutathione, selenodiglutathione, selenite metabolism, selenoproteins

Wykaz stosowanych skrótów: **APS** – adenozyjno-5'-fosfosiarczan, **DMSe** – dimetyloselenek, **DMSeO** – dimetyloselenotlenek, **DMSO** – dimetylosulfotlenek, **GR** – reduktaza glutationowa, **GSH** – glutation, **GSH-Px** – peroksydaza glutationowa, **GSSG** – disulfid glutationu, **GSSeH** – glutationyloselenol, **GS-Se-SG** – selenodiglutation, **PAPS** – adenozyjno-3'-fosfo-5'-fosfosiarczan, **SeCys** – selenocysteina, **SeMet** – selenometionina, **TMSe⁺** – jon trimetyloseleniowy, **Trx** – tioredoksyna

1. WSTĘP

Selen (Se) jest pierwiastkiem należącym do VI grupy układu okresowego i pod względem właściwości chemicznych wykazuje bliskie pokrewieństwo do siarki. Pogląd o wyłącznie toksycznym działaniu selenu na organizmy żywe utrzymywał się aż do roku 1957, kiedy to Schwartz i Foltz po raz pierwszy zwrócili uwagę na jego niezbędność w pożywieniu [51]. Od tego czasu selen jest zaliczany do pierwiastków śladowych o istotnym znaczeniu zarówno dla zwierząt, jak i człowieka. Wyjątkowe zainteresowanie tym pierwiastkiem datuje się od odkrycia w 1973 roku, że wchodzi on w skład centrum aktywnego peroksydazy glutationowej – enzymu uczestniczącego w procesie obrony organizmu przed stresem oksydacyjnym [19, 48]. Najwcześniej poznanym dowodem świadczącym o znaczeniu selenu w diecie człowieka była jego rola w zapobieganiu chorobie Keshan (kardiomiopatie u dzieci i młodzieży) i choroby Kashin-Beck (zwyrodnienie stawów) występujących w regionach Chin o bardzo niskiej zawartości selenu w glebie [20]. Badania epidemiologiczne oraz badania przeprowadzane na zwierzętach laboratoryjnych wskazują, że niedobór selenu w diecie może być związany ze zwiększonym ryzykiem zachorowalności na niektóre typy nowotworów [6] oraz na choroby układu krążenia [32, 55], chociaż dane na ten temat są kontrowersyjne [22, 39, 49, 61]. Stwierdzono ponadto, że selen pełni rolę komórkowego antyoksydanta [8, 12], wykazuje działanie ochronne przed toksycznością metali ciężkich, między innymi rtęci [9, 25, 34] i cisplatyny – leku antynowotworowego [2, 41]. Selen ma także właściwości antykarcinogenne [14] i antymutagenne [52]. Zwraca się uwagę na korzystne działanie selenu w schorzeniach serca [33]. Pierwiastek ten wzmacnia również funkcjonowanie układu odpornościowego [31, 59], działa przeciwwirusowo i łagodzi przebieg choroby u pacjentów zarażonych wirusem HIV [50]. Ostatnio wykazano, że selen w formie selenianu sodowego wykazuje działanie insulinopodobne (obniża poziom glukozy w osoczu) u szczurów z cukrzycą wywołaną streptozotocyną [3, 38]. Selenin sodowy, podobnie jak insulina, hamuje stymulowany glukagonem rozpad glikogenu w wątrobie szczura [47].

W większych stężeniach, o czym mowa niżej, związki selenu są bardzo toksyczne zarówno dla zwierząt, jak i dla człowieka. W przeciwieństwie do większości pierwiastków śladowych selen charakteryzuje się bardzo niewielką granicą bezpieczeństwa między niedoborem a dawką toksyczną [7, 20] (tab. 1). Selen o stężeniu powyżej 1 μM w formie seleninu sodowego hamuje proliferację komórek, replikację DNA i syntezę białek [53], może też być czynnikiem mutagennym [1]. Nadmiar selenu (seleninu), może również prowadzić do stresu oksydacyjnego i wzmocnienia peroksydacji lipidów [11] oraz do tworzenia kompleksów z metalami (głównie z cynkiem), które odkładane w niektórych komórkach mózgu i przednim płacie przysadki mogą prowadzić do dysfunkcji tych organów [26].

TABELA 1. Zapotrzebowanie człowieka na selen *

Wyszczególnienie	µg / dobę	Piśmiennictwo
Dzienne zapotrzebowanie (USA)	50–70	[7, 20]
Minimalne zapotrzebowanie (Nowa Zelandia)	20	[7, 20]
Zalecana niezbędna i bezpieczna dawka uzupełniająca	50–200	[10]
Zalecana ilość w żywnieniu pozajelitowym	20–150	[20]
Dawka toksyczna	powyżej 600	[7]

Prawidłowe stężenie Se w surowicy: 1–1,2 µM

* Ustalenie zakresu norm stężeń selenu oraz poziomu jego dziennego zapotrzebowania dla określonej populacji jest trudne ze względu na zróżnicowaną zawartość tego pierwiastka w ekosystemach, jak i różną biodostępność poszczególnych form Se.

Badania epidemiologiczne prowadzone w latach osiemdziesiątych w krajach skandynawskich, a ostatnio rozszerzone na kraje Europy Zachodniej i Środkowej – Austrię [58], Włochy [42] i Czechy [36], wskazują na istotną rolę określonej podaży selenu na stan zdrowia populacji. Ustalona niezbędna i jednocześnie bezpieczna dla człowieka dawka selenu waha się od 50 do 200 µg/dobę w zależności od regionu [40], 70 µg dla mężczyzn i 55 µg dla kobiet (ok. 0,87 µg/kg masy ciała/dobę) [46]. Światowa Organizacja Zdrowia zaleca spożywanie Se w ilości 40–100 µg/dobę [43], a w USA proponowano większą dobową ilość selenu 250–350 µg [10]. Taka ilość jest konieczna do uzupełnienia ubytku selenu wydalanego dziennie przez zdrowy organizm w normalnych warunkach życia. Wiele czynników, takich jak: ciąża, wiek, poziom witaminy E czy stres oksydacyjny, może jednak wpływać na zwiększone zapotrzebowanie na selen [10, 63]. Nierównomierne rozmieszczenie selenu na kuli ziemskiej sprawia, że jego pobieranie z pożywieniem i poziom we krwi różni się w różnych populacjach ludzi nawet o dwa rzędy wielkości. Niską zawartość selenu w glebie stwierdzono na terenach Chin w regionie Keshan, niskie stężenie tego pierwiastka występuje także w Europie, głównie w Skandynawii, w niektórych częściach USA oraz w Nowej Zelandii. W Finlandii, w celu podniesienia zawartości selenu w produktach rolnych od 1984 roku stosuje się nawożenie upraw z dodatkiem selenianu sodowego [13, 17].

2. METABOLIZM SELENU U BAKTERII I ROŚLIN

Selen w przyrodzie występuje zarówno w formie nieorganicznej, jak i organicznej (tab. 2). Główną rolę w transformacji obu form odgrywają mikroorganizmy uczestniczące w obiegu selenu na Ziemi. W warunkach tlenowych, w wodzie oraz glebie, selen występuje głównie w formie selenianu (Se^{6+}) i seleninu (Se^{4+}). Jedną z podstawowych reakcji przeprowadzanych przez liczne bakterie, m.in. *Salmonella sp.* i *Veillonella sp.*, jest redukcja seleninu do selenu pierwiastkowego (Se^0). Redukcję selenianu do seleninu mogą przeprowadzać bakterie redukujące siarczany

Tabela 2. Powszechnie występujące nieorganiczne i organiczne związki selenu

Wzór chemiczny	Nazwa
SeO ₂	dwutlenek selenu
H ₂ SeO ₃	kwasy selenawy
H ₂ SeO ₄	kwasy selenowy
Na ₂ SeO ₃	selenin sodowy
Na ₂ SeO ₄	selenian sodowy
GS-Se-SG	selenodiglutation
GS-Se-H	glutationyloselenol
H ₂ Se	selenek wodoru
CH ₃ Se-H	metyloselenol
(CH ₃) ₂ Se	dimetyloselenek
(CH ₃) ₃ Se ⁺	jon trimetyloseleniowy
(CH ₃) ₂ SeO	dimetyloselenotlenek
H-Se-CH ₂ CH(NH ₂)COOH	selenocysteina
CH ₃ -Se-CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)COOH	selenometionina
COOH(NH ₂)CHCH ₂ -Se-CH ₂ CH(NH ₂)COOH	selenocystyna
NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -Se-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	selenocystamina
CH ₃ -Se-CH ₂ -CH(NH ₂)COOH	Se-metyloselenocysteina
H-Se-CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)COOH	selenohomocysteina
COOH-CH(NH ₂)-CH ₂ -Se-CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)COOH	selenocystationina

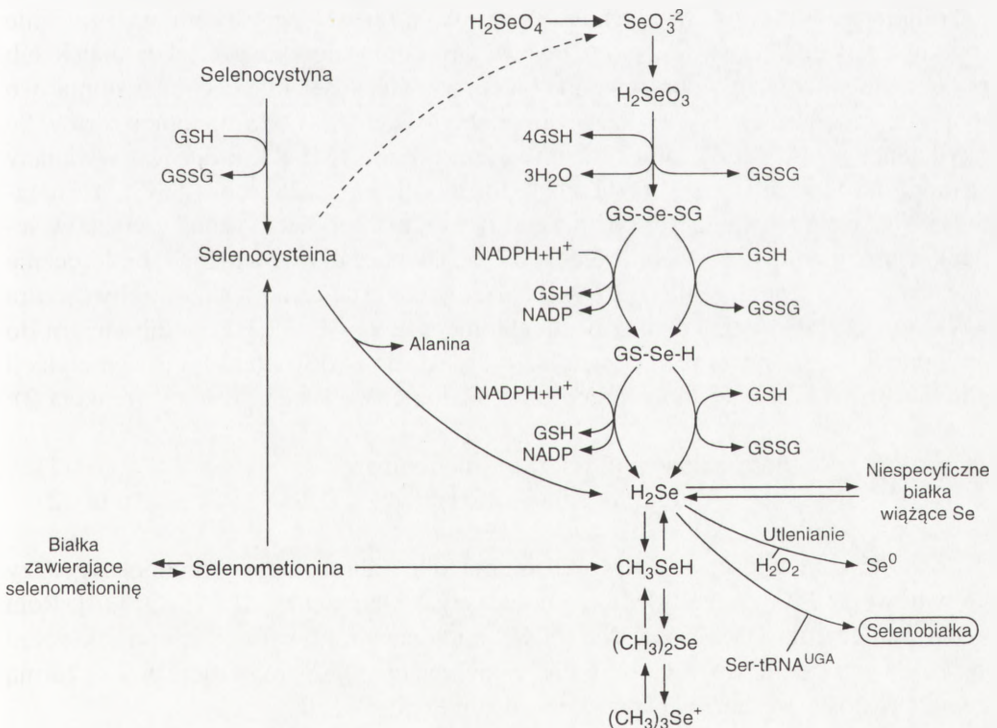
[27]. Dalsza redukcja Se⁰ do selenku (Se²⁻) zachodzi przypuszczalnie tylko drogą biosyntezy, prowadząc do powstawania selenoaminokwasów i selenobiałek.

Formą selenu najlepiej przyswajalną z gleby przez większość roślin jest selenian, w mniejszym stopniu również selenin. Istnieją rośliny, które mają wyjątkową zdolność gromadzenia selenu (niektóre gatunki z rodzajów: *Astragalus*, *Xylorrhiza*, *Oonopsis* czy *Stanleya*). W takich roślinach, zwanych akumulatorami selenu, zawartość tego pierwiastka dochodzi aż do 2–3 % suchej masy. Selen magazynowany jest w roślinach w formie aminokwasów, spośród których oprócz powszechnie występującej selenometioniny i selenocysteiny stwierdzono również obecność rzadkich aminokwasów, takich jak: Se-metyloselenocysteina, selenocystationina, selenocystyna i selenohomocysteina [56, 62] (tab. 2). Rośliny, które nie akumulują selenu (trawy, zboża), pobrany z gleby nieorganiczny selen metabolizują do selenometioniny – wolnej lub wbudowanej do białek. Biologiczna degradacja organicznych związków selenu prowadzi do różnych produktów końcowych, takich jak: Se⁰, selenki i metyloselenki. Lotny dimetyloselenek jest formą selenu najczęściej wydzielaną do atmosfery przez rośliny akumulujące selen oraz przez mikroflorę gleby [62].

3. METABOLIZM SELENU U SSAKÓW

Biologiczna aktywność selenu jako niezbędnego składnika pożywienia człowieka i zwierząt, a także jego działanie toksyczne i antynowotworowe zależą przede wszy-

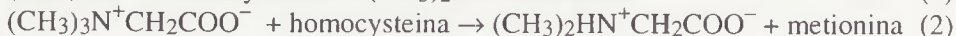
stkim od sposobu metabolizowania tego pierwiastka w organizmie. Ze względu na chemiczne podobieństwo selenu i siarki wiele danych wskazuje, że metabolizm obu pierwiastków przebiega tym samym lub podobnym szlakiem. Mimo to przemiana selenu u ssaków nadal nie jest dostatecznie poznana. Hipotetyczny schemat tego procesu wg Sunde [56] oraz Spallholza [54] przedstawiono na rysunku 1. Zwierzęta, w przeciwieństwie do mikroorganizmów i roślin, nie potrafią syntetyzować selenometioniny (SeMet) bezpośrednio z nieorganicznego selenu. Selenocysteina (Se-Cys) może być syntetyzowana z SeMet, podobnie jak cysteina z metioniny [15] lub podczas syntezy selenobiałek z nieorganicznych form selenu [56]. Degradacja SeMet prawdopodobnie zachodzi, wspólnym dla metioniny szlakiem, na drodze transaminacji przy udziale enzymu podobnego do L-metionino- γ -liazy (EC 4.4.1.11), opisanego przez Esaki i wsp. [15]. Selenocysteina jest metabolizowana innym niż cysteina szlakiem, przy udziale specyficznego enzymu, określonego przez Esaki i wsp. [16] jako selenocysteino- β -liaza. Enzym ten rozkłada SeCys do alaniny i selenku wodoru. Jedynym dobrze poznany szlakiem metabolizmu selenu u zwierząt jest stopniowa redukcja seleninu do selenku, a następnie jego metylacja [2, 54,



Rys. 1. Schemat metabolizmu nieorganicznych i organicznych związków selenu u ssaków (wg Sunde [56] i Spallholza [54], zmodyfikowano)

56]. Niewiele wiadomo na temat konwersji selenianu do seleninu. Możliwe, że w reakcji tej uczestniczą analogi adenozy-no-5'-fosfosiarczanu (APS) i (lub) adenozy-no-3'-fosfo-5'-fosfosiarczanu (PAPS) [56].

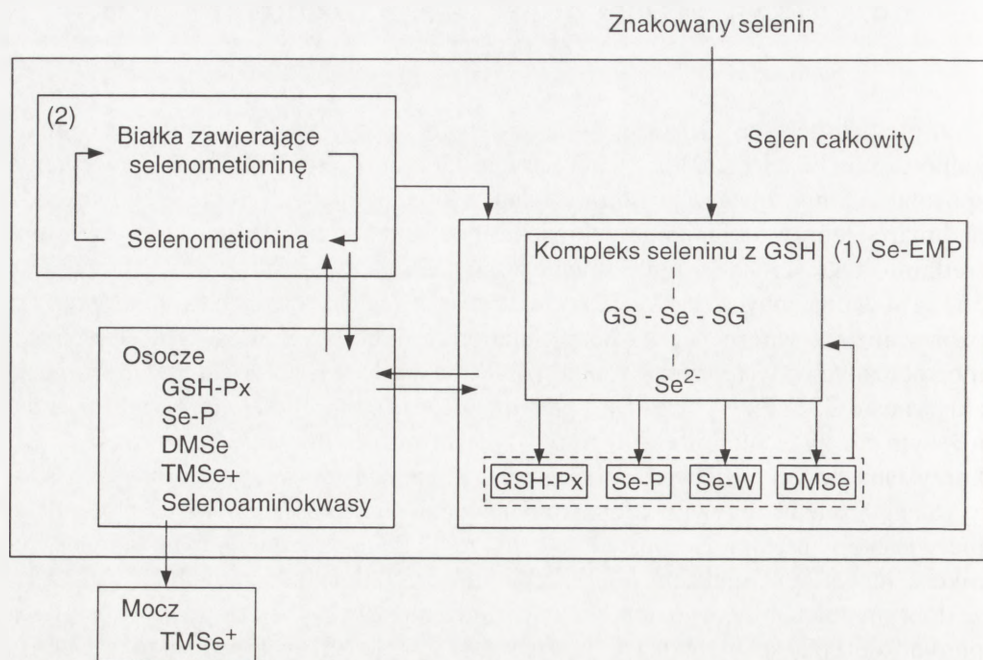
Pierwszym etapem na szlaku przemiany seleninu w komórce jest chemiczna (nieenzymatyczna) reakcja seleninu z glutationem (GSH) i utworzenie selenodiglutationu (GS-Se-SG). Jedna cząsteczka seleninu reaguje z czterema cząsteczkami GSH. *In vitro* selenin może reagować również z innymi niskocząsteczkowymi tiolami (cysteina, merkaptotetanol) tworząc odpowiednie selenotrisulfidy, ale nie wiadomo jeszcze czy reakcja taka zachodzi także *in vivo* [21]. Przypuszczalnie interakcja seleninu z innymi tiolami mogłaby mieć znaczenie fizjologiczne w warunkach obniżonego poziomu GSH w komórce. Selenodiglutation, w obecności reduktazy glutationowej (GR), ulega dalszej przemianie do glutationyloselenolu (GS-SeH). Sugeruje się, że w reakcji tej może brać udział również tioredoksyna (Trx), powszechnie występujący enzym o masie cząsteczkowej 12 kDa, wykazujący szeroką specyficzność substratową [4, 5, 35]. Tioredoksyna ssaków lub cały układ tioredoksyna/reduktaza tioredoksyny (TR; EC 1.6.4.5) redukuje zarówno selenin, jak i GS-Se-SG do selenku (HSe⁻). Selenek wodoru jest wspólnym pośrednim metabolitem powstającym w przemianie wszystkich form selenu w komórce i zależnie od zapotrzebowania na Se, może być wykorzystany do syntezy selenobiałek lub dalej metabolizowany w procesie metylacji. Metylacja selenku zachodzi stopniowo poprzez metyloselenol (CH₃SeH) do dimetyloselenku (DMSe), lotnej formy Se wydalanej przez płuca i jonu trimetyloseleniowego (TMSe⁺), który jest wydalany z moczem. Uważa się, że metylowane formy selenu (DMSe oraz TMSe⁺), charakteryzujące się niewielką toksycznością, są produktami detoksykacji związków selenu w organizmie [23]. Metyloselenki nie są, jak początkowo sądzono, biologicznie nieaktywne. Goeger i Ganther [23] prowadząc badania na komórkach wątroby szczura wykazali, że metylotransferaza betaina:homocysteina (EC 2.1.1.5), lub enzym do niej podobny, przeprowadza demetylację TMSe⁺ do DMSe. Reakcja transmetylacji dla TMSe⁺ (reakcja 1) może przebiegać analogicznie jak dla betainy (reakcja 2):



Z kolei dimetyloselenek jest substratem dla mikrosomalnej monoooksygenazy flawinowej (FMO), która utlenia go do dimetyloselenotlenku (DMSeO) [24]. Rola reakcji utleniania DMSe do DMSeO w biologicznej aktywności selenu jak dotąd jest niewyjaśniona. Możliwe, że odwracalne reakcje utleniania i metylacji są formą regulacji ilości wydalanego przez płuca dimetyloselenku.

4. OCENA POZIOMU SELENU W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

Z powodu znacznych różnic w spożywaniu selenu, aby zapewnić niezbędną i jednocześnie bezpieczną ilość tego pierwiastka u ludzi, konieczne jest opracowanie sposobu monitorowania poziomu selenu w organizmie. Jak dotąd niedobór bądź nadmiar selenu w organizmie człowieka można stwierdzić jedynie metodami pośrednimi. Określa się stężenie selenu w płynach ustrojowych (osocze, krew) [30, 55, 64] i w dostępnych tkankach, np. we włosach i w paznokciach [22], lub poprzez oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w osoczu i elementach morfotycznych krwi (erytrocyty, płytki) [37]. Ze względu na to, że całkowita ekspresja aktywności GSH-Px występuje już przy niewielkim spożyciu selenu, często znacznie niższym niż przeciętna dawka, w praktyce ta metoda nie zawsze może być wykorzystana do oceny zawartości Se w organizmie. Przy wyższych dawkach spożywanego selenu aktywność enzymu nie odzwierciedla rzeczywistej ilości tego pierwiastka w ustroju. Bezpośrednie oznaczanie Se też nie daje powtarzalnych wyników, nawet w warunkach stałej diety selenowej. Badania ostatnich lat wykazały, że dobrym wskaźnikiem poziomu selenu u ludzi może być, obok aktywności GSH-Px, pomiar stężenia selenobiałka P w osoczu [28, 45]. Na uwagę zasługują również próby zastosowania izotopów selenu, głównie ^{74}Se , ^{76}Se i ^{77}Se do oznaczania metabolizmu Se w organizmie [18, 60]. W odróżnieniu od radioaktywnego ^{75}Se , izotopy te nie emitują promieniowania i wobec tego nie są szkodliwe dla zdrowia. Prace z zastosowaniem izotopów selenu były prowadzone głównie przez badaczy amerykańskich [29, 44, 57]. Przy założeniu, że w organizmie są obecne dwie biochemicznie różne puli selenu – wymienialna i zmagazynowana, oznaczano ilość znakowanego selenu wydalanego z moczem i kałem w określonym czasie po podaniu znacznika (rys. 2). W skład pierwszej puli metabolicznej (1) selenu wymienialnego (Se-EMP, ang. *selenite-exchangeable metabolic pool*) wchodzi wszystkie funkcjonalnie ważne związki selenu, pośrednie i końcowe, powstające w czasie jego przemiany. Natomiast pulę zmagazynowaną (2) stanowią białka zawierające selenometioninę. Obliczona tą metodą ilość selenu obecnego w puli metabolicznej w określonym czasie była zależna od dawki spożytego selenu, a uzyskane wyniki porównywalne z poziomem selenu oznaczonym innymi metodami [29]. Wykorzystanie tej metody na szerszą skalę wymaga jednak dalszych badań.



Rys. 2. Schemat metabolizmu seleninu w organizmie człowieka (wg Janghorbani i wsp. [29], zmodyfikowano): GSH-Px – peroksydaza glutationowa, Se-P – selenobiałko P, Se-W – selenobiałko W, GS-Se-SG – selenodiglutation, Se²⁻ – selenek, DMSe – dimetyloselenek, TMSe⁺ – jon trimetyloseleniowy, Se-EMP – wymiennalna metaboliczna pula selenu

LITERATURA

- [1] BALANSKY RM. Comutagenic and coclastogenic effects of selenium in vitro and in vivo. *Mutation Res* 1991; **236**: 231–236.
- [2] BALDEW GS, MOL JGJ, DE KANTER FJJ, VAN BAAR B, DE GOEIJ JJM, VERMEULEN NPE. The mechanism of interaction between cisplatin and selenite. *Biochem Pharmacol* 1991; **41**: 1429–1437.
- [3] BECKER DJ, REUL B, OZCELIKAY AT, BUCHET JP, HENQUIN JC, BRICHARD SM. Oral selenate improves glucose homeostasis in partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia* 1996; **36**: 3–11.
- [4] BJORNSTEDT M, XUE J, HUANG W, AKESSON B, HOLMGREN A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994; **269**: 29382–29384.
- [5] BJORNSTEDT M, HAMBERG M, KUMAR S, XUE J, HOLMGREN A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem* 1995; **270**: 11761–11764.
- [6] CLARK LC, CANTOR KP, ALLAWAY WH. Selenium in forage crops and cancer mortality in US counties. *Arch Environ Health* 1991; **46**: 37–42.

- [7] COMBS GF, COMBS SB. The nutritional biochemistry of selenium. *Ann Rev Nutr* 1984; **4**: 257–280.
- [8] COMBS Jr. GF, MERCURIO SD. Selenium and oxidative injury. [w] Alan R. [red.] Nutritional Diseases: Research Directions in Comparative Pathobiology. Liss Inc 1986: 347–358.
- [9] CUVIN-ARALAR MLA, FURNESS RW. Mercury and selenium interaction: A review, *Ecotoxicol Environm Safety* 1991; **21**: 348–364.
- [10] DHUR A, GALAN P, HERCBERG S. Relationship between selenium, immunity and resistance against infection. *Comp Biochem Physiol* 1990; **96C**: 271–280.
- [11] DOUGHERTY JJ, HOEKSTRA WG. Stimulation of lipid peroxidation in vivo by injected selenite and lack of stimulation by selenate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982; **169**: 209–215.
- [12] DOUILLET C, TABIB A, BOST M, ACCOMINOTTI M, BORSON-CHAZOT F, CIAVATTI M. A selenium supplement associated or not with vitamin E delays early renal lesions in experimental diabetes in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; **211**: 323–331.
- [13] EKHOLM P, YLINEN M, KOIVISTOINEN P, VARO P. Effects of general soil fertilization with sodium selenate in Finland on the selenium content of meat and fish. *J Agrical Food Chem* 1990; **38**: 695–698.
- [14] EL-BAYOUMY K. Evaluation of chemopreventive agents against breast cancer and proposed strategies for future clinical intervention trials. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 2395–2420.
- [15] ESAKI N, NAKAMURA T, TANAKA H, SUZUKI T, MORINO Y, SODA K. Enzymatic synthesis of selenocysteine in rat liver. *Biochemistry* 1981; **20**: 4492–4496.
- [16] ESAKI N, NAKAMURA T, TANAKA H, SODA K. Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. *J Biol Chem* 1980; **257**: 4386–4391.
- [17] EUROLA M, EKHOLM P, YLINEN M, KOIVISTOINEN P, VARO P. Effects of selenium fertilization on the selenium content of cereal grains, flour, and bread produced in Finland. *Cereal Chem* 1990; **67**: 334–337.
- [18] FINLEY JW, VANDERPOOL RA, KORYNTA E. Use of stable isotopic selenium as a tracer to follow incorporation of selenium into selenoproteins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; **210**: 270–277.
- [19] FLOHE L, GUNZLER WA, SHOCK HH. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Letters* 1973; **32**: 132–134.
- [20] FOX JM. Selenium: Nutritional implications and prospects for therapeutic medicine. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1992; **14**: 75–278.
- [21] FRENKEL GD, FALVEY D, MAC VICAR C. Products of the reaction of selenite with intracellular sulfhydryl compounds. *Biol Trace Elem Res* 1991; **30**: 9–18.
- [22] GARLAND M, MORRIS JS, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, SPATE VL, BASKETT CK, ROSNER B, SPEIZER FE, WILLETT WC, HUNTER DJ. 1995. Prospective study of toenail selenium levels and cancer among women. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**, 497–505.
- [23] GOEGER DE, GANTHER HE. Homocysteine-dependent demethylation of trimethylselenium ion and selenobetaine with methionine formation. *Arch Biochem Biophys* 1993; **302**: 222–227.
- [24] GOEGER DE, GANTHER HE. Oxidation of dimethylselenide to dimethylselenoxide by microsomes from rat liver and lung and by flavin-containing monooxygenase from pig liver. *Arch Biochem Biophys* 1994; **310**: 448–451.
- [25] GOYER RA. Nutrition and metal toxicity. *Am J Clin Nutr* 1995; **61**: 6S–650S.
- [26] GRONBAEK H, THORLACIUS-USSING O. Selenium complexes in the anterior pituitary of rats exposed to L-selenomethionine. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1990; **59**: 291–296.
- [27] HEIDER J, BOCK A. Selenium metabolism in micro-organisms. *Adv Microbial Physiol* 1993; **35**: 71–109.
- [28] HILL KE, XIA Y, AKESSON B, BOEGLIN ME, BURK RF. Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects. *J Nutr* 1996; **126**: 138–145.

- [29] JANGHORBANI M, MARTIN RF, KASPER LJ, SUN XF, YOUNG VR. The selenite-exchangeable metabolic pool in humans: a new concept for the assessment of selenium status. *Am J Clin Nutr* 1990; **51**: 670–677.
- [30] KANT AK, MOSER-VEILLON PB, REYNOLDS RD. Dietary intakes and plasma concentrations of zinc, copper, iron, magnesium, and selenium of young, middle ages and older men. *Nutr Res* 1989; **9**: 717–724.
- [31] KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L, STOTSKY G. Selenium and immune responses. *Environ Res* 1987; **42**: 277–303.
- [32] KOK FJ, HOFMAN A, WITTEMAN JCM, DE BRUIJN AM, KRUYSEN DHCM, DE BRUIN M, VALKENBURG HA. Decreased selenium levels in acute myocardial infarction. *J Am Med Assoc* 1989; **261**: 1161–1164.
- [33] KORPELA H, KUMPULAINEN J, JUSSILA E, KEMILA S, KAARIAINEN M, KAARIAINEN T, SOTANIEMI EA. Effect of selenium supplementation after acute myocardial infarction. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989; **65**: 249–252.
- [34] KRISHNAN K, BRODEUR J. Toxic interactions among environmental pollutants: corroborating laboratory observations with human experience. *Environ Health Perspect* 1994; **102**: 11–17.
- [35] KUMAR S, BJORNSTEDT M, HOLMGREN A. Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *Eur J Biochem* 1992; **207**: 435–439.
- [36] KVICALA J, ZAMRAZIL V, SOUTOROVA M, TOMISKA F. Correlations between parameters of body selenium status and peripheral thyroid parameters in the low selenium region. *Analyst* 1995; **120**: 959–965.
- [37] LEVANDER OA, DE LOACH DP, MORRIS VC, MOSER PB. Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats. *J Nutr* 1983; **113**: 55–63.
- [38] MC NEILL JH, DELGATTY HLM, BATTELL ML. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1991; **40**: 1675–1678.
- [39] NAKADAIRA H, ENDOH K, YAMAMOTO M, KATOH K. Distribution of selenium and molybdenum and cancer mortality in Niigata, Japan. *Arch Environ Health* 1995; **50**: 374–380.
- [40] National Research Council. 1980. Recommended Dietary Allowances. Washington, DC: Natl. Acad. Sci. 185 pp. 9th edition.
- [41] OLAS B, WACHOWICZ B. Selen a cytotoksyczność cis-diamminodichloroplatyny. *Post Hig Med Dośw* 1997; **51**: 95–108.
- [42] OLIVIERIO, STANZIAL AM, GIRELLID, TREVISAN MT, GUARINIP, TERZIM, CAFFI S, FONTANA F, CASARIL M, FERRARI S, CORROCHER R. Selenium status, fatty acids, vitamins A and E, and aging: the Nove study. *Am J Clin Nutr* 1994; **60**: 510–517.
- [43] Organisation Mondiale de la Sante (OMS) Les oligoelements en nutrition humaine. [w] Rapport Technique de IO.M.S., WHO [red] no 532, 1973, Geneve Switzerland.
- [44] PATTERSON BH, ZECH LA. Development of a model for selenite metabolism in humans. *J Nutr* 1992; **122**: 709–714.
- [45] PERSSON-MOSCHOS M, HUANG W, SRIKUMAR TS, AKESSON B, LINDEBERG S. Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. *Analyst* 1995; **120**: 833–836.
- [46] Recommended Dietary Allowances 1989, Washington DC : National Academy Press. 10th edition.
- [47] RODEN M, PRSKAVEC M, FURNSINN C, ELMADFA I, KONIG J, SCHNEIDER B, WAGNER O, WALDHAUSL W. Metabolic effect of sodium selenite: insulin-like inhibition of glucagon-stimulated glycogenolysis in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1995; **22**: 169–174.

- [48] ROTRUCK JT, POPE AL, GANTHER HE, SWANSON AB, HAFEMAN DG, HOEKSTRA WG. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; **179**: 558–590.
- [49] SALVINI S, HENNEKENS CH, MORRIS JS, WILLETT WC, STAMPFER MJ. 1995. Plasma levels of the antioxidant selenium and risk of myocardial infarction among U.S. physicians. *Am J Cardiol* 1995; **76**: 1218–1221.
- [50] SCHRAUZER GN, SACHER J. Selenium in the maintenance and therapy of HIV-infected patients. *Chem-Biol Interact* 1994; **91**: 199–205.
- [51] SCHWARZ K, FOLTZ CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary liver degeneration. *J Am Chem Society* 1957; **79**: 3292–3293.
- [52] SHAMBERGER R. The genotoxicity of selenium. *Mutation Res* 1985; **154**: 29–48.
- [53] SIWEK B, BAHBOUTHE, SERRA MA, SABBIONIE, DE PAUW-GILLET MC, BASSLER R. Effect of selenium compounds on murine B16 melanoma cells and pigmented cloned pB16 cells. *Arch Toxicol* 1994; **68**: 246–254.
- [54] SPALLHOLZ JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Rad Biol Med* 1994; **17**: 45–64.
- [55] SUADICANI P, HEIN HO, GYNTELBERG F. Serum selenium concentration and risk of ischaemic heart disease in a prospective cohort study of 3000 males. *Atherosclerosis* 1992; **96**: 33–42.
- [56] SUNDE RA. Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr* 1990; **10**: 451–474.
- [57] SWANSON CA, PATTERSON BH, LEVANDER OA, VEILLON C, TAYLOR PR, HELZLSOUER K, MCADAMP P, ZECH LA. Human [⁷⁴Se]selenomethionine metabolism: a kinetic model. *Am J Clin Nutr* 1991; **54**: 917–926.
- [58] TIRAN B, TIRAN A, PETEK W, ROSSIPAL E, WAWSCHINEK O. Selenium status of healthy children and adults in Styria (Austria). *Trace Elem Med* 1992; **9**: 75–79.
- [59] TURNER RJ, FINCH JM. Selenium and the immune response. *Proc Nutr Soc* 1991; **50**: 275–285.
- [60] VEILLON C, PATTERSON KY, BUTTON LN, SYTKOWSKI AJ. Selenium utilization in humans – a long-term, self-labeling experiment with stable isotopes. *Am J Clin Nutr* 1990; **52**: 155–158.
- [61] VINCETI M, ROVESTI S, GABRIELLI C, MARCHESI C, BERGOMI , MARTINI M, VIVOLI G. Cancer mortality in residential cohort exposed to environmental selenium through drinking water. *J Clin Epidemiol* 1995; **48**: 1091–1097.
- [62] WACHOWICZ B. Selen w roślinach. *Wiadomości Botaniczne* 1993; **37**: 87–89.
- [63] WOOD RJ, SUTER PM, RUSSELL RM. Mineral requirements of elderly people. *Am J Clin Nutr* 1995; **62**: 493–505.
- [64] ZACHARA BA, WĄSOWICZ W, GROMADZIŃSKA J, SKŁODOWSKA M, KRASOMSKI G. Glutathione peroxidase activity, selenium, and lipid peroxide concentrations in blood from a healthy Polish population. *Biol Trace Elem Res* 1986; **10**: 175–187.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 05.03.1997 r.

Przyjęto: 02.04.1997 r.

Adres autora: Instytut Biochemii UŁ
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

ANTYKARCYNOWE DZIAŁANIE SELENU

CARCINOSTATIC ACTIVITY OF SELENIUM

Halina Małgorzata ŻBIKOWSKA

Katedra Biochemii Ogólnej, Instytut Biochemii UŁ, Łódź

Streszczenie: Toksyczne właściwości selenu były znane dużo wcześniej, zanim w 1957 roku wykazano, że jest on pierwiastkiem niezbędnym do życia zwierząt. Typowym objawem zatrucia obserwowanym u zwierząt hodowlanych, spożywających rośliny rosnące na obszarach o dużej zawartości selenu w glebie, jest choroba alkaliczna i ślepa kołowaczna. Znacznym postępowaniem w wyjaśnieniu mechanizmu toksycznego działania selenu na komórki i organizm było odkrycie, że reakcji utleniania glutationu przez selenin towarzyszy powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego. Badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że selen w wysokich dawkach wykazuje działanie antynowotworowe. Badania epidemiologiczne także wskazują na częstsze występowanie chorób nowotworowych w populacjach zamieszkujących obszary o niskiej zawartości selenu w glebie. W pracy zebrano najnowsze dane na temat toksycznego działania selenu na organizm oraz mechanizmu cytotoksyczności i aktywności karcynostycznej nieorganicznych i organicznych związków selenu.

Słowa kluczowe: związki selenu, anionorodnik ponadtlenkowy, toksyczność, hamowanie karcynogenezy

Summary: Selenium toxicity was known many years before its essentiality for animals was established in 1957. Selenium toxicity in livestock invoked by ingestion of plants growing in soils that contained high levels of selenium is manifested in alkali disease and blind staggers. The observation that oxidation of glutathione by selenite produces superoxide anion made a big progress in explaining the mechanism of selenium toxicity in cells and organisms. On the other hand it was shown that high doses of selenium have protective action against cancer in a wide variety of animal models. Human epidemiological studies also indicate a higher incidence of cancer in geographical areas poor in selenium. The present paper describes information from the current literature on selenium toxicology and cytotoxicity as well as carcinostatic activity of inorganic and organic selenium compounds.

Key words: selenium compounds, superoxide anion, toxicity, carcinostasis

Wykaz stosowanych skrótów: **BSC** – selenocyjanian benzylu, **GSH** – glutation, **GS-Se-SG** – selenodiglutation, **O₂⁻** – anionorodnik ponadtlenkowy, **PGE₂** – prostaglandyna, **R-SeH** – selenol, **R-Se-R** – selenoeter, **RS-Se-SR** – selenotrisulfid, **SeCys** – selenocysteina, **SeMet** – selenometionina, **TPSeCl** – chlorek trifenylseleniowy, **p-XSC** – 1,4-fenyleno-bis-(metyleno)selenocyjanian

1. WSTĘP

Selen jest mikroelementem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych, ale podawany w stężeniach powyżej 600 µg/dobę – dawce nieznacznie przekraczającej dzienne zapotrzebowanie organizmu (50–200 µg) jest jednym z najbardziej toksycznych pierwiastków. Toksyczne właściwości selenu były znane dużo wcześniej, zanim w 1957 roku po raz pierwszy wykazano, że jest niezbędny w żywieniu zwierząt. Ostre zatrucia selenem objawiają się nagłą dusznością, częstoskurczem, biegunką, krańcowym wyczerpaniem, a nawet śmiercią [39]. Już w latach trzydziestych naszego stulecia wykazano, że niektóre regionalne choroby zwierząt hodowlanych są następstwem zatruc selenem w wyniku spożycia przez nie paszy o wysokiej zawartości tego pierwiastka. Typowym objawem zatrucia jest choroba alkaliczna i ślepa kołowacizna (ang. *alkali disease* i *blind staggers*). Zwierzęta tracą też sierść, następują deformacje i gubienie racic oraz zmiany w głównych narządach wewnętrznych. Zatrucie selenem u ludzi zdarza się raczej rzadko, chociaż w pewnym regionie Chin w latach 1961–1964 zanotowano przypadki ostrego zatrucia i śmierci ponad stu osób na skutek spożywania artykułów żywnościowych wyprodukowanych na glebie z bardzo wysoką zawartością selenu. Dzielne spożycie selenu na tym obszarze dochodziło do 5 mg [42]. W niektórych gałęziach przemysłu np. elektronicznym, fotograficznym, przy produkcji kolorowego szkła pracownicy są zawodowo narażeni na działanie związków selenu [7]. Coraz większe zanieczyszczenie środowiska prowadzi również do wzrostu stężenia selenu przede wszystkim w glebie i wodzie. Bioakumulacja selenu poprzez łańcuch pokarmowy jest szczególnie niebezpieczna w ekosystemach wodnych [36]. Z drugiej strony dająca się zauważyć w ostatnim dziesięcioleciu moda na wzbogacanie żywności w selen na terenach o niskiej jego zawartości oraz profilaktyczne i lecznicze stosowanie selenu, stwarzają niebezpieczeństwo przedawkowania.

2. MECHANIZM TOKSYCZNOŚCI SELENU

Toksyczność selenu od lat budzi kontrowersje. Przyczyny, jak i mechanizm toksycznego działania związków selenu na komórkę, a tym samym na organizm nie są do końca poznane. Wiadomo, że wrażliwość poszczególnych organizmów na toksyczne działanie selenu znacznie się różni. Ilość i chemiczna forma spożywanego selenu wpływa na jego poziom we krwi, jak również na sposób wiązania z białkami poszczególnych tkanek [3,4]. Już w latach czterdziestych zwrócono uwagę na interakcję seleninu z tiolami. Bliższe badania na ten temat prowadził później m.in. Ganther [10], który toksyczność selenu przypisywał reakcji z grupami

-SH białek i tworzeniu selenotrisulfidów (RS-Se-SR) analogicznie do selenodiglutationu (GS-Se-SG) wg reakcji:



Znacznym postępowaniem w wyjaśnieniu mechanizmu toksycznego działania selenu było odkrycie przez Seko i wsp. [29] faktu, że reakcji selenu z GSH towarzyszy tworzenie anionorodnika ponadtlenkowego (rys. 1).



Rys. 1. Powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji selenu z glutationem (wg Seko i wsp. [30])

Dalsze badania wykazały, że w reakcję ze zredukowanym glutationem (a także innymi niskocząsteczkowymi tiolami), której towarzyszy generowanie anionorodnika ponadtlenkowego, wchodzi również: dwutlenek selenu, selenocystyna, selenocystamina. Natomiast związki, takie jak selenian i selenometionina, nie reagują z GSH. Chociaż dane dotyczące toksyczności poszczególnych selenozwiązków są kontrowersyjne, znaczenie interakcji z tiolami i tworzenie rodników w mechanizmie toksyczności selenu wydają się niezaprzeczalne [17, 29, 32, 33, 41]. Według Spalholz [33] toksycność wykazują selenin i dwutlenek selenu, tworzące z tiolami selenotrisulfidy. Toksyczne są również diselenidy, takie jak selenocystyna i selenocystamina, które z kolei w obecności związków tiolowych ulegają redukcji do selenoli (RSeH). Selenian i związki typu selenoeterów (R-Se-R) nie reagują z GSH i nie tworzą rodników, dlatego *in vitro* nie są toksyczne. W warunkach *in vivo* natomiast ich toksyczność jest prawie taka sama jak seleninu, gdyż najprawdopodobniej są redukowane odpowiednio do seleninu albo selenoli i wchodzi we wspólny szlak metabolizmu selenu, prowadzący ostatecznie do selenku.

3. AKTYWNOŚĆ ANTYNOWOTWOROWA SELENU

Badania ostatnich lat wykazują, że toksyczność selenozwiązków jest bezpośrednio związana z antynowotworową aktywnością selenu [33]. Podawanie selenu zwierzętom doświadczalnym hamuje nowotwory m.in.: sutka, trzustki, wątroby, okrężnicy, płuc oraz skóry [27]. Udowodniono, że selen w różnych formach hamuje wzrost wielu typów komórek nowotworowych, indukowanych bądź transplanto-

TABELA 1. Cytotoksyczność selenodiglutationu
in vitro

Typ komórek nowotworowych

Rak płuc
Gruzołakorak sutka
Gruzołakorak okrężnicy
Czerniak
Glejak
Rdzeniak

wanych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [2, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 23, 26]. Cytotoksyczność związków selenu jest zróżnicowana. Najbardziej cytotoksyczny okazał się selenodiglutation, związek pośredni powstający w komórce w wyniku reakcji seleninu z GSH. W tabeli 1 zestawiono typy komórek nowotworowych, których wzrost był hamowany przez GSSeSG. Podobną cytotoksycz-

nością *in vitro* (komórki guza Ehrlicha, komórki leukemiczne L1210 myszy) charakteryzował się selenin, nieco mniejszą selenocystyna i selenian. Najmniejszą cytotoksyczność wykazywały metyloselenki i selenometionina [33]. Ogromna ilość przeprowadzonych badań na różnych komórkach i z zastosowaniem różnych metod oceny cytotoksyczności sprawia, że uzyskane wyniki są kontrowersyjne. Ip i White [16] na przykład nie stwierdzili żadnych różnic w antykarcynogennej aktywności badanych nieorganicznych (selenian, selenin, dwutlenek selenu) i organicznych (SeMet, SeCys) selenozwiązków. Słabsze, w porównaniu z seleninem, działanie selenometioniny, obserwowane przez większość badaczy można tłumaczyć niespecyficznym włączaniem tego aminokwasu do białek. W ten sposób SeMet wchodziłaby w pułę selenu metabolicznie nieaktywną [12, 13]. Potwierdzeniem tej hipotezy może być obserwacja, że u zwierząt doświadczalnych karmionych SeMet większość selenu w tkankach (szczególnie w mięśniach szkieletowych) jest zmagazynowana w postaci tego aminokwasu [3]. Jest jeszcze inne możliwe wytłumaczenie mniejszej aktywności SeMet. U zwierząt karmionych seleninem obserwowano podwyższenie poziomu glutationu, podczas gdy podawanie selenu w formie SeMet nie powodowało żadnych zakłóceń w metabolizmie tego związku. Przymuszczenie zmiany powodowane seleninem mogą być wynikiem odpowiedzi adaptacyjnej organizmu [12, 37].

Wrażliwość poszczególnych komórek nowotworowych na toksyczne działanie związków selenu również nie jest jednakowa. Może to być spowodowane różną ich zdolnością do detoksykacji selenu [18].

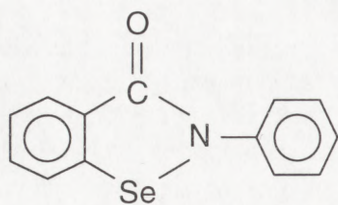
Wykazano, że selen hamuje zarówno fazę inicjacji karcynogenezy, jak i rozwój nowotworu, jednak przy obecnym stanie wiedzy trudno wyjaśnić, na czym polega ta zdolność selenu. Istnieją przypuszczenia, że selen może działać przez blokowanie syntezy DNA w komórkach nowotworowych, wzmoczenie komórkowej odpowiedzi immunologicznej lub przez hamowanie peroksydacji lipidów, usuwanie nadtlenczków i wolnych rodników [8, 22]. Jednym z możliwych wyjaśnień jest też udział selenozależnej-GSH-Px. Prostaglandyny, których produkcja znacznie wzrasta w guzach złośliwych, są jednym z regulatorów wzrostu guzów nowotworowych. Okazało się, że niektóre selenozwiązki, np. 1,4-fenyleno-bis-(metyleno)selenocyjanian (p-

XSC) powodują wzrost aktywności selenozależnej-GSH-Px w komórkach indukowanego chemicznie raka śluzówki okrężnicy przy jednoczesnym obniżeniu poziomu PGE_2 [26].

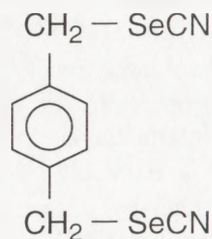
Chociaż dokładny mechanizm cytotoksyczności selenu nie jest znany, kluczową rolę w tym procesie, tak jak i w toksycznym jego działaniu na organizm, może odgrywać interakcja związków selenu z GSH. Wykazano, że glutation wzmacnia cytotoksyczne działanie seleninu [5, 18]. Bezpośrednio za antynowotworowe właściwości selenu byłyby więc odpowiedzialne metabolity powstające w reakcjach selenozwiązków z GSH, takie jak selenodiglutation [32] lub aktywne formy tlenu [17, 33, 41]. Alternatywną do wolnorodnikowej hipotezy jest także możliwość, że inhibitorowa aktywność selenu pochodzi od związków powstających w czasie jego metylacji. Najbardziej prawdopodobnym związkiem wydaje się być metyloselenol [11]. Interesujący jest fakt, że związki selenu, które są w pierwszym rzędzie metabolizowane do metyloselenolu (metyloselenocyanian, Se-metyloselenocysteina) powodują jedynie hamowanie wzrostu komórek nowotworowych, a nie działają na ich DNA. W przeciwieństwie do nich związki podlegające redukcji do selenku wodoru (selenin i selenek sodowy) nie tylko hamują wzrost komórek, ale również indukują pęknięcia nici DNA [21]. Wyniki tych badań wskazują na zależność antynowotworowej aktywności związków selenu od drogi metabolizmu, jakiej podlegają w komórce. Ciekawą hipotezę apoptotycznej odpowiedzi indukowanej przez selenin postawił Lu i wsp. [20]. Traktowanie komórek leukemicznych myszy L1210 seleninem powodowało pęknięcia nici DNA oraz aktywację nukleaz, co w konsekwencji prowadziło do fragmentacji DNA i śmierci komórki. Apoptotyczną odpowiedź na działanie seleninu, a także syntetycznego związku selenu p-XSC potwierdzili również Thompson i wsp. badając cytotoksyczną aktywność tych związków w komórkach raka sutka [38].

4. EBSELEN I JEGO ANALOGI – NOWA GENERACJA ZWIĄZKÓW SELENU O AKTYWNOŚCI CYTOSTATYCZNEJ

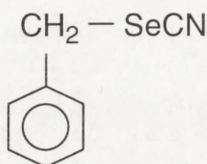
Charakterystyczną cechą wszystkich naturalnie występujących organicznych i nieorganicznych związków selenu jest ich duża toksyczność, dlatego jest bardziej prawdopodobne, że w przyszłości kliniczne zastosowanie będą miały organiczne selenozwiązki otrzymywane syntetycznie. Pierwszym takim związkiem był zsyntetyzowany w 1984 roku ebselen, początkowo określany symbolem PZ 51 [40]. W latach dziewięćdziesiątych opatentowano szereg jego analogów [1, 8, 9, 22, 26, 27]. Na rysunku 2 przedstawiono wzory znanych syntetycznych selenozwiązków o udokumentowanej aktywności cytostaticznej, których nazwy pojawiają się w tekście. Działanie syntetycznych form selenu porównuje się na ogół z działaniem



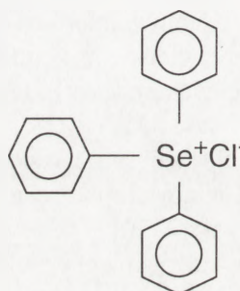
ebselen
(PZ 51)



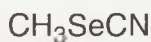
1,4-fenyl-bis-(metyleno)selenocyjanian
(p-ksyleno-bis-selenocyjanian)
(p-XSC)



Selenocyjanian benzylu
(BSC)



chlorek trifenyloseleniowy
(TPSeCl)



Selenocyjanian metylu



Selenobetaina

Rys. 2. Syntetyczne selenoorganiczne związki o aktywności cytostatycznej

seleninu, który jest traktowany jako związek modelowy o najlepiej poznanych właściwościach i metabolizmie.

Ebselen jest selenoorganicznym związkiem posiadającym bezpośrednie działanie antyoksydacyjne oraz aktywność peroksydazy glutationowej rozkładającej różno-

rodne nadtlenki, w tym nadtlenki fosfolipidów i cholesterolu [6, 24]. Wykazuje właściwości przeciwzapalne [31], a także działa jako inhibitor 5-lipooksygenazy [28]. W licznych badaniach *in vitro* oraz *in vivo* wykazano ochronną rolę ebselenu m.in. przed toksycznym działaniem adriamycyny [25], paracetamolu [19] czy przed wrzodami żołądka u szczurów, indukowanymi różnymi czynnikami [34, 35]. Ebselen wywiera również efekt cytotoksyczny, hamuje proliferację komórek, replikację DNA i syntezę białek. Interesujące jest, że analogi zawierające siarkę zamiast selenu nie wykazują takich właściwości. Badano metabolizm ebselenu u zwierząt i człowieka [30, 31]. Wykrywane metabolity sugerują, że związek ten po otworzeniu pierścienia zawierającego selen (rozerwanie wiązania Se-N w obecności tioli) ulega biotransformacji prowadzącej do utworzenia metylowych lub glukuronidowych pochodnych. Dominującym metabolitem stwierdzonym w osoczu i moczu u człowieka i świnii był selenoglukuronid. Minimalna toksyczność ebselenu, w porównaniu z toksycznością naturalnie występujących związków selenu, prawdopodobnie wynika właśnie z odmiennego sposobu metabolizowania tego związku w organizmie. Selen zawarty w ebselenie nie jest uwalniany w formie selenu pierwiastkowego i nie wchodzi w całkowitą pulę selenu. Przypuszczalnie metabolizm innych syntetycznych, selenoorganicznych związków przebiega podobnie, bez uwolnienia Se^0 , co znacznie zmniejsza ich toksyczność. We wszystkich tych związkach Se jest połączony co najmniej z jednym pierścieniem benzenu (BSC, p-XSC, TPSeCl) lub mającymi również charakter hydrofobowy grupami (grupą) metylowymi (metyloselenocyanian, selenobetaina) (rys. 2).

Najmniejszą toksycznością charakteryzuje się najnowszy z generacji związków syntetycznych – chlorek trifeniloseleniowy (TPSeCl) [22]. Wykazano, że TPSeCl wywiera działanie cytostatyczne nie wywołując jednocześnie uszkodzenia błon komórkowych czy nici DNA. Nie powoduje też akumulacji selenu w tkankach i wykazuje największy margines bezpieczeństwa spośród wszystkich badanych dotąd związków selenu. Ponadto stwierdzono jego związek z metabolizmem energetycznym komórki. TPSeCl powodował zwiększenie zużycia glukozy i tworzenia mleczanu. Jak dotąd nie wyjaśniono, czy ma to jakiś wpływ na cytotoksyczną aktywność badanego związku.

5. PODSUMOWANIE

Badania epidemiologiczne oraz badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że selen posiada właściwości antynowotworowe. Naturalnie występujące nieorganiczne związki selenu oraz selenoaminokwasy hamują karcynogenezę, ale są toksyczne dla komórek i zwierząt. Jakkolwiek przyczyny toksyczności selenu nie są do końca poznane, przypuszczalnie ten sam mechanizm jest odpowiedzialny

za toksyczne, jak i antynowotworowe działanie związków selenu. Sugeruje się, że w tym procesie biorą udział aktywne formy tlenu powstające w reakcji utleniania glutationu w obecności seleninu. Opracowanie szeregu syntetycznych selenoorganicznych związków stwarza nowe możliwości wykorzystania selenu w terapii nowotworów oraz schorzeń o podłożu zapalnym.

LITERATURA

- [1] ANDREADOU I, VAN DE WATER B, COMMANDEUR JNM, NAGELKERKE FJ, VERMEULEN NPE. Comparative cytotoxicity of 14 novel selenocysteine Se-conjugates in rat renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; **141**: 278–287.
- [2] ANDRZEJAK R, GOCH JH, JURGA M. Rola selenu w patofizjologii człowieka. *Post Hig Med Dośw* 1996; **50**: 293–307.
- [3] BEHNE D, KYRIAKOPOULOS A, SCHEID S, GESSNER H. Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats. *J Nutr* 1991; **121**: 806–814.
- [4] BEHNE D, WEISS-NOWAK C, KALCKLOSCH M, WESTPHAL C, GESSNER H, KYRIAKOPOULOS A. Studies on the distribution and characteristics of new mammalian selenium-containing proteins. *Analyst* 1995; **120**: 823–825.
- [5] CAFFREY PB, FRENKEL GD. Selenite cytotoxicity in drug resistant and nonresistant human ovarian tumor cells. *Cancer Res* 1992; **52**: 4812–4816.
- [6] CHRISTISON J, SIES H, STOCKER R. Human blood cells support the reduction of low-density-lipoprotein-associated cholesteryl ester hydroperoxides by albumin-bound selen. *Biochem J* 1994; **304**: 341–345.
- [7] DANIELSSON BRG, DANIELSON M, KHAYAT A., WIDE M. Comparative embryotoxicity of selenite and selenate: uptake in murine embryonal and fetal tissues and effects on blastocysts and embryonic cells *in vitro*. *Toxicology* 1990; **63**: 123–136.
- [8] EL-BAYOUMY K. Evaluation of chemopreventive agents against breast cancer and proposed strategies for future clinical intervention trials. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 2395–2420.
- [9] EL-BAYOUMY K, UPADHYAYA P, CHAE Y-H, SOHN O-S, RAO CV, FIALA E, REDDY BS. Chemoprevention of cancer by organoselenium compounds. *J Cell Biochem* 1995; **22**: 92–100.
- [10] GANTHER HE. Selenotrisulfides. Formation by reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry* 1968; **7**: 2898–2905.
- [11] IP C, GANTHER HE. Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention. *Cancer Res* 1990; **50**: 1206–1211.
- [12] IP C, LISK DJ. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. *Natur Cancer* 1994; **21**: 203–212.
- [13] IP C, LISK DJ. Characterization of tissue profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 573–576.
- [14] IP C, LISK DJ. Enrichment of selenium in allium vegetables for cancer prevention. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 1881–1885.
- [15] IP C, LISK DJ. Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium. *Carcinogenesis* 1995; **16**: 2649–2652.
- [16] IP C, WHITE G. Mammary cancer chemoprevention by inorganic and organic selenium: single agent treatment or in combination with vitamin E and their effects on *in vitro* immune functions. *Carcinogenesis* 1987; **8**: 1763–1766.

- [17] KITAHARA J, SEKO Y, IMURA N. Possible involvement of active oxygen species in selenite toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 1993; **67**: 497–501.
- [18] KUCHAN MJ, MILNER JA. Influence of intracellular glutathione on selenite-mediated growth inhibition of canine mammary tumor cells. *Cancer Res* 1992; **52**: 1091–1095.
- [19] LI Q-J, BESSEMS JGM, COMMANDEUR JNM, ADAMS B, VERMEULEN NPE. Mechanism of protection of ebselen against paracetamol-induced toxicity in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**: 1631–1640.
- [20] LU J, KAECK M, JIANG C, WILSON AC, THOMPSON HJ. Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 1994; **47**: 1531–1535.
- [21] LU J, JIANG C, KAECK M, GANTHER H, VADHANAVIKIT S, IP C, THOMPSON H. Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. *Biochem Pharmacol* 1995; **50**: 213–219.
- [22] LU J, JIANG C, KAECK M, GANTHER H, IP C, THOMPSON H. Cellular and metabolic effects of triphenylselenium chloride in a mammary cell culture model. *Carcinogenesis* 1995; **16**: 513–517.
- [23] NANO JL, FRANCOIS E, RAMPAL P. In vivo and *in vitro* study of the role of selenium in colon carcinogenesis. [w]: Collery P, Poirier LA, Manfait M, Etienne JC [red.] Metal Ions in Biology and Medicine. Paris: John Libbey Eurotext 1990: 493–496.
- [24] NOGUCHI N, YOSHIDA Y, KANEDA H, YAMAMOTO Y, NIKI E. Action of ebselen as an antioxidant against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1992; **44**: 39–44.
- [25] PRITSOS CA, SOKOLOFF M, GUSTAFSON DL. PZ-51 (Ebselen) IN VIVO protection against Adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. *Biochem Pharmacol* 1992; **44**: 839–841.
- [26] REDDY BS, RIVENSON A, KULKARNI N, UPADHYAYA P, EL-BAYOUMY K. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the synthetic organoselenium compound 1,4.-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Cancer Res* 1992; **52**: 5635–5640.
- [27] RONAI Z, TILLOTSON JK, TRAGANOS F, DARZYNKIEWICZ Z, CONAWAY CC, UPADHYAYA P, EL-BAYOUMY K. Effects of organic and inorganic selenium compounds on rat mammary tumor cells. *Int J Cancer* 1995; **63**: 428–434.
- [28] SCHEWE C, SCHEWE T, WENDEL A. Strong inhibition of mammalian lipooxygenases by the antiinflammatory seleno-organic compound ebselen in the absence of glutathione. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**: 65–74.
- [29] SEKO Y, SAITO Y, KITAHARA J, IMURA N. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione *in vitro*. [w]: Wendel A. [red.] Selenium in Biology and Medicine. Springer, Berlin, Heidelberg New York 1989: 70–73.
- [30] SIES H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Rad Biol Med* 1993; **14**: 313–323.
- [31] SIES H. Ebselen: a glutathione peroxidase mimic. *Meth Enzymol* 1994; **234**: 476–482.
- [32] SIWEK B, BAHBOUTH E, SERRA MA, SABBIONI E, DE PAUW-GILLET MC, BAS-SLER R. Effect of selenium compounds on murine B16 melanoma cells and pigmented cloned pB16 cells. *Arch Toxicol* 1994; **68**: 246–254.
- [33] SPALLHOLZ JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Rad Biol Med* 1994; **17**: 45–64.
- [34] TABUCHI Y, KUREBAYASHI Y. Antisecretory and antiulcer effects of ebselen, a seleno-organic compound, in rats. *Japan J Pharmacol* 1993; **61**: 255–257.
- [35] TABUCHI Y, SUGIYAMA N, HORIUCHI T, FURUSAWA M, FURUHAMA K. Ebselen, a seleno-organic compound, protects against ethanol-induced murine gastric mucosal injury in both *in vivo* and *in vitro* systems. *Eur J Pharmacol* 1995; **272**: 195–201.

- [36] TALLANDINI L, CECCHI R, DE BONI S, GALASSINI S, GHERMANDI G, GIALANELLA G, LIU N, MORO R, TURCHETTO M, ZHANG Y. Toxic levels of selenium in enzymes and selenium uptake in tissues of marine fish. *Biol Trace Elem Res* 1996; **51**: 97–106.
- [37] THOMPSON HJ, Ip C. Temporal changes in tissue glutathione response to chemical form, dose and duration of selenium treatment. *Biol Trace Elem Res* 1991; **30**: 163–173.
- [38] THOMPSON HJ, WILSON A, LU J, SINGH M, JIANG C, UPADHYAYA P, EL-BAYOUMY K, IP C. Comparison of the effects of an organic and inorganic form of selenium on a mammary carcinoma cell line. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 183–186.
- [39] VAN VLEET JF, FERRANS VJ. Comparative pathology of selenium and vitamin E deficiency and excess. [w]: Alan R, [red.] *Nutritional Diseases: Research Directions in Comparative Pathobiology*. Liss, Inc 1986: 359–396.
- [40] WENDEL A, FAUSEL M, SAFAYHI H, TIEGS G, OTTER R. A novel biologically active seleno-organic compound-II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem Pharmacol* 1984; **33**: 3241–3245.
- [41] YAN L, SPALLHOLZ JE. Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**: 429–437.
- [42] YANG G, WANG S, ZHOU R, SUN S. (1983). Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr* 1983; **37**: 872–881.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 05.03.1997 r.

Przyjęto: 02.04.1997r.

Adres autora: Instytut Biochemii UŁ,

90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

STRUKTURA NUKLEOSOMOWA CHROMATYNY A NAPRAWA DNA

NUCLEOSOMAL STRUCTURE OF THE CHROMATIN AND DNA REPAIR

Piotr WIDŁAK

Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, Gliwice

Streszczenie: Struktura chromatyny ma wpływ na powstawanie uszkodzeń DNA indukowanych przez czynniki genotoksyczne oraz na usuwanie tych uszkodzeń z genomu. Naprawa DNA związana jest ze zmianami w strukturze nukleosomów umożliwiającymi dostęp kompleksu naprawczego do uszkodzenia. Po zakończeniu naprawy następuje odtworzenie struktury chromatyny niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania genomu. Najlepiej poznanym mechanizmem naprawy DNA jest naprawa przez wycinanie. W komórce funkcjonują dwa rodzaje naprawy przez wycinanie. Jeden, zależny od transkrypcji, jest specyficzny dla nici transkrybowanej. Drugi usuwa uszkodzenia z DNA nieaktywnego transkrypcyjnie. W obu rodzajach naprawy przez wycinanie biorą udział białka, których prawdopodobna funkcja związana jest ze zmianami struktury chromatyny.

Słowa kluczowe: Chromatyna; nukleosomy; uszkodzenia DNA; naprawa DNA.

Summary: The formation and repair of DNA damage is influenced by chromatin structure. Reconfiguration of nucleosomes takes place during DNA repair to increase accessibility of damage to repair proteins. Reconstitution of nucleosomes after DNA repair is then necessary to recover primary chromatin structure. Nucleotide excision repair (NER) is well known mechanism of DNA repair. It is suggested that two types of NER work in the cell. One of them, transcription-dependent, is specific for transcribed strands of DNA. The other is specific for non-transcribed DNA. The function of NER depends on proteins that act as "chromatin processors". Probably some of them displace histones from damage-containing DNA.

Key words: Chromatin; nucleosomes; DNA damage; DNA repair.

Wykaz skrótów: **AAF** – acetyloaminofluoren, **AFB₁** – aflatoksyna B₁, **B[a]P** – benzo[a]pyren, **białko DDB** – białko wiążące się z uszkodzonym DNA, **białko SSB** – białko wiążące się z jednoniciowym DNA, **BPDE** – diolepoksyd benzo[a]pyrenu, **CAK** (ang. *CDK activating kinase*) – kinaza aktywująca białko CDK, **CDK** (ang. *cyclin-dependent kinase*) – kinaza białkowa zależna od cykliny, **GGR** (ang. *global genome repair*) – rodzaj NER specyficzny dla DNA nietranskrybowanego, **MMS** – sulfonian

metano-metylowy, **NER** (ang. *nucleotide excision repair*) – rodzaj naprawy DNA, **TCR** (ang. *transcription-coupled repair*) – rodzaj NER specyficzny dla nici transkrybowanej.

1. WSTĘP

Materiał genetyczny organizmów eukariotycznych ma postać chromatyny, będącej kompleksem DNA, histonów i białek niehistonowych. Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom. Rdzeń nukleosomu (*core*) tworzony jest przez oktamer histonowy (centralny tetramer [H3/H4]₂ i dwa bardziej peryferyjne dimery [H2A/H2B]), wokół którego owinięte jest 146 par zasad DNA w postaci 1,75 pętli. Pomiędzy poszczególnymi nukleosomami znajduje się wrażliwy na działanie nukleaz DNA łącznikowy (*linker*), którego część oddziałuje z histonem H1. Długość DNA łącznikowego (10–90 par zasad) jest zmienna u różnych organizmów i w różnych typach komórek. Szczegóły struktury nukleosomu można znaleźć w licznych pracach przeglądowych, na przykład [28, 35]. W trakcie transkrypcji i replikacji następują zmiany struktury nukleosomów i częściowe lub całkowite usuwanie histonów z DNA. Proces ten związany jest z modyfikacją histonów oraz oddziaływaniem DNA z innymi kompleksami białkowymi (czynniki transkrypcyjne, kompleksy polimeraz DNA i RNA). Uważa się, że poza funkcjami strukturalnymi (pierwszy poziom upakowania DNA w jądrze) nukleosomy są czynnikiem regulującym przebieg wielu procesów zachodzących w jądrze. Omówienie zagadnień dotyczących związków pomiędzy transkrypcją a strukturą nukleosomową chromatyny można znaleźć w licznych pracach przeglądowych [16, 26, 36, 37].

Wiele fizycznych i chemicznych czynników środowiskowych indukuje uszkodzenia materiału genetycznego. Do czynników genotoksycznych należą między innymi promieniowanie jonizujące i promieniowanie UV oraz związki chemiczne tworzące tak zwane addukty DNA. Przykładowymi związkami tworzącymi addukty są sulfonian metano-metylowy (MMS), aflatoksyna (AFB₁), benzo[a]pyren (B[a]P) czy acetyloaminofluoren (AAF). W komórce funkcjonuje szereg mechanizmów usuwających uszkodzenia z genomu. Jednym z rodzajów naprawy DNA jest naprawa przez wycinanie – NER (*nucleotide excision repair*). Jest to mechanizm uniwersalny, usuwający z genomu uszkodzenia indukowane przez większość czynników genotoksycznych [31, 48]. Podobnie jak transkrypcja i replikacja, naprawa DNA uzależniona jest od obecności nukleosomów. Niniejsza praca traktuje o współzależnościach pomiędzy nukleosomową strukturą chromatyny a powstawaniem uszkodzeń DNA i ich naprawą w mechanizmie NER.

2. OBECNOŚĆ NUKLEOSOMÓW ZMIENIA PODATNOŚĆ DNA NA USZKODZENIA

Badania nad wpływem nukleosomów na powstawanie uszkodzeń DNA zainicjowane zostały po wykryciu nukleosomowej struktury chromatyny oraz stwierdzeniu, że chromatyna jest bardziej oporna na powstawanie uszkodzeń niż nagi DNA. W większości doświadczeń jako materiał do badań używano chromatynę z jąder trawionych nukleazami (zwykle nukleazą mikrokokalną). Następnie porównywano ilość uszkodzeń we frakcji odpornej i wrażliwej na nukleazy lub we frakcji mononukleosomowej i DNA całkowitym. Stwierdzono, że addukty indukowane przez wiele chemicznych związków genotoksycznych (na przykład pochodne B[a]P, AAF, AFB₁) powstają 2–5 razy łatwiej w DNA łącznikowym niż w DNA rdzeniowym [18]. Obecność nukleosomów wpływa również na powstawanie uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie UV. Dimery pirymidynowe (główny typ uszkodzeń indukowanych przez UV) powstają w podobnych ilościach w DNA łącznikowym i rdzeniowym [24], ale [6-4]-fotoprodukty (inny typ uszkodzeń indukowanych przez UV) powstają sześciokrotnie częściej w DNA łącznikowym [20].

W części doświadczeń badano powstawanie uszkodzeń w poszczególnych nukleotydach DNA nukleosomowego. Stwierdzono, że w obrębie rdzenia nukleosomu dimery pirymidynowe powstają z regularnością przypominającą podatność DNA nukleosomowego na DNazę I. Miejsca o maksymalnej częstości uszkodzeń wypadają przeciętnie co dziesiąty nukleotyd, tam gdzie rdzeń fosfodwuestrowy DNA oddalony był najbardziej od powierzchni oktameru histonowego [8]. Ponieważ powstanie dimeru wymaga znacznych odkształceń struktury DNA wydaje się, że taka dystrybucja uszkodzeń związana jest z bardziej "giętką" strukturą w miejscach najbardziej oddalonych od histonów. Specyfika powstawania uszkodzeń może być również związana z zakrzywieniem DNA (*bending*) w obrębie nukleosomu, stymulującym tworzenie dimerów pirymidynowych [42].

Centralne 80–100 par zasad DNA rdzeniowego jest dwukrotnie oporniejsze na powstawanie adduktów indukowanych przez AFB₁ i diolepoksyd B[a]P (BPDE) niż pozostała część DNA rdzeniowego. Przy czym, odmiennie niż w przypadku dimerów pirymidynowych, położenie danego nukleotydu wobec histonów nie ma wpływu na jego zdolność do tworzenia adduktów [21, 34, 41]. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że powstanie adduktów indukowanych przez AFB₁ i BPDE związane jest z relatywnie niewielkim zaburzeniem struktury DNA. Przypuszcza się, że ochrona nukleotydów przed BPDE (atakującym DNA od strony rowka mniejszego) spowodowana jest silniejszym skrętem DNA i zwężeniem rowka mniejszego w centralnej części nukleosomu [34].

3. DNA RDZENIOWY I DNA ŁĄCZNIKOWY NAPRAWIANE SĄ Z RÓŻNĄ SZYBKOŚCIĄ

Zróznicowanie szybkości naprawczej syntezy DNA w jądrach komórek poddanych działaniu czynników genotoksycznych badano przez porównanie szybkości wbudowywania radioaktywnych prekursorów do DNA wrażliwego i opornego na nukleazy. Stwierdzono, że w jądrach zawierających uszkodzenia indukowane przez MMS i AAF, znakowane nukleotydy wbudowywane są szybciej do DNA łącznikowego [18]. Podobną preferencję stwierdzono w przypadku syntezy naprawczej związanej z usuwaniem dimerów pirymidynowych [47]. Ponieważ ilość dimerów pirymidynowych w DNA rdzeniowym i łącznikowym jest podobna, specyfika wbudowywania nukleotydów wskazuje na preferencyjną naprawę uszkodzeń obecnych w DNA łącznikowym. Wydaje się, że na tak wykonane pomiary szybkości naprawy DNA łącznikowego i rdzeniowego ma wpływ obecność w jądrze materiału o zmiennej strukturze nukleosomowej, na przykład chromatyny aktywnej transkrypcyjnie. Ewentualny wpływ DNA o "nietypowej" strukturze nukleosomowej został zminimalizowany w doświadczeniu wykorzystującym chromatynę odtworzoną *in vitro*. Również w takim układzie *in vitro* obecność nukleosomów była czynnikiem hamującym naprawę uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie UV [44].

W większości komórek naprawcza synteza DNA jest procesem wielofazowym. Ta fazowość wynika z różnic w szybkości naprawy różnych części genomu. Zwykle można wyróżnić dwie fazy: wczesną fazę "szybką" i następującą po niej fazę "wolną". Można przypuszczać, że jedną z przyczyn obecności dwu faz naprawy DNA jest różnica w szybkości naprawy DNA łącznikowego i DNA rdzeniowego. W fazie szybkiej naprawiany jest głównie DNA łącznikowy. W fazie wolnej nukleotydy wbudowywane są z podobną szybkością do DNA łącznikowego i rdzeniowego [33]. Inną przyczyną dwu faz naprawy jest prawdopodobnie to, że w mechanizmie NER geny aktywne transkrypcyjnie naprawiane są szybciej niż DNA nie transkrybowany. Zjawisko to związane jest z przebiegiem transkrypcji oraz różnicami w strukturze chromatyny aktywnej transkrypcyjnie i nieaktywnej heterochromatyny [46].

4. MECHANIZM NAPRAWY PRZEZ WYCINANIE (NER)

W największym skrócie, mechanizm naprawy przez wycinanie funkcjonuje następująco: po rozpoznaniu uszkodzenia zależna od ATP endonukleaza nacina nić DNA po obu stronach uszkodzenia, po czym następuje usunięcie jednoniciowego fragmentu z uszkodzeniem i wypełnienie powstałej przerwy przez polimerazę i ligazę DNA. Struktura i funkcje białek związanych z mechanizmem NER są bardzo

podobne u wszystkich zbadanych organizmów eukariotycznych. W tabeli 1 wymienione są białka obecne w komórkach ludzkich oraz homologiczne do nich białka drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, wraz z krótkim opisem ich funkcji. Do pełnego przebiegu reakcji, czyli do rozpoznania i wycięcia uszkodzenia oraz syntezy naprawczej, niezbędnych jest około 20 polipeptydów. Szczegółowe omówienie mechanizmu NER można znaleźć w innych pracach przeglądowych [31, 48].

Zakłada się, że złożony kompleks naprawczy mógłby formować się niezależnie od oddziaływań z DNA. Alternatywą byłoby stopniowe tworzenie kompleksu w trakcie kolejnych etapów naprawy. Pomiedzy składnikami NER występują silne oddziaływania białko-białko. W jądrach drożdży składniki NER obecne są w formie

TABELA 1. Funkcje białek związanych z NER w komórkach ludzi i drożdży: zgrupowano białka tworzące kompleksy, w nawiasach podano inne nazwy danego białka, skróty i symbole: DDB – wiążące się z uszkodzonym DNA (*damaged DNA-binding*); SSB – wiążące się z jednoniciowym DNA (*single strand DNA-binding*); CDK – kinaza zależna od cykliny (*cyclin-dependent kinase*); ? – białko lub funkcja nieznaną.

Typ naprawy	Białko ludzkie	Białko homologiczne w komórkach <i>S. cerevisiae</i>	Funkcja białka (ew. motyw struktury)	Funkcja kompleksu w NER
Kompleks podstawowy	XPA RPA (HSSB)	Rad14 RPA	białko DDB białko SSB	rozpoznanie uszkodzenia DNA
"repairosom"	UV-DDB (XPE?)	?	białko DDB	
	TFIIH XPB (ERCC3) XPD (ERCC2) p44 p62 p52 p34 Cdk7 cyklina H MAT1	TFIIH Rad25 (Ssl2) Rad3 Ss11 Tbf1 Tbf2 Tbf4 Kin28 Cc11 Tbf3	3'→5' helikaza 5'→3' helikaza ?(<i>zinc-finger</i>) ? ?(<i>WD-repeat</i>) ?(<i>zinc-finger</i>) kinaza białkowa aktywator CDK stabilizator CDK	tworzenie otwartego kompleksu naprawczego (kompleks pre-incision)
	XPC HHR23B	Rad4 Rad23	białko SSB ?(<i>motyw ubikwityny</i>)	stabilizacja kompleksu "pre-incision"
	XPG (ERCC5)	Rad2	endonukleaza (3')	
	XPF (ERCC4, ERCC1) ERCC1	Rad1 Rad10	endonukleaza (5')	Wycięcie uszkodzenia
Naprawa nici transkrybowanej "TCR"	CSA (ERCC8) CSB (ERCC6)	Rad28 Rad26	?(<i>WD-repeat</i>) ?(<i>motyw helikazy</i>)	?
Naprawa DNA nieaktywnego "GGR"	? ?	Rad16 Rad7	?(<i>motyw helikazy</i>) ?	?

kompleksu, tworząc tak zwany "repairosoom" nawet pod nieobecność uszkodzonego DNA [38]. Tak więc, mniej lub bardziej gotowy kompleks naprawczy prawdopodobnie występuje w formie "preformowanej", gotowy do podjęcia naprawy DNA. Z oczyszczonych białek ludzkich udało się odtworzyć kompleks naprawczy, w pełni funkcjonujący w reakcji *in vitro*. Stwierdzono, że do rozpoznania i wycięcia uszkodzenia niezbędne były białka: RPA, XPA, XPC, XPG, ERCC1, XPF oraz kompleks TFIIH [1, 22]. Kompleks NER odtworzono również z białek drożdży, homologicznych do wymienionych wyżej białek ludzkich [9, 38] (patrz tabela). Wymienione składniki NER funkcjonowały w reakcji *in vitro*, w której substratem był nagi DNA. Jednak w warunkach *in vivo* rzeczywistym substratem jest DNA związany ze złożonymi strukturami białkowymi, takimi jak oktamer histonowy czy kompleks transkrypcyjny. Szereg danych wskazuje, że w komórce funkcjonują dwa częściowo niezależne rodzaje NER. Jednym z nich jest naprawa nici transkrybowanej genów aktywnych transkrypcyjnie, tzw. *transcription-coupled repair* (TCR). Drugim rodzajem NER jest naprawa pozostałej części genomu, czyli *global genome repair* (GGR). Zakłada się, że każdy z nich oprócz podstawowego, wspólnego zestawu białek ("repairosoomu") zawiera dodatkowe, specyficzne składniki.

5. NAPRAWA DNA ZALEŻNA OD TRANSKRYPCJI (TCR)

Stwierdzono, że różne obszary genomu naprawiane są z różną szybkością. Najszybciej naprawiane są nici będące matrycami w procesie transkrypcji, najwolniej nieaktywna transkrypcyjnie heterochromatyna. Z szybkością pośrednią naprawiane są (traktowane jako dwuniciowa całość) geny aktywne lub potencjalnie aktywne transkrypcyjnie. Preferencyjna naprawa nici transkrybowanych jest wynikiem TCR. W komórkach ludzkich białkami specyficznymi dla tego mechanizmu są CSA i CSB [10, 43]. Uszkodzenia genów kodujących oba białka stwierdzono u chorych z zespołem *Cockayne syndrome* (CS), charakteryzującym się między innymi zaburzeniami transkrypcji i brakiem preferencyjnej naprawy DNA transkrybowanego.

Wiadomo, że preferencyjna naprawa nici transkrybowanej jest całkowicie zależna od transkrypcji danego genu [49]. Jednak dotychczas nie wiadomo, jak funkcjonuje TCR w komórkach eukariotycznych oraz jaka jest rola białek CSA i CSB. Jedną z hipotez zakłada, że kompleks CSA/CSB (ewentualnie razem z TFIIH) jest detektorem polimerazy RNA zablokowanej na uszkodzeniu [43]. W takim ujęciu brak białek CSA i CSB byłby przyczyną defektu naprawy, prowadzącego do zaburzeń transkrypcji obserwowanych w komórkach CS. Alternatywna hipoteza zakłada, że białka CSA i CSB są czynnikami transkrypcyjnymi, zaś pierwotnym wynikiem braku tych białek jest defekt transkrypcji. Ponieważ TCR zależny jest od transkrypcji, wtórnym efektem zaburzeń transkrypcji mógłby być defekt naprawy [5].

Istotnym elementem kompleksu NER jest generalny czynnik transkrypcyjny TFIIH. Tak zwany holoTFIIH składa się z rdzenia (w skład którego wchodzi między innymi helikazy XPB i XPD) oraz kinazy CAK (kompleksu cykliny H i cyklicznej kinazy Cdc7). Składnikami TFIIH bezpośrednio związanymi z naprawą są białka XPB i XPD, natomiast obecność kinazy CAK prawdopodobnie nie jest niezbędna w trakcie naprawy DNA. Jeden z modeli zakłada, że rdzeń TFIIH mógłby tworzyć odwracalne kompleksy z CAK lub z białkami NER, a to determinowałoby jego udział w transkrypcji bądź w naprawie [11, 23, 39]. Nie wiadomo, jakie znaczenie dla naprawy nici transkrybowanej ma fakt, że TFIIH bierze udział w obu procesach. Początkowo uważano, że na etapie elongacji łańcucha RNA TFIIH nie jest związany z kompleksem polimerazy II RNA. Część danych sugeruje jednak, że i w tej fazie transkrypcji TFIIH oddziałuje z kompleksem transkrypcyjnym [52]. Mogłoby to mieć istotne znaczenie dla preferencyjnej naprawy genów transkrybowanych. Szczegółowe dane na temat współzależności transkrypcji i naprawy DNA można znaleźć w innych pracach przeglądowych [4, 6, 39].

6. NAPRAWA DNA NIE TRANSKRYBOWANEGO (GGR)

Większa część DNA naprawiana jest w procesie *global genome repair*. Defekt GGR wykryto po raz pierwszy u pacjentów z zespołem *xeroderma pigmentosum* grupy C (XP-C). W komórkach z uszkodzonym genem *XPC* prawidłowo funkcjonuje naprawa nici transkrybowanej, natomiast brak naprawy nici kodującej i DNA nieaktywnego transkrypcyjnie. Funkcjonowanie TCR w komórkach XP-C tłumaczy ich relatywnie dużą oporność na czynniki uszkadzające DNA, pomimo obniżenia całkowitego poziomu naprawy DNA do 10–20% [50]. Białko XPC występuje w kompleksie z HHR23B, ludzkim homologiem białka Rad23 drożdży [19]. Kompleks XPC/HHR23B mógłby pełnić następujące funkcje:

- 1) rozpoznawanie uszkodzenia (lub rozpoznawanie kompleksu DNA-XPA/RPA);
- 2) stabilizacja kompleksu zawierającego uszkodzony DNA, XPA/RPA oraz TFIIH;
- 3) ochrona DNA przed niespecyficzną degradacją przez nukleazy XPG i XPF/ERCC1.

W komórkach *S. cerevisiae* białkiem homologicznym do XPC jest Rad4. Jednak w przeciwieństwie do komórek XP-C, u mutantów *rad4* całkowicie brak naprawy DNA. Sugeruje to, że kompleks XPC/HHR23B, podobnie jak Rad4/Rad23, jest składnikiem podstawowego mechanizmu NER [31, 48]. Naprawa nici transkrybowanej w komórkach XP-C mogłaby być rezultatem przejęcia funkcji białka XPC przez czynniki specyficzne dla TCR.

W przypadku drożdży *S. cerevisiae* fenotyp zbliżony do XP-C wykazują mutanty *rad7* i *rad16*, u których również brak naprawy heterochromatyny (na przykład locus HML- α) i nici nietranskrybowanej [51]. Przypuszczalnie białka Rad7 i Rad16 działają w kompleksie, posiadając zdolność oddziaływania z Rad4 [45]. Stwierdzono, że białko Rad16 posiada domenę strukturalną swoistą dla helikaz DNA. Podobny do Rad16 element strukturalny mają białka z rodziny SWI2, które są czynnikami transkrypcyjnymi związanymi z derepresją heterochromatyny [3]. Natomiast białko Rad7 oddziałuje (przynajmniej *in vitro*) z białkiem Sir3, które jest strukturalnym komponentem heterochromatyny [25]. Może to sugerować, że ewentualny kompleks Rad7/Rad16 funkcjonuje jako czynnik zmieniający strukturę chromatyny. Do tej pory nie są znane ludzkie białka homologiczne do Rad7 i Rad16.

7. STRUKTURA CHROMATYNY WPŁYWA NA SZYBKOŚĆ NAPRAWY DNA

Czynnikiem mającym wpływ na szybkość naprawy genów aktywnych transkrypcyjnie jest preferencyjna naprawa nici transkrybowanej (zwykle uszkodzenia usuwane są z tej nici 2 lub 3 razy szybciej niż z nici kodującej). Nie jest to jednak czynnik jedyny. Zaobserwowano, że w genie, którego transkrypcję wyłączono poprzez delecję fragmentu promotora, brak preferencyjnej naprawy nici będącej matrycą dla polimerazy RNA. Pomimo tego, uszkodzenia z obu nici DNA tego genu były usuwane dwukrotnie szybciej niż z heterochromatyny [49]. Stwierdzono, że uszkodzenia w różnych pozycjach nici kodującej i DNA nie transkrybowanego naprawiane są ze zróżnicowaną szybkością (w przeciwieństwie do TCR, gdzie uszkodzenia w różnych pozycjach nici transkrybowanej naprawiane są z jednakową szybkością). Wynika to najprawdopodobniej z różnej dostępności uszkodzeń w miejscach oddziałujących z różnymi białkami (histony, białka niehistonowe chromatyny, czynniki transkrypcyjne) [40].

Wydaje się, że poza samą transkrypcją (a więc udziałem TCR), czynnikiem mającym wpływ na preferencyjną naprawę genów aktywnych transkrypcyjnie (lub potencjalnie aktywnych) są specyficzne cechy strukturalne aktywnej chromatyny. Jedną z takich cech jest modyfikacja struktury nukleosomów, często związana z modyfikacją histonów. Stwierdzono, że naprawa DNA jest szybsza w komórkach, w których inhibitorami deacetylaz indukowano hyperacetylację histonów [29]. Inną cechą chromatyny aktywnej transkrypcyjnie jest jej oddziaływanie ze strukturami szkieletu jądrowego. Postuluje się, że podobnie jak replikacja i transkrypcja, procesy naprawy DNA przebiegają w kontakcie z tymi strukturami [46]. Toteż oddziaływanie chromatyny aktywnej transkrypcyjnie ze szkieletem jądrowym również może być przyczyną jej preferencyjnej naprawy.

8. ZMIANY STRUKTURY NUKLEOSOMOWEJ W TRAKCIE NAPRAWY DNA

Stwierdzono, że dimery pirymidynowe powstałe w obrębie DNA rdzeniowego naprawiane są z szybkością niezależną od położenia uszkodzenia w stosunku do powierzchni nukleosomu [12]. Sugerowało to, że w trakcie naprawy DNA następuje rearanżacja nukleosomów (lub nawet ich całkowite usuwanie) ułatwiająca dostęp kompleksu reperacyjnego do uszkodzenia. Jeden z proponowanych modeli zakłada, że w trakcie fazy szybkiej naprawy uszkodzenia udostępniane są dzięki dysocjacji histonów. Natomiast w czasie fazy wolnej uszkodzenia udostępniane byłyby poprzez przemieszczanie się nukleosomu [33].

Jednym z potencjalnych mechanizmów rearanżacji chromatyny jest modyfikacja histonów, na przykład acetylacja, ubikwitynacja czy poli(ADP)-rybozylacja. Enzymem odpowiedzialnym za poli(ADP)-rybozylację białek jest polimeraza poli(ADP)-rybozy (PARP). PARP jest enzymem aktywowanym przez przyłączenie się do wolnych końców DNA (np. pojawiających się w rezultacie uszkodzeń DNA). W chwili obecnej fizjologiczna rola PARP pozostaje niejasna. Jedna z hipotez sugeruje, że katalizowana przez PARP modyfikacja histonów stymuluje ich dysocjację i ułatwia dostęp do uszkodzonego DNA [2].

Zmiana struktury nukleosomowej w trakcie naprawy DNA może być również wynikiem działania wyspecjalizowanych kompleksów białkowych, podobnie jak ma to miejsce w procesie transkrypcji. Do tej pory znane są trzy kompleksy zmieniające strukturę chromatyny i aktywujące transkrypcję: SWI/SNF, NURF (*nucleosome remodeling factor*) i RSC (*remodeling the structure of chromatin*). Kompleksy te zawierają ATP-azy zależne od DNA i posiadające domeny strukturalne helikaz DNA (taką ATP-azą jest SWI2 z kompleksu SWI/SNF). Aktywność tych kompleksów umożliwia derepresję chromatyny i wiązanie do DNA nukleosomowego specyficznych czynników transkrypcyjnych. Nie wiadomo jednak, czy jest to związane z dysocjacją nukleosomów (być może są one przesuwane lub dysocjują tylko dimery H2A/H2B) [15, 17, 27, 36]. Białkami wykazującymi homologię do białek z rodziny SWI2 są składniki NER: Rad16, Rad26, CSB. Nie wiadomo, jaki jest mechanizm działania tych białek. Hipotetyczna rola białka Rad16 mogłaby polegać na usuwaniu z uszkodzonego DNA histonów, do tej pory nie stwierdzono jednak żadnej aktywności enzymatycznej tego białka. CSB i Rad26, podobnie jak SWI2, są ATP-azami zależnymi od DNA i metodami *in vitro* nie stwierdzono ich aktywności helikazowej. Stwierdzono również, że CSB (przynajmniej *in vitro*) nie katalizuje dysocjacji polimerazy II RNA zablokowanej na uszkodzonym DNA. CSB tworzy kompleksy (*in vitro*) z XPA i TFIIH, co sugeruje jego udział w ułatwianiu oddziaływań pomiędzy "repairosomem" a kompleksem zawierającym zablokowaną polimerazę RNA [32].

Część informacji o sposobie ekspresji informacji genetycznej zakodowanej w sekwencji nukleotydów zawarta jest w strukturze chromatyny. Toteż rezultatem kompletnej naprawy DNA, poza przywróceniem prawidłowej struktury nukleotydów, powinno być odtworzenie pierwotnej struktury chromatyny. Z procesami umożliwiającymi dostęp kompleksu naprawczego do DNA muszą więc współdziałać mechanizmy rekonstrukcji chromatyny. Stwierdzono, że reperacyjna synteza DNA jest czynnikiem stymulującym rekonstrukcję chromatyny, a nowosyntetyzowane fragmenty są wydajnie włączane do powstających nukleosomów [30]. W warunkach fizjologicznych w tworzeniu nukleosomów biorą udział wyspecjalizowane kompleksy białkowe. W komórkach ludzkich takim kompleksem jest CAF1 (*chromatin assembly factor*). Działanie CAF1 jest specyficzne dla odtwarzania nukleosomów w trakcie replikacji [13]. Przypuszcza się, że czynnik CAF1 bierze również udział w rekonstrukcji nukleosomów w trakcie naprawczej syntezy DNA [7, 14]. Być może z rekonstrukcją nukleosomów w trakcie naprawy DNA związane są również inne czynniki, takie jak NAP1 (*nucleosome assembly protein*) [13].

9. UWAGI KOŃCOWE

Struktura chromatyny wywiera wpływ na powstawanie i naprawę uszkodzeń materiału genetycznego. Obecność nukleosomów jest czynnikiem chroniącym DNA przed niektórymi czynnikami genotoksycznymi, lecz jednocześnie spowalniającym naprawę DNA. Procesy naprawy chromatyny związane są z reorganizacją struktury nukleosomów. Ma ona na celu ułatwienie dostępu enzymów naprawczych do uszkodzenia, a następnie odtworzenie pierwotnej struktury chromatyny. Związki pomiędzy strukturą chromatyny a naprawą DNA poznane są najlepiej w przypadku mechanizmu NER. Można jednak przypuszczać, że obecność nukleosomów jest czynnikiem silnie wpływającym na przebieg innych rodzajów naprawy DNA. Wydaje się, że wyjaśnienie, w jaki sposób naprawiana jest chromatyna ("prawdziwy" substrat dla kompleksów reperacyjnych) oraz jakie są wzajemne związki pomiędzy naprawą a transkrypcją i replikacją DNA, będzie kolejnym etapem poznania mechanizmów naprawy DNA.

LITERATURA*

- [1] ABOUSSEKHRA A, BIGGERSTAFF M, SHIVJI MKK, VILPO JA, MONCOLLIN V, PODUST VN, PROTIC M, HUBSCHER U, EGLY JM, WOOD RD. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 1995; **80**: 859–868.

*Dla zmniejszenia objętości część cytowanego piśmiennictwa stanowią artykuły przeglądowe.

- [2] ALTHAUS FR, HOFFERER L, KLECZKOWSKA HE, MALANGA M, NAEGELI H, PANZETER PL, REALINI CA. Histone shuttling by poly ADP-ribosylation. *Mol Cell Biochem* 1994; **138**: 53–59.
- [3] BANG DD, VERHAGE RA, GOOSEN N, BROUWER J, van de PUTTE P. Molecular cloning of RAD16, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Acids Res* 1992; **20**: 3925–3931.
- [4] BHATIA PK, WANG Z, FRIEDBERG EC. DNA repair and transcription. *Curr Opin Gen Devel* 1996; **6**: 146–150.
- [5] CHU G, MAYNEL. Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and tricho-thiodystrophy: do the genes explain the diseases? *Trends Gen* 1996; **12**: 187–192.
- [6] FRIEDBERG EC. Relationships between DNA repair and transcription. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 15–42.
- [7] GAILLARD PHL, MARTINI EMD, KAUFMAN PD, STILLMAN B, MOUSTACCHI E, ALMOUZNI G. Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor 1. *Cell* 1996; **86**: 887–896.
- [8] GALE JM, NISSEN KA, SMERDON MJ. UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6644–6648.
- [9] GUZDER SN, HABRAKEN Y, SUNG P, PRAKASH L, PRAKASH S. Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A and transcription factor TFIIF. *J Biol Chem* 1995; **270**: 12973–12976.
- [10] HENNING KA, LI L, IYER N, McDANIEL LD, REAGAN MS, LEGERSKI R, SCHULTZ RA, STEFANINI M, LEHMANN AR, MAYNE LV, FRIEDBERG EC. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell* 1995; **82**: 555–564.
- [11] HOEIJMAKERS JHJ, EGLY JM, VERMEULEN W. TFIIF: a key component in multiple DNA transactions. *Curr Opin Gen Devel* 1996; **6**: 26–33.
- [12] JENSEN KA, SMERDON MJ. DNA repair within nucleosome cores of UV-irradiated human cells. *Biochemistry* 1990; **29**: 4773–4782.
- [13] KAUFMAN PD. Nucleosome assembly: the CAF and the HAT. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 369–373.
- [14] KAUFMAN PD, KOBAYASHI R, STILLMAN B. Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes Dev* 1997; **11**: 345–357.
- [15] KINGSTON RE, BUNKER CA, IMBALZANO AN. Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev* 1996; **10**: 905–920.
- [16] KORNBERG RD, LORCH Y. Interplay between chromatin structure and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 371–375.
- [17] KRUDE T, ELGIN SCR. Chromatin: pushing nucleosomes around. *Curr Biol* 1996; **6**: 511–515.
- [18] MACLEOD MC. Interaction of bulky chemical carcinogens with DNA in chromatin. *Carcinogenesis* 1995; **16**: 2009–2014.
- [19] MASUTANI C, SUGASAWA K, YANAGISAWA J, SONOYAMA T, UI M, ENOMOTO T, TAKIO K, TANAKA K, van der SPEK PJ, BOOTSMAN D, HOEIJMAKERS JHJ, HANAO-KA F. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J* 1994; **13**: 1831–1843.
- [20] MITCHELL DL, NGUYEN TD, CLEAVER JE. Non-random induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5353–5356.

- [21] MOYER R, MARIEN K, van HOLDE K, BAILEY G. Site-specific aflatoxin B1 adduction of sequence-positioned nucleosome core particles. *J Biol Chem* 1989; **264**: 12226–12231.
- [22] MU D, PARK CH, MATSUNAGA T, HSU DS, REARDON JT, SANCAR A. Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem* 1995; **270**: 2415–2418.
- [23] NIGG EA. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 312–317.
- [24] NIGGLI HJ, CERUTTI PA. Nucleosomal distribution of thymine photodimers following far- and near-ultraviolet irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **105**: 1215–1223.
- [25] PAETKAU DW, RIESE JA, MacMORRAN WS, WOODS RA, GIETZ RD. Interactions of the yeast Rad7 and Sir3 proteins: implications for DNA repair and chromatin structure. *Genes Dev* 1994; **8**: 2035–2045.
- [26] PARANJAPE SM, KAMAKAKA RT, KADONAGA JT. Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 265–297.
- [27] PETERSON CL. Multiple SWItches to turn on chromatin? *Curr Opin Gen Devel* 1996; **6**: 171–175.
- [28] PRUSS D, HAYES JJ, WOLFFE AP. Nucleosomal anatomy - where are the histones? *BioEssays* 1995; **17**: 161–170.
- [29] RAMANATHAN B, SMERDON MJ. Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J Biol Chem* 1989; **264**: 11026–11034.
- [30] RYOJI M, TOMINNA E, YASUI W. Minichromosome assembly accompanying repair-type DNA synthesis in *Xenopus* oocytes. *Nucl Acids Res* 1989; **17**: 10243–10258.
- [31] SANCAR A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 43–81.
- [32] SELBY CP, SANCAR A. Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1997; **272**: 1885–1890.
- [33] SMERDON MJ. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol* 1991; **3**: 422–428.
- [34] SMITH BL, MACLEOD MC. Covalent binding of the carcinogen benzo[a]pyrene diol epoxide to *Xenopus laevis* 5S DNA reconstituted into nucleosomes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 20620–20629.
- [35] SMITH MM. Histone structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1991; **3**: 429–437.
- [36] STEGER DJ, WORKMAN JL. Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones. *BioEssays* 1996; **18**: 875–884.
- [37] SVAREN J, HORZ W. Regulation of gene expression by nucleosomes. *Curr Opin Gen Devel* 1996; **6**: 164–170.
- [38] SVEJSTRUP JQ, WANG Z, FEAVER WJ, WU X, BUSHNELL DA, DONAHUE TF, FRIEDBERG EC, KORNBERG RD. Different forms of TFIIF for transcription and DNA repair: holo-TFIIF and a nucleotide excision repairosome. *Cell* 1995; **80**: 21–28.
- [39] SVEJSTRUP JQ, VICHIP, EGLY JM. The multiple roles of transcription/repair factor TFIIF. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 346–350.
- [40] TIJSTERMAN M, TASSERON de JONG JG, van de PUTTE P, BROUWER J. Transcription-coupled and global genome repair in the *Saccharomyces cerevisiae* RPB2 gene at nucleotide resolution. *Nucl Acids Res* 1996; **24**: 3499–3506.
- [41] THRALL BD, MANN DB, SMERDON MJ, SPRINGER DL. Nucleosome structure modulates benzo[a]pyrenediol epoxide adduct formation. *Biochemistry* 1994; **33**: 2210–2216.
- [42] TORNALETTI S, PFEIFER GP. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *BioEssays* 1996; **18**: 221–228.
- [43] TROELSTRA C, van GOOL A, de VIT J, VERMEULEN W, BOOTSMAD, HOEIJMAKERS JHJ. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 1992; **71**: 939–953.

- [44] WANG Z, WU X, FRIEDBERG EC. Nucleotide excision repair of DNA by human cell extracts is suppressed in reconstituted nucleosomes. *J Biol Chem* 1991; **266**: 22472–22478.
- [45] WANG Z, WEI S, REED SH, WU X, SVEJSTRUP JQ, FEAVER WJ, KORNBERG RD, FRIEDBERG EC. The RAD7, RAD16 and RAD23 genes of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for transcription-independent nucleotide excision repair in vitro and interactions between the gene products. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 635–643.
- [46] WIDŁAK P. Specyfika powstawania i naprawy mutagennych uszkodzeń materiału genetycznego. *Post Biochem* 1994; **40**: 194–199.
- [47] WILLIAMS JI, FRIEDBERG EC. Deoxyribonucleic acid excision repair in chromatin after ultraviolet irradiation of human fibroblasts in culture. *Biochemistry* 1979; **18**: 3965–3972.
- [48] WOOD RD. DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 135–167.
- [49] VENEMA J, BARTOSOVA Z, NATARAJAN AT, van ZEELAND AA, MULLENDERS LHF. Transcription affects the rate but not the extent of repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the human adenosine deaminase gene. *J Biol Chem* 1992; **267**: 8852–8856.
- [50] VENEMA J, van HOFFEN A, KARCAGI V, NATARAJAN AT, van ZEELAND AA, MULLENDERS LHF. Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 4128–4134.
- [51] VERHAGE RA, ZEEMAN AM, de GROOT N, GLEIG F, BANG DD, van de PUTTE P, BROUWER J. The RAD7 and RAD16 genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from the silent mating type loci, are also required for repair of the nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 6135–6142.
- [52] YANKULOV KY, PANDES M, McCracken S, BOUCHARD D, BENTLEY DL. TFIIF functions in regulating transcription elongation by RNA polymerase II in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 3291–3299.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 21.01.1997 r.

Przyjęto: 11.04.1997 r.

Adres autora: Instytut Onkologii, 44-100 Gliwice.

POŁĄCZENIA SZCZELINOWE

GAP JUNCTIONS

Andrzej FIERTAK i Wincenty KILARSKI

Zakład Cytologii i Histologii, Instytut Zoologii UJ, Kraków

Streszczenie: Większość zespołów tkankowych zarówno organizmów dorosłych jak i tych będących w stadium zarodkowym ma międzykomórkowe kanały łączące ze sobą sąsiednie komórki. System kanałów łączących z jednej strony rozdziela, a z drugiej łączy ze sobą zespoły komórek w fizjologiczne podjednostki. Opisane kanały zapewniają ciągłość cytoplazmatyczną połączonych komórek i służą wymianie jonów, małych cząsteczek oraz zapewniają niską, międzykomórkową oporność elektryczną. Kanały lub ich zespoły są dobrze zdefiniowanymi jednostkami strukturalnymi opisanymi jako *połączenia szczelinowe*. Znaczenie ewolucyjne komunikacji międzykomórkowej przez istnienie połączeń szczelinowych, jawi się nam dopiero w perspektywie ich wszechobecności we wszystkich typach zwierząt tkankowych oraz w większości ich tkanek. Tylko nieliczne populacje komórek są pozbawione połączeń szczelinowych. Do tych należą komórki krwi oraz mięśni szkieletowych. W artykule przedstawiono krótki przegląd strukturalnych, molekularnych i funkcjonalnych własności połączeń szczelinowych na podstawie ostatnio dostępnej literatury i badań własnych.

Słowa kluczowe: połączenia szczelinowe, koneksyny

Summary: In embryonic and adult organisms, most tissues contain intercellular channels that connect each cell with all the neighbours that it contacts or divide the tissue into coupled subsets. These channels provide cytoplasmic continuity with regards to ions and small molecules, and their aggregates belong to a single ultrastructurally recognisable class: *gap junctions*. The evolutionary importance of a generalised intercellular communication system can be appreciated when one considers the widespread prevalence of gap junctions within animals of all multicellular phyla, and within almost all tissues of vertebrates. Only a few population of cells such as skeletal muscle cells and circulating blood cells are not equipped with gap junctions. This paper provides a brief review of the diverse structural, molecular and functional aspects of gap junctions as revealed by current research and our own studies.

Key words: gap junctions, connexins

1. WPROWADZENIE

Połączenia szczelinowe są wyspecjalizowanymi obszarami błony wielu komórek, dzięki którym komunikują się one między sobą (fot. 1). Tkanki i narządy nie są tylko sumą komórek, lecz są także obwodami regulacyjnymi, a ich fizjologiczna efektywność w dużej mierze zależy od zdolności komunikacyjnych. Istnieje kilka sposobów kooperacji międzykomórkowej. Komórka reaguje na różne typy sygnałów przez uwolnienie hormonów, czynników wzrostu, czy też innych mediatorów, które są wiązane przez specyficzne receptory. Bardziej lokalnie, komórki komunikują się przez glikoproteiny powierzchniowe lub molekuly adhezyjne, takie jak: kadheryny, integryny czy też dużą grupę cząsteczek immunoglobulinopodobnych, które wymieniają informacje między komórkami oraz między komórkami i ich środowiskiem międzykomórkowym. Te molekularne oddziaływania są związane z migracją, sortowaniem i grupowaniem komórek podczas rozwoju i prowadzą, co opisywał Gumbiner [69*], do powstania grup komórek, struktur wielokomórkowych, a w konsekwencji narządów. Występowanie zjawiska adhezji między komórkami nie ogranicza się tylko do stadiów rozwojowych. Wzajemne oddziaływanie komórek, przynajmniej w tkankach nabłonkowych, wymaga, zgodnie z badaniami Chena i Öbrinka [69*], istnienia wyspecjalizowanych kompleksów połączeniowych lub połączeń przylegających, adhezyjnych – *zonulae*, *maculae adherentes*.

Kooperacja sieciowa najszybciej osiągnana jest przez tworzenie kanałów pomiędzy komórkami i ich wypustkami. Jednakże, dla kontrastu z wielką ilością różnorodnych kanałów jonowych rozmieszczonych na całej powierzchni komórki, kanały międzykomórkowe muszą być tworzone przez dwie komórki, każda z nich bowiem dostarcza połowę kanału i oba półkanały muszą ściśle przylegać do siebie, aby umożliwić niespecyficzną wymianę z środowiskiem pozakomórkowym. W końcu, półkanały muszą dokładnie do siebie "pasować" w celu połączenia cytoplazmy obu komórek. Prawdopodobieństwo dowolnego łączenia się półkanałów wydaje się być małe. Jediną możliwością jego zwiększenia byłoby nagromadzenie wielu półkanałów na określonej, niewielkiej przestrzeni błony komórkowej, która odpowiadałaby analogicznej przestrzeni na komórce przyległej. W ten sposób przebiegają skomplikowane procesy adhezji komórek poprzedzające tworzenie kanałów, jak sądzi Jongen [69*].

Połączenia szczelinowe odkryto około 30 lat temu. Dewey i Barr [69*] jako pierwsi opisali strukturę wykrytą przy użyciu mikroskopu elektronowego w komórkach mięśni gładkich jelita czczego i nadali jej nazwę *nexus*. W rok później Robertson [69*] opisał heksagonalnie upakowane podjednostki w synapsach elektrycznych pomiędzy komórkami Mauthnera w rdzeniu przedłużonym karasia, a Revel i Karnovsky [69*] znaleźli w wątrobie i sercu obszary błon komórkowych,

[69*] – patrz artykuł przeglądowy Wolburg i Rolmann.



Fot. 1. Przekrój podłużny przez połączenie szczelinowe łączące dwie wypustki komórek mięśni gładkich macicy ludzkiej. Wycinek pobrano w czasie dokonywania cesarskiego cięcia. Zdjęcie wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego wykazuje charakterystyczną pięciowarstwową budowę połączenia szczelinowego, która jest podstawym kryterium morfologicznym do określenia tej struktury jako połączenia szczelinowego. Powiększenie około 300.000

które oddzielała szczelina o szerokości 1–2 nm. Była ona przenikliwą dla mikrocząsteczek wyznacznikowych i w ten sposób potwierdzili jej odmienność od strefy zamykającej, *zonula occludens*. Poprzez następne lata opisywano subtelną strukturę połączeń szczelinowych i, co ważniejsze, stało się oczywiste, że miejsca

niskiego oporu elektrycznego pomiędzy komórkami pobudliwymi odpowiadają połączeniom szczelinowym. Te połączenia były strukturalnie identyczne z połączeniami między wieloma innymi typami komórek i zostały nazwane synapsami elektrycznymi lub połączeniami elektrycznymi. Loewenstein i Kanno [69*] odkryli fascynujące zjawisko przemieszczania się barwnika z komórki nim zabarwionej do komórek przyległych, co podniosło znaczenie czynnościowe połączeń szczelinowych. We wczesnych badaniach nad połączeniami szczelinowymi zauważono, że połączone komórki nowotworowe zachowują się odmiennie. Loewenstein [69*] dowiódł, że ich połączenia przenoszą barwniki, mają niski opór elektryczny, ale nie wiążą metabolicznie komórek. Później wiele badań skupiało się nad tym generalnym problemem, jak opisać zależność pomiędzy zdolnością do przepływu barwników, oporem elektrycznym i występowaniem połączeń w komórkach nowotworowych.

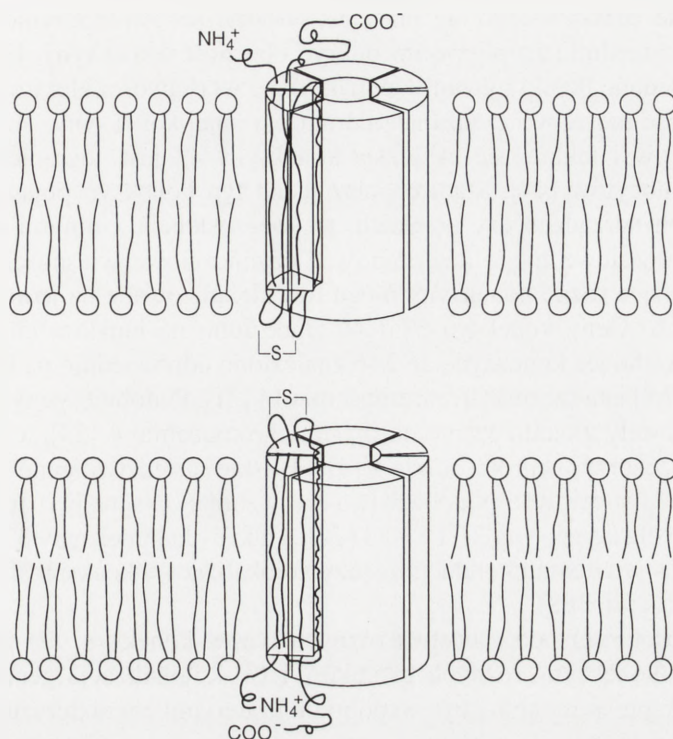
Używając neutralnych i negatywnie naładowanych związków o różnych masach cząsteczkowych, Simpson [69*] ocenił największą cząsteczkę mogącą przechodzić z jednej komórki gruczołu ślinowego larw ochotkowatych, *Chironomus* do drugiej na około 1158 daltonów (D). Masa cząsteczkowa substancji zastosowanej w tym doświadczeniu dobrze odpowiada średnicy kanału wynoszącej 1,4 nm. Obok substancji syntetycznych, zastosowanych do badań nad przepuszczalnością połączeń szczelinowych uwzględniano przede wszystkim związki fizjologicznie występujące w komórce. Stwierdzono, że aminokwasy, cukry, nukleotydy – Pederson [69*], przekaźniki drugiego rzędu jak cAMP – Tsien i Weingart [69*] oraz Ca^{2+} [9,17] są przede wszystkim transportowane przez połączenia szczelinowe. Metaboliczne i elektryczne połączenie komórek we wspólną "sieć tkankową" stało się podstawą do zrozumienia skomplikowanych zależności w systemach komórkowych.

2. STRUKTURA I SKŁADANIE KANAŁÓW POŁĄCZEŃ SZCZELINOWYCH

2.1. Budowanie bloków połączeń szczelinowych: koneksyny

Połączenia szczelinowe są ewolucyjnie konserwatywnymi strukturami, w których różne typy koneksyn wykazują około 59% homologii. Beyer [69*] przedstawił topologiczne modele koneksyn 32 i 43, z uwzględnieniem identycznych sekwencji aminokwasowych, w odniesieniu do pozycji w błonie komórkowej.

Wspólną cechą rodziny koneksyn są cztery regiony śródbłonowe i dwie pętle zewnątrzkomórkowe. Domeny cytoplazmatyczne reprezentują regiony specyficzne dla różnych typów koneksyn (rys. 1). Co prawda dotychczas sklonowano 12 koneksyn [3], np. kurzą koneksynę 56 i owczą MP70 [60] czy koneksynę 43 [3,51], to jednak wiele zależności między nimi jest wciąż niejasne. Zaproponowano, że białko zwane



Rys. 1. Model molekularny obrazujący przestrzenne rozmieszczenie cząstek koneksyny budujących dwa hydrofilowe półkanały – koneksony, które tworzą jeden, transmembranowy kanał połączenia szczelinowego. Każda z sześciu podjednostek białkowych składa się z jednej cząsteczki koneksyny, która czterokrotnie przechodzi przez błonę komórkową. Domeny 1 i 2 oraz 3 i 4 tworzą międzykomórkowe pętle połączone wiązaniem dwusiarczkowym. Domena 3 – hydrofilowa, tworzy jedną z sześciu polarnych wyściółek kanału koneksonu. Oba końce cząsteczki N i C znajdują się w cytoplazmie komórki

duktyną jest częścią składową plazmodesm komórek roślinnych [20]. Duktyna wydaje się być identyczna z 16 kDa białkiem wyizolowanym wspólnie z połączeniami szczelinowymi z mózgu wołu przez Dermietzela [69*]. To białko najprawdopodobniej wchodzi w skład wakuolarniej H⁺-ATPazy, szeroko rozpowszechnionej w królestwie zwierząt [4].

Obok znacznego stopnia homologii różnych koneksyn kręgowców, sekwencje jednego typu koneksyn wykazują w wielu przypadkach podobieństwa międzygatunkowe: dla przykładu, koneksyna 43 *Xenopus*, kury, człowieka, myszy i krowy w zestawieniu z koneksyną 32 szczura czy koneksyną 30 żaby [3]. Co więcej, Herzberg i Skibbens [69*] wykazali, że przeciwciała dla koneksyny 27 występującej w wątrobie szczura wiązały się z odpowiednimi antygenami wątroby ssaków, ryb i ptaków.

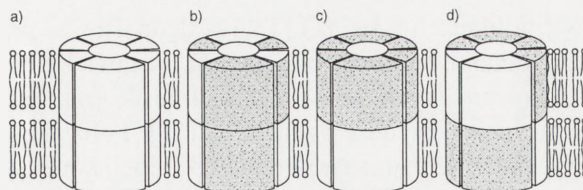
Porównanie rozwijającego się ptasiego systemu sercowonaczyniowego z jego ssaczym odpowiednikiem pozwoliło odkryć obecność koneksyny 43 w obu tych systemach. Badane tkanki ujawniły jednak różne właściwości elektrofizjologiczne. Ta niezgodność może być związana z dominacją innej koneksyny, 42 tzw. ptasiej, w sercu ptaków i faktem, że ekspresja koneksyny 43 jest ograniczona do specyficznych miocytów [44]. Stąd, chociaż jeden typ koneksyn pojawia się w porównywalnych narządach czy tkankach, to koegzystencja z innymi koneksynami i zależności ilościowe mogą determinować czynnościowe własności kanałów.

Geny kodujące różne koneksyny mogą być zlokalizowane na jednym lub wielu chromosomach. Geny koneksyn 37 i 40 znaleziono na ludzkim chromosomie 1 [68], a geny kodujące koneksynę 26 i 46 znaleziono odpowiednio na ludzkim chromosomie 13 [68] i na szurzym chromosomie 14 [21]. Podobnie, geny dla koneksyn 31.3 i 30.3 zostały zlokalizowane na mysim chromosomie 4 [24], a dla koneksyn 37 i 31.1 na szurzym chromosomie 4 [21]. Bliskie sąsiedztwo genów dla różnych koneksyn może sugerować podobieństwa we wzorach ekspresji i funkcji, co zaproponowano dla koneksyny 31.1 i 30.3 [24], a także dla koneksyny 37 i 40 [25,68]. Jednakże, nie stwierdzono korelacji między kolokalizacją i koekspresją dla ludzkiej koneksyny 26 i 46 [68].

W ten sposób, (1) podobieństwa różnych typów koneksyn, (2) podobieństwa jednego typu koneksyny różnych gatunków i (3) kolokalizacja genów koneksyn i wzory ich ekspresji mogłyby być wspólnymi kryteriami charakteryzującymi różne ich typy.

W jednej komórce jest możliwa ekspresja kilku różnych koneksyn. Na przykład, w mysich keratynocytach odkryto ich 5 typów [23], a w komórkach śródbłonna dwa, 37 i 43 [56]. Dwie koneksyny mogą występować także w obrębie jednego zespołu połączeniowego (połączenie heterotypowe), np. koneksyny 26 i 32 w hepatocytach [36] czy koneksyny 43 i 26 w komórkach epidermalnych [57]. Po mikroiniekcji odpowiednich transkryptów koneksyn, do oocytu *Xenopus* stwierdzono, że koneksyny 32 i 43 budują kanał heterologiczny [65]. Tak więc, na poziomie komórkowym różnorodność połączeń szczelinowych może być wzmocniona przez ekspresję różnych koneksyn i formowanie kanałów heterologicznych. Wciąż do końca nie wiadomo, czy różne koneksyny mogą tworzyć koneksyony heterooligomeryczne (heteroheksamery). Jednakże w badaniach nad połączeniami szczelinowymi w komórkach epidermalnych szczura Risek [57] dostarczył dowody na obecność homooligomerycznych koneksonów w połączeniach heterotypowych (rys. 2).

Studia nad rekonstrukcją i biofizyczną charakterystyką kanałów połączeń szczelinowych dostarczyły dowodów na to, że przewodność pojedynczego kanału, w zależności od typu koneksyny, z której jest on zbudowany, waha się pomiędzy 20 a 200 *pico* Siemensów (pS) [62]. Wielka różnorodność koneksyn obecnych w jednej komórce może być zatem systemem regulującym efektywność komunikacji między komórkami. Wyniki badań nad systemami modelowymi sugerują, że naj-



Rys. 2.. Schemat czterech kanałów połączeń szczelinowych o czterech możliwych kompozycjach cząsteczkowych dwóch typów koneksyn, każdy z koneksonów składa się z sześciu podjednostek białkowych – koneksyn, które mogą być identyczne lub mieszane: A - homomeryczne, homotypowe; B – heteromeryczne, homotypowe; C – homomeryczne, heterotypowe; D – heteromeryczne, heterotypowe

ważniejszą rolę w dopasowywaniu różnych typów koneksyn pełnią ich drugie domeny zewnętrzkomórkowe [66,67] (rys. 1). Werner udowodnił, że komórki tkanek *Xenopus*, produkujące koneksynę 38 mogą tworzyć połączenia z komórkami produkującymi szczurzą koneksynę 43, lecz nie z sąsiadującymi komórkami, w których ulega ekspresji koneksyna 32 [69*]. Teoretycznie, ten sposób łączenia zezwalałby na komunikację z pewnymi komórkami sąsiadującymi, a blokowałby łączność z innymi [21]. W włóknach Purkiniego ekspresji ulega koneksyna 40, a w miokardium komory głównie koneksyna 43. Obie te izoformy nie mogą jednak tworzyć połączeń szczelinowych, co być może stanowi o unikalnych właściwościach elektrycznych obu rejonów serca [7]. Obserwacje nad komórkami ścian naczyń krwionośnych zwróciły uwagę na fakt, że generalnie produkują one koneksynę 43. Każdy jednak z typów komórek ma dodatkowo inny rodzaj koneksyny, komórki endotelialne koneksynę 37, a komórki mięśniówki gładkiej koneksynę 40. Taki wzór ekspresji powoduje, że komórki te mogą wchodzić w specyficzne, indywidualne interakcje [56]. Innym przykładem może być różnicowanie się keratynocytów, podczas którego następuje kolejno zmiana jakościowa w ekspresji koneksyn. Koneksyny 26 i 43 są zastępowane przez koneksyny 31 i 31.1 [5]. Wiąże się to ze zmianami w przepuszczalności kanałów, co wyraża się spadkiem przenikania przez połączenia szczelinowe cząsteczek barwnika (żółcieni lucyferowej), pomimo że komórki pozostają nadal połączone elektrycznie [5].

2.2. Składanie koneksonów

Połączenia szczelinowe są płytkami zbudowanymi z setek i tysięcy kanałów wiążących przestrzeń między ściśle przylegającymi komórkami. Jako pierwszy strukturę pojedynczego kanału opisał Caspar [69*]. Każdy kanał składa się z dwóch koneksonów. Koneksyny z kolei są kompleksami sześciu identycznych podjednostek będących białkami integralnymi błon – koneksynami (rys. 1).

W procesie translacji białek integralnych błony produkt wbudowuje się w pierwszym etapie do błony ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Wydaje się to również prawdopodobne dla koneksyn, odkąd studia nad frakcjami subkomórkowymi wy-

kazały ich obecność w błonach siateczki [18,53]. Jednakże, w przeciwieństwie do eksperymentów nad innymi białkami błonowymi, wstawieniu *in vitro* koneksyn przy użyciu błon mikrosomalnych, uzyskanych z trzustki psa, towarzyszyła błędna obróbka tych białek przez peptydazę sygnałową [18]. Polegała ona na przecięciu łańcucha białkowego przez peptydazę w obrębie sekwencji koneksyny, co normalnie w komórkach nie zachodzi. Podobną obróbkę obserwowano w różnych typach komórek transfekowanych cDNA dla koneksyn, które wykazywały wysoki poziom ekspresji koneksyn [18], co sugeruje, że w normalnych warunkach błędna obróbka występuje wówczas, gdy zostanie przekroczony pewien poziom ekspresji koneksyn. Jak dotąd nie zostało wyjaśnione, czy w procesie wbudowywania się do błony i zwijania się cząsteczki koneksyny w środowisku hydrofobowym błony biorą udział białka ochronne, które stabilizują ich strukturę i zapobiegają przecinaniu, czy też komórka używa procesu cięcia jako mechanizmu regulującego syntezę lub kontrolującego jakość koneksyn.

Badania nad procesami translacji oraz inkorporacji koneksyn do błon unaocznily dwie istotne różnice między białkami połączeń szczelinowych, a innymi białkami integralnymi błon. Po pierwsze, mają one znacznie krótszy okres półtrwania, po drugie wydają się być składane w przedziale *trans* aparatu Golgiego [45], w przeciwieństwie do innych białek integralnych, których składanie zachodzi, jak ustalili Hurlley i Helenius [69*], w ziarnistej siateczce śródplazmatycznej. Postretikularne składanie koneksyn jest możliwe w późnych etapach transportu do błony dzięki wysokiej ich zawartości w aparacie Golgiego, co faworyzuje oligomeryzację. Koneksyny są zatem akumulowane w aparacie Golgiego *in vitro* [2] i prawdopodobnie *in vivo* [22]. Zaproponowano nawet, że koneksyny są składane dopiero po wbudowaniu w błonę [53]. Późne składanie białek połączeń szczelinowych może przeciwdziałać tworzeniu się wewnątrzkomórkowych połączeń szczelinowych, np. pomiędzy błonami organelli [45]. Po oligomeryzacji koneksyn w przedziale *trans* aparatu Golgiego, mogłyby one być natychmiast transportowane do miejsc docelowych w błonie komórkowej.

Z drugiej strony istnieją dane wskazujące, że tworzenie oligomerów następuje już w ziarnistej siateczce śródplazmatycznej, co pokazał Kumar [34,35] badając komórki transfekowane koneksyną 32. Co prawda jeszcze nie wiadomo, czy oligomeryzacja w ziarnistej siateczce śródplazmatycznej może też zachodzić w komórkach nietransfekowanych, lecz badania frakcji subkomórkowych wątroby szczura zdają się potwierdzać tę możliwość [18,53].

Odnalezienie koneksyn w komórkach nie tworzących połączeń szczelinowych w warunkach fizjologicznych, takich jak sarkoma S180 czy fibroblasty L929, skłania do przypuszczeń, że międzykomórkowe połączenia adhezyjne czy fosforylacja koneksyn nie są warunkiem niezbędnym do budowy koneksyn [45]. Youngowi [69*] udało się wbudować połączenia szczelinowe do błony, lecz nie zdołał określić, czy 27 kDa białka istniały jako pojedyncze oligomery (półkanały) czy jako dwu-

dzielne oligomery (kompletne kanały). W każdym razie dane elektrofizjologiczne sugerują, że niesparowane koneksyny mogą istnieć w błonie komórkowej [13]. Przy zastosowaniu specjalnych warunków eksperymentalnych, tj. wysokiego stężenia soli, wysokiego pH, substancji redukującej i detergentów, wyizolowano koneksyny z połączeń szczelinowych wątroby [64]. Analiza spektralna tych koneksynów wykazała wyraźną przewagę symetrii heksagonalnej i średnicę około 8 nm, czego spodziewali się już Unwin i Zampighi [69*] analizując trójwymiarowe mapy połączeń szczelinowych. Obserwowana przy pomocy mikroskopu elektronowego frakcja połączeń szczelinowych izolowanych z wątroby szczura pozwoliła określić bliżej ich strukturę. Koneksyny wydawały się być mniejsze, 4–6 nm średnicy, w porównaniu z wynikami Stauffera [64] oraz Unwina i Zampighiego. Odległość między środkami kanałów Hoh [69*] określił na 9,1 nm, a koneksyny wystawały na 0,4–0,5 nm z powierzchni płytki. Sikerwar [69*] pokazał, że natywna struktura krystalicznych, heksagonalnie upakowanych koneksyn owadów wykazuje podobne odległości pomiędzy środkami kanałów (8,5 nm) jak w przypadku połączeń szczelinowych z wątroby szczura i myszy. Trójwymiarowy obraz powierzchni przedstawił koneksyny jako anulane oligomery wystające na 3,0–4,5 nm do cytoplazmy. Kanał miał szerokość 4–4,5 nm w regionie zewnątrzkomórkowym.

Jak do tej pory, nie jest jasne, czy koneksyny mogą być wbudowane w błonę komórkową jako półkanały, a jeśli tak, czy mogą funkcjonować one jako przepuszczalne dla wody kanały łączące komórkę z przestrzenią zewnątrzkomórkową. Musil i Goodenough [45] stwierdzili, że półkanały są najprawdopodobniej zamknięte. Połączenia szczelinowe, jak wiele kanałów jonowych, są zależne od napięcia, chociaż stopień tej zależności zmienia się wraz z typem koneksyn [62]. Należy jednak zauważyć, że ciężar biologiczny tej zależności wciąż wymaga wyjaśnienia. Co ciekawsze, koneksynom brakuje charakterystycznej sekwencji aminokwasów noszących ładunek elektryczny, która jest specyficzna dla typowych białek kanałowych bramkowanych napięciem, budujących np. kanały wapniowe czy sodowe.

2.3. Tworzenie się kanałów międzykomórkowych z dwu półkanałów

Obecność połączeń szczelinowych nie tylko implikuje wbudowanie koneksyn do błony, ale także tworzenie całych kanałów. Komórki tworzące połączenia szczelinowe *in vivo* tracą swoją integralność po zastosowaniu procedur izolacyjnych, chociaż półkanały pozostają w błonie nienaruszone. Jednakże, półkanały w izolowanych komórkach nie mogą być identyfikowane przez technikę mrożenia i łamania (*freeze-fracture*), ponieważ typowy obraz grup koneksynów na powierzchni E (*External*) znika przez boczną dyspersję wywołaną rozłączeniem kanałów (fot. 2).

Wytworzenie przeciwciał skierowanych przeciwko różnym typom koneksyn pozwoliło na badania zachowań się kanałów połączeń szczelinowych w różnych

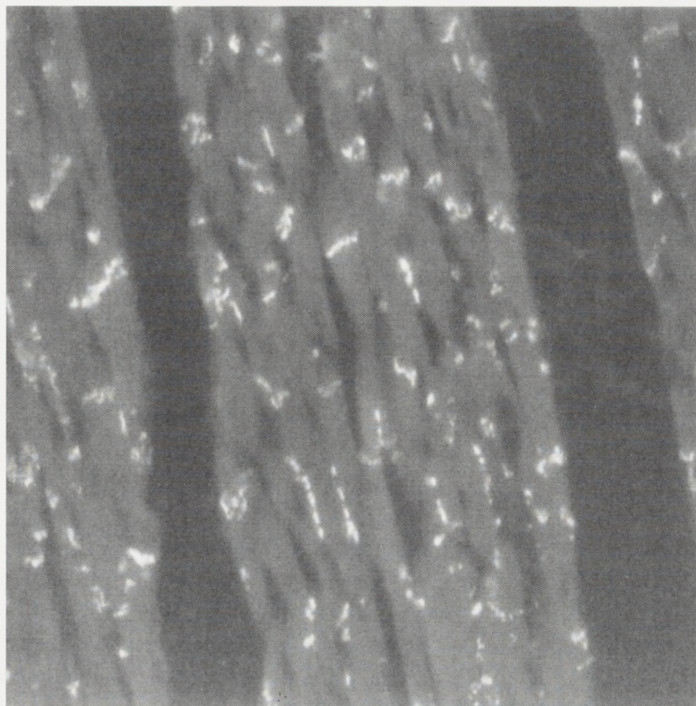


Fot. 2. Replika płytki połączenia szczelinowego z mięśniówki macicy myszy. Próbkę z mięśniówki pobrano w ostatnim dniu ciąży (20 dzień). Zamrożony w ciekłym azocie fragment tkanki poddano rutynowej procedurze krio-rytownicznej i fotografowano w mikroskopie elektronowym. Charakterystyczne, regularne ułożenie blisko siebie skupionych, okrągłych struktur – koneksonów wyróżnia połączenie szczelinowe od pozostałych elementów błony komórkowej: E (*Externum*) – część zewnętrzna błony komórkowej, P (*Plasma*) – część wewnętrzna, docytoplazmatyczna błony komórkowej (powiększenie około 200.000)

warunkach doświadczalnych i fizjologicznych komórek (fot. 3). Spray [69*] i Young [69*] badali własności elektryczne połączeń szczelinowych po wbudowaniu ich w sztuczną dwuwarstwową błonę lipidową. Przeciwciała skierowane przeciwko głównemu 27 kD białku blokowały przewodność kanałów. Z dowodów immunocytochemicznych Younga [69*], jak i elektrofizjologicznych Hertzberga [69*] wynika, że przeciwciała rozpoznają epitopy po cytoplazmatycznej stronie koneksonu. Wywołana przeciwciałami redukcja przewodności połączeń szczelinowych o przynajmniej 90% skłoniła Spraya [69*] do wniosku, że prąd przepływa raczej przez całe kanały niż półkanały. Redukcja przewodności o więcej niż 50% może być wyjaśniona tylko wtedy, gdy domeny cytoplazmatyczne mogą być rozpoznane przez przeciwciała niezależnie od orientacji sztucznej dwuwarstwowej błony lipidowej w pipiecie rejestrującej. Young [69*] nie zdołał określić, czy wbudowane białka istnieją jako oligomery czy kompletne kanały. W eksperymencie zaprojektowanym przez tegoż autora stopień, o jaki przeciwciała redukowały przewodność kanału wahał się między 30 a 90%. Ponadto w kilku, lecz nie we wszystkich, eksperymentach miejsca wiążące przeciwciała znajdowały się po obu stronach sztucznej błony.

Koneksony wymagają stabilizacji przez lipidy [41], a w szczególności przez cholesterol, co zwiększa stopień asocjacji połączeń szczelinowych w komórkach hepatomy Novikoffa [43]. Te badania nad wpływem lipidów na komunikację przez połączenia szczelinowe sugerują znaczenie lipidowego mikrośrodowiska obu półkanałów dla funkcjonalnej integralności kompletnych kanałów.

Fot. 3. Przekrój podłużny przez mięsień sercowy szczura traktowany przeciwciałami skierowanymi przeciw koneksynie 43. Technika immunocytochemiczna pozwala zlokalizować białka, koneksynę 43, która jest podstawowym składnikiem połączeń szczelinowych zlokalizowanych w tym przypadku w okolicy dysków interkalarnych łączących i spinających mioocyty serca. Podobną technikę, z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko różnym typom koneksyn można zastosować do innych tkanek np. macicy, wątroby itp. Powiększenie 800



Sily wiążące półkanały w płaszczyźnie błony komórkowej są stabilizowane raczej przez wiązania wodorowe niż kowalencyjne. Dwie pętle zewnątrzkomórkowe elementarnej jednostki białkowej koneksonu, koneksyny (rys. 1) są połączone wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem dwusiarczkowym [27]. Te wiązania są niezbędne dla przestrzennej stabilizacji łańcucha białkowego i, w rezultacie, dla poprawnego ułożenia całego kanału w szczelinie międzykomórkowej. Manjunath i Page [69*] nie potrafili natomiast wykazać obecności międzycząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych, między dwoma półkanałami, co sugeruje, że integralność kompletnego dodekameru jest utrzymywana przez niekowalencyjne wiązania wodorowe. Eksperymenty Barra [69*] wykorzystujące hipertoniczne roztwory, 0.5 M dwucukry lub 8 M mocznik do dysocjacji komórek w obrębie połączeń szczelinowych mogą posłużyć za dowód w powyższych rozumowaniach. Peracchia i Peracchia [69*] również wykorzystali tę metodę do uwidocznienia prawdziwej zewnętrznej powierzchni błony w obrębie połączenia i zaprezentowali zewnątrzkomórkowe filamenty, które miały wiązać ze sobą koneksyny. Milks [69*] i Goodenough [69*] również używali rozbitych połączeń szczelinowych do zademonstrowania specyficznych miejsc wiążących przeciwciała skierowane przeciwko różnym sekwencjom łańcucha polipeptydowego koneksyn. Podczas, gdy obserwowane w mikroskopie elektronowym, sprzężone ze złotem przeciwciała skierowane przeciwko cytopla-

zmatrycznym domenom koneksyny znakowały zarówno nietknięte, jak i rozbite połączenia szczelinowe. Przeciwciała skierowane przeciwko sekwencjom aminokwasowym pętli zewnątrzkomórkowych polipeptydu znakowały tylko połączenia rozbite. W studiach nad oczyszczaniem kanałów z izolowanych połączeń szczelinowych wątroby Staufer [64] nie mógł otrzymać oddzielnych dodekamerów, ponieważ dysocjują one do pojedynczych heksamerów. Jednakże jeśli oczyszczone koneksyny inkubuje się w obecności 4% glikolu polietylenowego 2000 w temperaturze 4°C czy w obecności 10% glikolu polietylenowego 2000 w temperaturze 15°C, koneksyny tworzą odpowiednio filamenty i krystaliczne warstwy. Był to dowód na to, że koneksyny mogą rosnąć przez asocjację końca z końcem, lecz także, w zmienionych warunkach, przez asocjację boczną. Jak zostało pokazane przez Kistlera i Bullivanta [69*] oraz Manjunatha i Page'a [69*] koneksyny komórek włókien soczewki i mięśnia sercowego mogą być zachowane jako sparowane jednostki pomimo procedur solubilizujących. Mazet [42] solubilizował połączenia szczelinowe koneksyny 32 z wątroby szczura i wprowadzał je do proteoliposomów. Badania te wykazały, że do błony komórkowej wbudowują się raczej całe kanały niż półkanały (koneksyny). Istnienie heterologicznych połączeń szczelinowych (połączenia między różnymi typami komórek syntetyzujące różne koneksyny) wymaga rozpoznania obszarów w zewnątrzkomórkowych domenach pętli koneksyn (rys. 1). Stabilność sekwencji aminokwasowych w tych domenach była prezentowana kilkakrotnie [3]. Pomimo tych właściwości występujących we wszystkich zbadanych do tej pory koneksynach i niekowalencyjnej natury wiązań międzycząsteczkowych [27], siła wiązań pomiędzy dwoma półkanałami wydaje się być tkankowo specyficzna. W każdym razie, domeny zewnątrzkomórkowe zdają się być konieczne dla tworzenia kanałów [35]. Mimo to, żaden typ koneksyn nie jest związany wystarczająco silnie w obrębie szczeliny aby uniemożliwić przecięcie połączenia na dwa półkanały podczas procesu mrożenia i łamania.

Podstawowe pytanie, dlaczego koneksyny w komórkach izolowanych nie są utrzymywane w grupach i jak powstają grupy koneksynów w czasie tworzenia połączeń szczelinowych, nie znajduje wystarczającej odpowiedzi w stwierdzeniu, że jest to spowodowane oddziaływaniem pomiędzy półkanałami w błonach sąsiadujących komórek. Najprawdopodobniej wiązania wodorowe między półkanałami są warunkiem koniecznym do stabilizacji pojedynczego kanału spajającego komórki, lecz nie wyjaśniają, w jaki sposób tysiące sparowanych koneksynów tworzy połączenie szczelinowe. W ogóle, wszystkie rozważania nad strukturalno-funkcjonalnymi relacjami w połączeniach szczelinowych uwzględniające odległości między koneksynami należy rozpocząć od stwierdzenia zależności wyników od procedur preparacyjnych. Raviola [69*] oraz Miller i Goodenough [69*] utrzymują, że utrwalanie tkanek powoduje dramatyczny wzrost upakowania koneksynów w połączeniach szczelinowych. W omawianych eksperymentach, procedura utrwalania jest zawsze podobna, a zatem nie może ona wpływać zasadniczo na różnice w gęstości koneksynów.

Jeśli bierze się pod uwagę agregujący wpływ glutaraldehydu, wszelkie dyspersje koneksonów są w rzeczywistości większe niż na replikach. Jednakże, Hoh [69*], który w studiach nad izolowanymi połączeniami szczelinowymi z wątroby używał mikroskopu elektronowego, nie był w stanie zaobserwować żadnych zmian w ich morfologii po utrwaleniu w glutaraldehydzie. Risek [57] próbował skorelować obecność agregatów ściśle i luźno upakowanych koneksonów w jednym połączeniu szczelinowym z heterotypowością połączenia (różne koneksyny w populacji półkanałów w obrębie jednej płytki połączeniowej). Zatem różne izoformy koneksyn byłyby odpowiedzialne za różne odległości między koneksonami.

Manjunath i Page [69*] analizowali połączenia szczelinowe z serca i wątroby na obecność połączeń dwusiarczkowych między koneksonami solubilizując błony komórkowe w deoksychołanie sodu i rozbijając wiązania dwusiarczkowe 2-merkaptanołem. Wynik ich doświadczeń był zaskakujący. Odkryli bowiem, że w połączeniach szczelinowych serca, w przeciwieństwie do wątroby, koneksyny tworzą grupy pośrednie – międzypodjednostki i że istnieją międzykoneksynowe wiązania dwusiarczkowe. Swoje wyniki tłumaczyli różnymi obciążeniami mechanicznymi komórek serca i wątroby. Kardiomiocyty ciągle są narażone na działanie sił rozciągających w płaszczyźnie błony. Zatem ich skurcz wymaga szczególnie wysokiego stopnia stabilizacji i zaczepienia składowych połączeń szczelinowych w błonie, co wydaje się mniej istotne w przypadku wątroby. Nie tylko typy koneksyn w nich występujące różnią serce i wątrobę, ale i struktura powierzchni cytoplazmatycznych. Braun [69*] na podstawie statystyczno-mechanicznej analizy replik połączeń szczelinowych wątroby postulował, że agregaty koneksonów nie są utrzymywane przez siły przyciągające między koneksonami w płaszczyźnie błony, lecz przez minimalizację siły odpychającej między przylegającymi błonami. Połączenie koneksonów w poprzek przestrzeni międzykomórkowej wymaga przezwyciążenia sił elektrostatycznych. Energia potrzebna na przezwyciążenie odpychania jest minimalizowana przez zmniejszenie powierzchni ścisłego przylegania błon. Ponieważ ucieczka pojedynczych koneksonów z płytki połączenia szczelinowego zwiększa powierzchnię ścisłego przylegania zapewniającą siłę motoryczną dla kohezji, ten model zakłada wolne ruchy boczne koneksonów w błonie i niezależność od cytoszkieletu. Rzeczywiście Hirokawa i Heuser [69*] oraz Shibata [69*] uwiidocznili powierzchnię cytoplazmatyczną połączeń szczelinowych w komórkach wątroby przy zastosowaniu techniki tzw. głębokiego rytowania (*deep-etching*) i stwierdzili, że jest ona pozbawiona miejsc przyczepu dla elementów cytoszkieletu. Z drugiej strony istnieją prace demonstrujące zmianę struktury połączeń szczelinowych pod wpływem inhibitorów cytoszkieletowych. Powstaje zatem pytanie, czy interakcje połączenia szczelinowe - cytoszkielet mają miejsce, czy też nie, podczas dynamicznych zmian w połączeniach.

3. POŁĄCZENIA SZCELINOWE I ICH MOLEKULARNE ŚRODOWISKO

3.1. Interakcje pomiędzy koneksonami a cytoszkieletem

Dobrze znana obserwacja, że na replikach połączenia szczelinowe są stale związane z powierzchnią P (Plasma), przynajmniej w tkankach kręgowców, sugeruje iż koneksyny mogą być zakotwiczone w podbłonowej cytoplazmie. Związanie z powierzchnią P jest niezależne od tego, czy komponenty cytoplazmatyczne są obecne przy powierzchni cytoplazmy czy też nie [54]. Istnieje tylko jeden wyjątek opisany u kręgowców [39]: połączenia szczelinowe w włóknach soczewki myszy w części są związane z powierzchnią E. W tkankach niektórych bezkręgowców, takich jak skorupiaki czy owady, Bosch [69*] pokazał połączenia szczelinowe związane z powierzchnią E (*Ekstracelular*). Dla kontrastu w tkankach dżdżownicy, *Eisenia foetida*, Hama [69*] opisał cząstki połączeń szczelinowych związanych zarówno z powierzchnią P, jak i E, a połączenia szczelinowe głowonogów, np. *Loligo pealei*, badane przez Ginzberga [69*], są morfologicznie nierozróżnialne od tych opisanych w tkankach kręgowców (fot. 2)

Większość danych dotyczących interakcji pomiędzy błoną zawierającą połączenia szczelinowe a cytoplazmą pochodzi z badań nad zespołami komórek kręgowców. Rassat [69*] opisał wzrost liczby i rozmiarów połączeń szczelinowych w komórkach wątroby pod wpływem inhibitora mikrotubul – siarczanu winblastyny. Nie był jednak w stanie stwierdzić czy zauważone zmiany wynikają z syntezy *de novo* białek połączeń szczelinowych, czy też z agregacji istniejących już cząsteczek prekursorowych. Tadvalkar i Pinto da Silva [69*] opisali podobne zjawisko, ale tym razem w komórkach nabłonkowych gruczołu prostaty, gdzie gwałtowne powstawanie połączeń szczelinowych następowało pod wpływem kolchicyny i cytochalazyny B i powstawanie to zachodziło nawet w obecności inhibitora metabolizmu, dinitrofenolu czy inhibitora syntezy białek, cykloheksimidu. Na tej podstawie autorzy ci zaproponowali, że prekursorzy koneksonów znajdują się pod kontrolą elementów cytoszkieletu. W momencie rozbicia tych elementów koneksyny migrują i łącząc się tworzą płytki połączeń szczelinowych. Wydaje się prawdopodobne, że tylko w tym ostatecznym miejscu przeznaczenia – płytce połączenia szczelinowego – zachodzi rozpoznanie pomiędzy półkanałami dwóch przylegających komórek, ponieważ miejsce przylegania występuje tylko w tych rejonach, gdzie, np. na replikach, uwidocznione są grupy koneksonów. Poza połączeniami szczelinowymi odległość między komórkami jest większa, co uniemożliwia tworzenie całych kanałów. Na podstawie powyższych obserwacji można przypuszczać, że poza płytką połączenia szczelinowego istnieje w błonie pula podjednostek koneksonów, lecz jest ona niedostępna dla procesu integracyjnego ze względu na zakotwiczenie przez elementy cytoszkieletu. Jednakże różnice czynnościowo-strukturalne pomiędzy komórkami

wątroby, serca, soczewki czy siatkówki, na których te obserwacje prowadzono, uniemożliwiają sformułowanie ogólnych zasad co do roli cytoszkieletu w powstawaniu połączeń szczelinowych. W połączeniach szczelinowych serca, Shibata i Yamamoto [69*] opisali powierzchnie cytoplazmatyczne wolne od elementów cytoszkieletu. Hirokawa i Heuser [69*], Shibata [69*] i Kuraoka [36] opisali, że w przeciwieństwie do gładkiej powierzchni połączeń szczelinowych w wątrobie, błony połączeń szczelinowych serca zawierają granularne substrukтуры wrażliwe na bezwapniowe roztwory fizjologiczne o wysokim stężeniu K^+ . Przytoczone wyniki są zgodne z publikowanymi wcześniej obserwacjami Manjunatha [69*]. Autor ten opisał białkową podjednostkę w połączeniach szczelinowych serca, którą można było wyizolować przy użyciu inhibitora proteaz serynowych – fluorku fenylometylosulfonylowego. Proteolizowane połączenia szczelinowe serca i połączenia szczelinowe wątroby bez inhibitora proteazy wykazywały taką samą ultrastrukturę. Badając połączenia szczelinowe serca Kardami [69*] znalazł biochemiczne i ultrastrukturalne dowody na związek zasadowego czynnika wzrostowego fibroblastów (bFGF) z tymi połączeniami. Autor sugeruje, że przeciwciała skierowane przeciwko N-końcowej domenie bFGF rozpoznawały epitopy położone poniżej błony z połączeniami szczelinowymi, które mogą być częścią składową "wystrzępionej" otoczki znalezionej w połączeniach szczelinowych serca. Także, w połączeniach szczelinowych astrocytów (zbudowanych z koneksyny 43) Yamamoto zademonstrował immunoreaktywność bFGF na poziomie mikroskopu elektronowego. Ponieważ koneksyna 43 została zidentyfikowana przez Saeza [69*] jako substrat dla kinazy C, funkcja połączeń szczelinowych złożonych z koneksyny 43 może być regulowana w drodze fosforylacji bFGF.

W badaniach nad połączeniami szczelinowymi serca, techniką mrożenia i lamania, Green i Severs [69*] odkryli, że bruzdy na powierzchni P, płytki połączeniowej, które nie miały swoich odpowiedników na powierzchni E, miały bezpośredni związek z połączeniami szczelinowymi i występowały jedynie w kilka minut po śmierci komórki, kiedy można się było spodziewać jej reorganizacji. Sugerowano, że bruzdy te odzwierciedlają miejsca przyczepu cytoszkieletu do koneksonów podczas lub po ich przemieszczeniu się w błonie. Page [69*] wykazał, że perfuzja sera roztworem zawierającym Ca^{2+} powoduje, rozproszenie kilku koneksonów poza płytkę w połączeniach szczelinowych. Obserwacja ta usprawiedliwia przypuszczenie o reorganizacji błon w miejscach połączeń szczelinowych, w której uczestniczą elementy cytoszkieletu. Jednakże, w obrębie samych połączeń szczelinowych gęstość koneksonów, w kilka minut po śmierci komórki, zmienia się mniej dramatycznie, niż możnaby się było tego spodziewać, gdyby filamenty były aktywne w reorganizacji ich powierzchni. Konfiguracja koneksonów w połączeniach szczelinowych serca, dyskutowana przez Greena i Seversa [69*], ulega zmianie w zależności od czasu, jaki upłynie od momentu śmierci zwierzęcia do utrwalenia tkanki. Regularne upakowanie heksagonalne, obserwowane przy natychmiastowym zamrożeniu tkanki

po śmierci zwierzęcia, zmienia się na mniej regularne, jeżeli zamrażanie nastąpi po upływie 20–40 min po śmierci zwierzęcia. W roku 1983 Page zaobserwował zmniejszenie się gęstości koneksonów w połączeniach szczelinowych serca po perfuzji roztworem Ca^{2+} . Przeciwnie, Dahl i Isenberg [69*] oraz Déléze i Hervé [69*] stwierdzili zmniejszenie się odległości między koneksonami po rozłączeniu komórek serca odpowiednio dihydroflabainą i heptanolem, a de Mazière i Scheuermann [69*] opisali wzrost gęstości koneksonów po hipoksji izolowanego serca szczurzego. Bernardini [69*] zademonstrował 14% spadek w międzykoneksjonalnych odległościach w komórkach trzustki po zadziałaniu heptanolem. Peracchia i Girsch [69*] uważają, że obie procedury rozłączające powodują wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Zasugerowali zatem, że kalmodulina bierze udział w zależnym od wapnia mechanizmie rozłączania komórek, zajmując miejsca wiążące po stronie cytoplazmatycznej między C i N końcem koneksyn. Zmiany konformacyjne powinny iść w parze ze zmniejszeniem odległości między koneksonami. To przypuszczenie jest zgodne z pracami Chuanga [69*] oraz Unwina i Ennisa [69*] opisującymi wzrost gęstości koneksonów po poddaniu komórek procesowi dysocjacji. Jednakże, większość danych dotyczących odległości między koneksonami, a pochodzących z doświadczeń nad łączeniem i rozłączaniem komórek dotyczy jedynie niewielkich zmian rzędu 1 nm. W świetle krytycznych rozważań metodologicznych [54] można zapytać, czy odległości mniejsze od 1 nm mogą być rzetelnie mierzone przy zastosowaniu technik replikacyjnych. Rzeczywiście Miller i Goodenough [69*], zaprzeczają istnieniu różnic w upakowaniu koneksonów w rezultacie eksperymentalnych zmian w przewodności połączeń. Z drugiej zaś strony w ostrym kontraście do poprzednich odkryć we wszystkich innych, badanych do tej pory systemach, fizjologiczne i odwracalne zmiany w gęstościach koneksonów komórek poziomych siatkówki ryb są znacząco większe. Tutaj średnia zmiana w odległościach pomiędzy koneksonami waha się w granicach 20–40 nm [37].

W połączeniach szczelinowych zewnętrznych komórek poziomych siatkówki karasia (*Carassius auratus*), Kurz-Isler i Wolburg [69*] opisali szybkie zmiany w zagęszczeniu koneksonów pod wpływem zmian warunków oświetlenia. W ciemności gęstość ta wynosiła 7000–8000 koneksonów/ μm^2 ; po adaptacji w świetle czerwonym spadła do 3000/ μm^2 . Poza tym podczas adaptacji w ciemności większość połączeń szczelinowych miała małe rozmiary i była podścielona elektronowo gęstym materiałem. W wielu przypadkach był on związany z mikrotubulami i mikrofilamentami. Występowanie materiału elektronowo gęstego pod zagęszczonymi koneksonami połączeń szczelinowych w czasie długo trwającej adaptacji do ciemności przemawia na korzyść funkcjonalnych zależności pomiędzy cytoszkieletem i koneksonami. W krótkotrwałych eksperymentach, po zaledwie parę minut trwającej ekspozycji na światło czerwone, autorzy zaobserwowali, na ultracienkich skrawkach, łatkowaty wzór ułożenia materiału osmofilnego, który przypominał wzór grup koneksonów na odpowiadających im replikach. Zasugerowali oni, że koneksyny w obrębie grupy

są ściślej związane z cytoszkieletem. Jednakże inne wyjaśnienia nie mogą być wykluczone. Obszary błony pomiędzy grupami koneksonów są tego samego rzędu wielkości co same grupy, jak i elektronowo gęste płytki. Dlatego, zagadnienie, która część połączenia szczelinowego jest związana z elektronowo gęstym materiałem nie jest ostatecznie wyjaśnione. Schimitz i Wolburg [69*] pokazali, że gęstość koneksonów w połączeniach szczelinowych zewnętrznych komórek poziomych siatkówki karasia hodowanych *in vitro* jest wrażliwa na różne wartości pH. W pH 6.5 gęstość wynosiła 8000–9000 koneksonów/ μm^2 , w pH 7,1 6000–7000/ μm^2 , a w pH 7,5 około 4000/ μm^2 . Najsilniej upakowane koneksyny występowały w sąsiedztwie związanego z błoną materiału elektronowo-gęstego. Materiał ten zniknął w wyższych wartościach pH. Niezależnie od fizjologicznego stanu połączenia komórek, reprezentowanego przez wysoką lub niską gęstość koneksonów w komórkach poziomych siatkówki, rezultaty Kurz-Islera i Wolburga [69*] oraz Schimitza i Wolburga [69*] niezmiennie pokazują współzależność wysokiej gęstości koneksonów z ich połączeniem z cytoszkieletem. Duże zagęszczenie koneksonów wydaje się występować w obecności osmofilnego materiału cytoplazmatycznego. Z drugiej zaś strony interesujące jest, że Vaughan i Laster [69*] nie byli w stanie rozłączyć elektrycznie rybiej komórek siatkówki przez poddanie ich działaniu cytochalazyny D, która depolimeryzuje F-aktynę. Jeśli łączenie systemów komórkowych ma miejsce przy dużym zagęszczeniu koneksonów, co zasugerowali Kurz-Isler i Wolburg [69*] oraz Kurz-Isler [37], to F-aktyna nie jest w tym przypadku odpowiedzialna za utrzymanie tej gęstości. Niestety nie ma dostępnych danych immunocytochemicznych czy też danych uzyskanych przy zastosowaniu techniki mrożenia-łamania demonstrujących efekt cytochalazyny D na los i kompozycję płytek cytoplazmatycznych oraz rozmieszczenia koneksonów podczas i po rozbiciu mikrofilamentów. Wyjątkowo w soczewkach naczelnych połączenia szczelinowe są związane z pęczkami filamentów aktynowych, które najprawdopodobniej zapewniają soczewkom strukturalną stabilność [40]. Jak widać zatem z powyższych rozważań, nie udało się jednoznacznie stwierdzić, ani przedstawić ogólnej zasady opisującej interakcję połączeń szczelinowych z cytoszkieletem w procesie ich formowania i kontroli odległości między koneksonami.

3.2. Relacje między połączeniami szczelinowymi i ścisłymi

Połączenia ściste (*Maculae occludens*) zostały opisane już w roku 1963 [19]. Tworzą one ciągłe pasmo wokół apikalnej części komórek nabłonkowych wyściełających rozmaite kanały, np. przewód pokarmowy. Połączenia ściste zamykają szczelnie światło przewodzący, np. jelita zapobiegając przeciekowi jego treści przez szczeliny międzykomórkowe. W rejonie połączeń ścisłych zewnętrzne warstwy błon komórkowych ulegają fuzji całkowicie eliminując w tym miejscu przestrzeń mię-

dzykomórkową, a ponadto blokują swobodny przepływ białek w płaszczyźnie błony komórkowej tej strefy.

Połączenia szczelinowe i połączenia ścisłe są często wspólnie rozmieszczone w wielu typach komórek. Friend i Gilula [69*] opisali połączenia szczelinowe i ścisłe w dużej liczbie nabłonków m.in. w komórkach pęcherzykowych trzustki, wątrobie, korze nadnerczy, najądrzach, jelicie cienkim i dwunastnicy. Podczas gdy w nabłonku trzustki połączenia szczelinowe są całkowicie otoczone przez pasma połączeń ścisłych, w wątrobie oba rodzaje połączeń są "wymieszane" niezmiernie rzadko. W jelicie cienkim połączenia szczelinowe nie leżą pomiędzy połączeniami ścisłymi; podobnie w najądrzu sieć połączeń ścisłych jest wolna od połączeń szczelinowych. W przypadku kory nadnerczy, autorom trudno było zdecydować, czy szeregi przylegające do dużych płytek połączeń szczelinowych to liniowo ułożone połączenia szczelinowe czy paciorkowane brzegi połączeń ścisłych.

Peracchia [69*] pokazał, że połączenia szczelinowe są oddzielone od ścisłych w płaszczyźnie bocznej błony komórek śluzowych z żołądka szczura. Dla kontrastu, według badań Bernardiniego [69*], w komórkach nabłonkowych żołądka szczura pasma połączeń ścisłych występują na przemian z połączeniami szczelinowymi. W splocie naczyniówkowym szczura, Van Deurs i Koehler [69*] opisali sieć pasm połączeń ścisłych, o połączeniach szczelinowych, natomiast, nie wspomnieli. W strefie przejściowej pomiędzy komórkami ependymalnymi (tylko połączenia szczelinowe) a komórkami splotu naczyniówkowego (tylko połączenia ścisłe) Mack [69*] znalazł połączenia ścisłe ze wstawionymi połączeniami szczelinowymi. W badaniach rozwojowych nad splotem naczyniówkowym kurczęcia Dermietzel [69*] znalazł obydwa typy połączeń. Pierwsze struktury połączeniowe nie rozwijają się przed 5 dniem rozwoju embrionalnego, w którym cząstki zaczynają tworzyć pasma i grupy.

W kompleksie oocytarno-folikularnym myszy Van den Hoef [69*] odkrył, obok niezidentyfikowanych rzędów romboidalnych cząstek, heterologiczne połączenia szczelinowe pomiędzy oocytem a otaczającymi go komórkami folikularnymi. Po defolikulacji oocyty zyskały szeregi przypominające połączenia ścisłe, które były sporadycznie związane z małymi połączeniami szczelinowymi. Liniowe struktury mogą nie być oryginalnymi połączeniami ścisłymi, lecz fragmentami połączeń szczelinowych przeorganizowanych w wyniku defolikulacji. W zdysocjowanych i ponownie zagregowanych komórkach B trzustki szczura In't Veld [69*] opisał połączenia ścisłe i szczelinowe tworzące nieregularne agregaty pasm i grup koneksonów. Meda [69*] opisał struktury ułożone liniowo i zasugerował, że reprezentują one niezwykle formy połączeń szczelinowych lub etap pośredni w tworzeniu połączeń ścisłych, a być może nawet stadium przejściowe pomiędzy połączeniami szczelinowymi i ścisłymi. Decker i Friend [69*], po badaniach nad zarodkiem płazim w stadium neurulacji, sugerowali rolę podporową połączeń ścisłych wobec wczesnych połączeń szczelinowych. W innych badaniach, na skórze podudzia za-

rodka kurczenia, Elias i Friend [69*] obserwowali proces proliferacji połączeń szczelinowych wywołany kwasem retinowym, który poprzedzał proces powstawania połączeń ścisłych. Dermietzel [69*] i Larsen [69*] rozważali możliwość istnienia wspólnej puli cząstek błonowych dla tych dwóch typów połączeń, co wydaje się jednak mało prawdopodobne. Odmienne, w teoretycznej analizie dotyczącej tworzenia połączeń Weinbaum [69*] założył, że cząstki o różnych biochemicznych i elektrycznych właściwościach są ściśle związane. Bardziej bezpośrednio, Simonescu [69*] pokazał w komórkach endotelialnych tętnic i żył istnienie, obok typowych połączeń ścisłych i szczelinowych, tzw. połączeń specjalnych, które składały się ze ściśle przylegających koneksonów i pasm połączeń ścisłych. Być może połączenia ściśle spełniają jakąś rolę w stabilizacji koneksonów w płaszczyźnie błony.

Rozważania nad bliskimi zależnościami topograficznymi pomiędzy połączeniami szczelinowymi i ścisłymi są szczególnie interesujące, jeżeli weźmie się pod uwagę ostatnie obserwacje. Furuse [69*] zidentyfikował pierwsze błonowe białko integralne połączeń ścisłych nazwane okludyną. To 55.9 kDa białko zostało zsekwencjonowane, a mapa hydrofilności odkryła 4 domniemane domeny transbłonowe z dwoma zewnątrzkomórkowymi pętlami. Co prawda okludyna nie wykazuje podobieństwa do koneksyn pod względem sekwencji aminokwasów, lecz struktura molekularna może sugerować podobieństwo funkcjonalne. W przeciwieństwie do koneksyn, które są składane w cylindryczne struktury z kanałem w środku, cząsteczki okludyny są składane w sposób liniowy. Dziwne podobieństwo niektórych połączeń szczelinowych do połączeń ścisłych i ich topograficzne nakładanie się w niektórych typach komórek, zgodnie z propozycjami Weinbauma [69*], sugeruje ich wzajemne związki. Jednakże, te związki nie mają generalnego znaczenia dla tworzenia połączeń, ponieważ w wielu komórkach występuje tylko jeden lub drugi typ połączenia.

3.3. Połączenia szczelinowe a wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia

Wapń był pierwszym opisanym czynnikiem cytoplazmatycznym biorącym udział w regulowaniu funkcji połączeń szczelinowych. Może on pełnić rolę czynnika bramkującego kanał, jak i substancji przenoszonej przez kanał w drodze dyfuzji. Wzrost stężenia wapnia związane z redukcją komunikacji przez połączenia szczelinowe, co jednak zachodziło przy нефизjologicznych stężeniach Ca^{2+} . Należy jednak przypuszczać, że proces ten może zachodzić również w warunkach patologicznych.

Ostatnio pojawiło się wiele obserwacji, które wskazują, że zmiany oscylacyjne w stężeniu wapnia i międzykomórkowe przenoszenie fali wolnego wapnia może służyć do koordynowania wielu czynności tkanek w różnych warunkach fizjologicznych, na przykład w interakcjach pomiędzy komórkami nerwowymi i glejowymi. Pewne dane wskazują, że zmiany poziomu wapnia w komórkach glejowych mogą powodować zmiany w poziomie wapnia w przyległych komórkach nerwowych, a proces ten zachodzi przy udziale połączeń szczelinowych łączących obydwa typy

komórek [46]. Istnieje jednak trudność związana interpretacją tego zjawiska. W astrocytach ulega bowiem ekspresji koneksyna 43, podczas gdy neurony wytwarzają koneksynę 32 [15], a z badań nad oocytami *Xenopus* wynika, że te dwie izoformy koneksyn są "niekompatybilne" [67]. Tak więc, pozostaje do ustalenia fakt, czy inne "kompatybilne" koneksyny nie występują w tych dwóch typach komórek. Z drugiej strony mogą istnieć inne mechanizmy pozwalające na przekazanie sygnału z astrocytów do neuronów, na przykład komunikacja przez kanały bramkowane glutationem [50].

4. REGULACJA FUNKCJI POŁĄCZEŃ SZCZELINOWYCH

4.1. Synteza i regulacja ekspresji koneksyn

Pomimo 30 lat badań nad połączeniami szczelinowymi, regulacja ich syntezy, czasu trwania w błonie i usuwania jest wciąż enigmatyczna. Obecnie badane są dwa etapy regulacji tworzenia połączeń szczelinowych: szybkość obrotu koneksyn (badana głównie w wątrobie) oraz modyfikacje postranslacyjne koneksyn przed wbudowaniem ich w błonę. Ogólnie rzecz biorąc, białka mające kluczowe znaczenie w procesach regulacyjnych mają zazwyczaj krótkie okresy półtrwania. Wczesne badania Gurda i Evansa [69*], w których zastosowali oni technikę podwójnego znakowania izotopem, wykazały wolny obrót frakcji odpornej na sarkozynę, tj. frakcji błon komórek wątroby zawierającej połączenia szczelinowe. Jednakże, co sugerują Fallon i Goodenough [69*], wysoka zawartość kolagenu w tej frakcji mogła ją zanieczyścić. Yancey [69*] wykorzystując pulsową iniekcję znakowanej metioniny wykazał szczyt wbudowywania białek o masie 10 000 D do izolowanych z wątroby połączeń szczelinowych po 3 godzinach. W ten sposób określono czas półtrwania białek połączeń szczelinowych w wątrobie szczura na około 19 godzin. Jednak z powodu powtórnego wykorzystania radioaktywnych aminokwasów, prawdziwy czas półtrwania został zawyżony dwukrotnie. Porównując obrót białek połączeń szczelinowych wątroby do innych białek obecnych w błonie jej komórek o czasie półtrwania 3,6 dnia, Yancey [69*] stwierdził, że jest on 4,5-krotnie szybszy. Krótki czas półtrwania białek połączeń szczelinowych powoduje, że przerwa w ich syntezie daje natychmiastowy efekt w postaci zniknięcia połączeń, co obok rozłączenia przez zamknięcie kanałów, może być drugim mechanizmem regulującym komunikację międzykomórkową. W doświadczeniach *in vivo* z zastosowaniem dwuwęgla znakowanego C^{14} Fallon i Goodenough [69*] pokazali jak do tej pory najkrótszy czas półtrwania połączeń szczelinowych w wątrobie szczura – 5 godzin. Kilka badań *in vitro* dotyczących syntezy koneksyn wykazało ich czas półtrwania rzędu 1–4 godzin [3]. Czas półtrwania koneksyny 43 w kardiomiocytach wynosił 1–2 godzin [38].

Z jednej strony, wydaje się prawdopodobne, że komunikacja międzykomórkowa przez połączenia szczelinowe jest kontrolowana na poziomie syntezy i degradacji białek, a nie przez odwracalne zmiany konformacyjne cząsteczek na poziomie pojedynczych koneksonów. Z drugiej zaś strony, szybki obrót białek połączeń szczelinowych zależy od obróbki podczas przemieszczania tych białek do błony komórkowej. W kulturach kardiomiocytów pozyskiwanych od szczura Puranam [52] studiował biosyntezę i translokację koneksyny 43 używając jako inhibitora tych procesów jonoforu monezyny. Znalazł 40 i 41 kD izoformy koneksyny 43 zmagazynowane w pęcherzykach aparatu Golgiego i jednocześnie wykrył spadek liczby płytek połączeń szczelinowych w błonie. Te rezultaty sugerują, że koneksyna 43 na swojej drodze do błony jest wstępnie fosforylowana w siateczce śródplazmatycznej lub w przedziale *cis* aparatu Golgiego z formy 40 do 41 kD. Formy ufosforylowane do 42 i 44 kD pojawiają się, dystalnie od zablokowanych cząsteczek, w przedziale *trans* aparatu Golgiego. Spray [69*] udowodnił, że składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, na przykład, proteoglikany i glikozaminoglikany, także, na wielu poziomach, mają wpływ na ekspresję białek połączeń szczelinowych. Innymi cząsteczkami regulującymi dynamikę połączeń szczelinowych są, według Cole'a i Garfielda [69*], hormony, zgodnie z badaniami Kesslera [69*] pochodne cAMP, a także kinazy [17,59].

Kumulujące się dowody, z badań nad różnymi liniami komórkowymi, sugerują że koneksyny mogą tworzyć pule białkowe przed wbudowaniem w błonę komórkową [22]. To wyjaśnia, dlaczego inhibitory transkrypcji i translacji, w niektórych przypadkach, nie mają istotnego wpływu na tworzenie funkcjonalnej komunikacji przez połączenia szczelinowe. Procesy kontrolujące poziom koneksyn 43, 32 i 26 zostały, jednak, pokazane w regenerującej wątrobie [33]. Mechanizmy potranskrypcyjne, wśród których stabilność mRNA może być czynnikiem krytycznym, są uważane za dynamiczne regulatory w tym systemie [33].

W komórkach B trzustki, In't Veld [69*] opisał wzrost ilości koneksonów w odpowiedzi na dibutyryl-cAMP i na inhibitor fosfodwuesterazy. Jednak, autor ten stwierdził, czy wzrost liczby połączeń szczelinowych ma odbicie w wyższym poziomie komunikacji międzykomórkowej. W ludzkich komórkach nowotworowych kory nadnerczy badanych przez Murray'a i Taylora [69*] oraz w szczurzych komórkach parenchymalnych wątroby badanych przez De Mazière'a i Scheuermanna [69*], obszary połączeń szczelinowych zwiększają się w wyniku podania dibutyryl-cAMP. W serii eksperymentów, Flagg-Newton, Flagg-Newton i Loewenstein oraz Azarnia [69*] badali wpływ cAMP na komunikację międzykomórkową i morfologię połączeń szczelinowych w liniach nowotworowych komórek mysich. Studia te sugerują znaczenie modulacji połączeń szczelinowych przez zależną od cAMP fosforylację. Saez [69*] bezpośrednio zademonstrował efekt cAMP na fosforylację 27 kD białka połączeń szczelinowych w komórkach wątroby, która podnosi przewodność połączeń. W kardiomiocytach szczura *in vitro* [49] i w kulturach komórek

epitelialnych soczewek szczura i wołu [26], koneksyna 43 i 46 były fosforylowane w czasie hodowli. Zasugerowano, że fosforylacja wspomaga łączenie się komórek i jest kontrolowana przez wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia [11]. Stwierdzono, że aktywacja kinazy C powodowała fosforylację koneksyny 32 w hepatocytach. W innych doświadczeniach, Oh [48] badał linię zmutowanych klonów komórkowych wyprowadzonych z komórek epitelialnych wątroby szczura, niezdolnych do międzykomórkowej komunikacji (GJIC⁻). Zaproponował on, że nieobecność hiperfosforylowanych form koneksyny 43 jest odpowiedzialna za niezdolność mutantów do komunikacji. Ponieważ rozmieszczenie koneksyny 43 nie różniło się w komórkach GJIC⁻ i GJIC⁺ nieobecność fosforylacji najwyraźniej nie upośledziła wbudowywania białek połączeń szczelinowych w błony. Niestety obecność i stan fosforylacji głównego białka połączeń szczelinowych wątroby, koneksyny 32 [35,36], w tej zmutowanej linii hepatocytów nie zostały zbadane. Z drugiej strony, poparcie znajduje hipoteza przeciwna, mówiąca o zablokowaniu komunikacji przez połączenia szczelinowe w wyniku fosforylacji koneksyn na resztach tyrozynowych. Badania nad komunikacyjnie kompetentnymi kardiomiocytami wykazały że miejsca zawierające tyrozinę i treoninę nie są fosforylowane w koneksynie 43 [38]. Evans [69*] opisał utratę zdolności rozpoznawania 60 kD białka błonowego (MP60) w centrum rozwijającej się mysiej soczewki przez przeciwciała monoklonalne. W świetle prac Voortera i Kistlera [69*], zgodnie z którymi kinaza A fosforyluje koneksyny tylko w korze, lecz nie w jądrze soczewki, odkrycie Evansa może sugerować cięcie białek połączeń szczelinowych w jądrze soczewki połączone z utratą miejsc fosforylacji, i rozpoznawanych przez przeciwciała. Nieobecność miejsc fosforylacji zapewniłaby stałe połączenie metaboliczne w centrum soczewki, które jest konieczne do przezwyciężenia braków w zaopatrzeniu w substancje odżywcze.

Kolejna grupa cząsteczek biorących udział w regulacji funkcji połączeń szczelinowych to czynniki wzrostu. Na przykład, według Laua [69*], epidermalny czynnik wzrostu (EGF) może powodować destrukcję połączeń szczelinowych w wyniku fosforylacji koneksyn na resztach serynowych.

4.2. Dynamika połączeń szczelinowych podczas rozwoju

Od najwcześniejszych stadiów rozwojowych, połączenia szczelinowe biorą udział w przekazywaniu sygnałów morfogenetycznych. Jednym z najlepiej znanych przykładów na znaczenie przekazu sygnałów przez połączenia szczelinowe jest rozwój stułbi, *Hydra sp.* (jamochłony), badany przez Greena [69*]. Ustalona tarcza gębowa uwalnia rozchodzący się wzdłuż ciała poprzez połączenia szczelinowe inhibitor zapobiegający tworzeniu dodatkowych części tarcz gębowych. Zablokowanie komunikacji poprzez połączenia szczelinowe w wyniku transplantacji tkanki części z okolicy tarczy gębowej dawcy, nastrzykanej przeciwciałami przeciwko białkom połączeń szczelinowych, do organizmu biorcy, powodowało, co zademonstrował

Fraser [69*], ograniczenie zdolności istniejącej tarczy gębowej do inhibicji tworzenia dodatkowych tarcz gębowych. Podobny wpływ połączeń szczelinowych na kształtowanie ciała obserwowano we wczesnych zarodkach płazów [69*], zarodkach kurzych [14] oraz zarodkach pijawek [70]. Zeng [69*] śledził efekt przeciwciał skierowanych przeciwko 26 kD białku, występującemu w połączeniach szczelinowych wątroby szczura, na tworzenie połączeń szczelinowych w zarodku *Xenopus* i stwierdził ich małe rozmiary w porównaniu z kontrolą. Osłabienie grupowania koneksonów przez anty-koneksyny było również postulowane przez Meyera [69*], który badał przekazywanie znacznika fluorescencyjnego i morfologię połączeń szczelinowych w rozproszonych i powtórnie zagregowanych komórkach hepatomy Novikoffa po poddaniu ich działaniu fragmentu *Fab* przeciwciał skierowanych przeciwko zewnątrzkomórkowym domenom koneksyn. Autor nie stwierdził na replikach wielu połączeń szczelinowych, co sugeruje, że domeny zewnątrzkomórkowe mają szczególnie udział w tworzeniu tych połączeń.

Nową kartę w badaniach nad połączeniami szczelinowymi otworzyło odkrycie, że w regulacji i tworzeniu komunikacji poprzez te połączenia istotną rolę pełnią cząsteczki adhezyjne. Kanno [69*] doniósł, że przeciwciała monoklonalne rozpoznające uwomorulinę (kadherynę E) zakłócały zależną od wapnia adhezję i wstrzymywały przekazywanie barwnika fluoryzującego, żółcieni lucyferowej, pomiędzy komórkami teratokarcinomy. Kolejnego dowodu na udział kadheryn w funkcjonowaniu połączeń szczelinowych dostarczył Mege [69*], który transfekował cDNA molekuł adhezyjnych (L-CAM) do komórek sarkomy mysiej, nie produkujących L-CAM i nie wykazujących komunikacji przez połączenia szczelinowe. Po transfekcji pojawiły się funkcjonujące połączenia szczelinowe. Podobnie, Musil [69*] pokazał, że po transfekcji L-CAM cDNA linie komórkowe S180 i L929 odzyskiwały komunikację przez połączenia. Należy zaznaczyć, że przed transfekcją komórki te nie produkowały molekuł adhezyjnych i wykazywały ekspresję nie w pełni fosforylowanej koneksyny 43. Jongen [69*] odkrył w komórkach nabłonkowych myszy korelację pomiędzy zależną od wapnia komunikacją przez połączenia szczelinowe i ekspresją kadheryny E, co sugeruje, że jest ona zaangażowana w regulację tworzenia i funkcji koneksyny 43. W komórkach hepatomy Novikoffa, które również zawierają koneksynę 43, Meyer [69*] opisał inną kadherynę, kadherynę N (A-CAM), biorącą udział w regulacji połączeń szczelinowych. Komórki traktowane fragmentem *Fab* przeciwciał przeciwko A-CAM nie były zdolne do tworzenia połączeń szczelinowych. Z kolei, anty-koneksyna hamowała przyleganie komórek. Powyższe obserwacje pokazują bliskie związki pomiędzy cząsteczkami adhezyjnymi a tworzeniem połączeń szczelinowych podczas rozwoju.

Wydaje się bardzo prawdopodobnym, że kontakty poprzez cząsteczki adhezyjne są warunkiem i muszą poprzedzać tworzenie połączeń szczelinowych. Większość prac wskazuje, że kompetentnymi cząsteczkami adhezyjnymi są zależne od wapnia kadheryny, lecz, jak pokazał Keane [69*], N-CAM, członek niezależnej od wapnia

nadrodziny immunoglobulin, również bierze udział w regulacji funkcji połączeń szczelinowych. Co więcej, Churchill [10] odkrył istnienie międzykomórkowych prądów przenoszonych przez połączenia szczelinowe w hodowanych *in vitro* hemocytach karalucha przy nieobecności Ca^{2+} .

4.3. Połączenia szczelinowe w onkogenezie

Zakłócenia w komunikacji poprzez połączenia szczelinowe wydają się być jednym z etapów transformacji nowotworowej. Hipotezę taką postawił już w roku 1967 Loewenstein [69*]. Równocześnie, zaobserwowano, że namnażanie się komórek neoplastycznych jest hamowane przez utrzymywanie połączeń szczelinowych między tymi komórkami [9,72]. Inwazyjność jest jedną z cech komórek neoplastycznych. Chen i Öbrink [69*] wykazali, że własności inwazyjne zostają nabyte przez komórki po utracie połączeń adhezyjnych tworzonych przez kadherynę E. Kadheryna E jest istotna dla zapoczątkowania komunikacji przez połączenia szczelinowe podczas rozwoju. Istnieje zatem bezpośredni związek pomiędzy inwazyjnością komórek a utratą komunikacji przez połączenia szczelinowe.

Istnieje szereg dowodów na to, że aktywacja kinazy C przez produkowane przez guzy estry forbolu koreluje ze zmianami w stanie fosforylacji koneksyn i ze zmniejszeniem komunikacji przez połączenia szczelinowe. Jednakże, jak zauważył Chanson [69*], estry forbolu zmniejszają przepuszczalność połączeń tylko w ustalonych liniach komórkowych, a nie, na przykład, pomiędzy komórkami wydzielniczymi egzokrynowej części trzustki szczura. Fosforylowanie koneksyny 43 na resztach tyrozynowych związane jest z zahamowaniem komunikacji międzykomórkowej przez połączenia szczelinowe [11]. Zgodnie z tym, Goldberg i Lau [69*] pokazali, że transformacja fibroblastów onkogenem $pp60^{v-src}$ prowadzi do obfitej fosforylacji reszt tyrozynowych, podczas gdy w komórkach nietransformowanych, utrzymujących komunikację z innymi, analogicznej fosforylacji nie zaobserwowano. Jednakże poziom mRNA dla koneksyny 43 i samej koneksyny w komórkach transformowanych wzrósł a nie, jak można się było spodziewać, zmalał. W linii komórek wyprawdzonych z nabłonka wątroby szczura, immunoreaktywność przeciw koneksynie 43 zniknęła po potraktowaniu ich estrami forbolu, co sugeruje wycofywanie koneksonów z błony [2]. W przeciwieństwie, Hülser i Brummer [69*] pokazali stopniowy spadek w rozprzestrzenianiu się barwnika fluoryzującego, żółcieni lucyferowej, w kulturach sferoidów komórek guza BICR/M1R-K przy jednoczesnej obecności płytek połączeń szczelinowych, co obserwowano na replikach. Naus [69*] doniósł o spadku poziomu mRNA dla koneksyny 43 w komórkach glejaka C6 w porównaniu do astrocytów. Traktowanie astrocytów estrami forbolu blokowało komunikację przez połączenia szczelinowe i rozprzestrzenianie się fali Ca^{2+} [17], która jest wskaźnikiem ruchu jonów wapnia i innych przekaźników takich jak trójfosforan inozytolu. Jeśli komórki glejaka C6 były transfekowane cDNA dla ko-

neksyny 43, to poziom ich proliferacji gwałtownie spadał, tworzyły się połączenia szczelinowe, a przechodzenie barwnika z komórki do komórki wzrastało [9]. Ponadto Zhu [69*] wykazał, że poziom proliferacji komórek C6 spadał, jeżeli były hodowane one w medium po komórkach transfekowanych cDNA dla koneksyny 43. Sugeruje to uwalnianie substancji kontrolujących wzrost przez komórki zdolne do komunikacji. Tak więc, połączenia szczelinowe mogą wpływać na syntezę i/lub uwalnianie inhibitorów wzrostu.

Studia nad ekspresją koneksyn w wątrobie szczura podczas onkogenezy pokazują złożoność relacji pomiędzy ekspresją koneksyn a rozwojem komórek neoplastycznych [47]. Komórki wątroby, transformowane dietylonitrozoaminą wykazywały brak koneksyny 32 i 26. Jednakże, analiza poziomu mRNA nie wykazała spadku ekspresji transkryptu dla tych koneksyn, co sugeruje, że niektóre guzy zmniejszają immunoreaktywność koneksyn niezależnie od ekspresji mRNA.

4.4. Rola połączeń szczelinowych w chorobach dziedzicznych

Szerokie rozpowszechnienie koneksyn, jak i skomplikowane procesy modulatoryjne, którym podlegają te białka, zarówno na poziomie transkrypcji jak i gotowego produktu, wskazują na ich fundamentalne znaczenie dla funkcjonowania komórki. Nieprawidłowości w ekspresji koneksyn mogą wywoływać nowotwory, niedokrwienie czy przerost mięśnia sercowego. Ostatnio, dzięki studiom nad dwiema chorobami dziedzicznymi: chorobą Charcota, Marie i Tootha (CMT) oraz zespołem heterotaksji trzewnoprzedstonkowej (VAH) pojawiły się dane pozwalające spojrzeć z innej strony na funkcje połączeń szczelinowych.

CMT jest chorobą nerwów obwodowych upośledzającą funkcje nerwów zarówno czuciowych, jak i ruchowych. Najbardziej powszechne nieprawidłowości dotyczą białka osłonki mielinowej obwodowego układu nerwowego – PMP 22. Inna forma choroby (CMTX) jest związana z chromosomem X, na którym występują mutacje w regionie kodującym koneksynę 32 [1]. Analiza tych mutacji w oocytach *Xenopus* jasno wskazuje, że mają one bezpośredni wpływ na aktywność kanałów połączeń szczelinowych [8]. Koneksyna 32 jest szeroko rozpowszechniona w wielu tkankach, uwzględniając wątrobę, z których większość wydaje się nie być dotknięta przez CMTX. Można zaproponować kilka wyjaśnień faktu, że zmutowana koneksyna 32 nie zmienia funkcji innych komórek poza komórkami Schwanna. Najprostsze opiera się na założeniu, że komunikacja zachodzi nie tylko przez połączenia szczelinowe tworzone przez koneksynę 32, ale także przez inne koneksyny. Zatem istnieje możliwość, że w komórkach Schwanna pacjentów z CMTX występują koneksyny, które tworzą z koneksyną 32 kanały niefunkcjonalne lub nie mogą zastąpić funkcji koneksyny 32.

Niektóre mutacje CMTX prowadzą do utraty funkcji koneksyny 32 [8]. Stąd, w zależności od rodzaju koneksyny ulegającej ekspresji, ścieżki komunikacyjne

mogą być ograniczone lub zupełnie nie zmienione w tkankach pacjentów z CMTX, które obok koneksyny 32 produkują wiele innych koneksyn. Inne wyjaśnienie bierze pod uwagę możliwość indukcji ekspresji koneksyn, które normalnie nie ulegają ekspresji w tych tkankach i nie oligomeryzują ze zmutowaną koneksyną 32. Dla przykładu, pokazano, że w wątrobie gryzoni gen dla koneksyny 43 jest równie aktywny transkrypcyjnie jak gen dla koneksyny 26 [33], jednakże, na poziomie stabilnego transkryptu lub białka koneksyny tej jest bardzo mało. Być może, zakłócenie funkcji koneksyny 32 wywołuje stabilizację koneksyny 43. To wymagałoby kilku mechanizmów wspierających regulację biosyntezy koneksyn.

Intrygujące są rozważania na temat mechanizmów pozwalających ustalić asymetrię wielu narządów zwierząt kręgowych. Geny biorące udział w sygnalizacji międzykomórkowej partycypują także w regulacji rozwoju asymetrii [73]. Na przykład w rozwoju serca mutacja w genie dla koneksyny 43 związana jest z wadą wisceralnoprzedionkowej heterotaksji serca, VAH [6]. Choroba ta może przyjmować wiele form, od łagodnych do śmiertelnych, a jest spowodowana niewydolnością serca. Powstaje przez fundamentalne zaburzenia w kształtowaniu symetrii serca. Używając reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do zbadania końca C genu dla koneksyny 43, ustalono, że u pacjentów z VAH obecne są mutacje punktowe w miejscach kodujących serynę lub treoninę. Wiadomo, że koneksyna 43 jest fosforylowana w wielu miejscach, a ta modyfikacja może wpływać na składanie i bramkowanie połączeń szczelinowych [35]. Analizy komórek transfekowanych jednym ze zmutowanych genów dla koneksyny 43 wykazały, że kinazy nieprawidłowo regulowały funkcje koneksyn. Dotychczas nie ustalono, czy defekty w pozostałych regionach koneksyny 43 są odpowiedzialne za inne typy defektów serca.

Dowody wskazujące na znaczenie koneksyny 43 w rozwoju i fizjologii serca myszy uzyskano stosując celowe niszczenie genu dla koneksyny 43 [55]. Homozygoty noszące niefunkcjonalny gen dla koneksyny 43 rozwijały się przez pewien czas prawidłowo, lecz umierały wkrótce po urodzeniu. Histologiczna analiza serc tych myszy uwidaczniała nabrzmienie i blokadę szlaku wyprowadzającego krew z prawej komory serca, co prawdopodobnie powodowało śmierć zwierzęcia poprzez zahamowanie wymiany gazów. Zaburzenia obserwowane u myszy poddanych eksperymentowi mogą nie być identyczne z tymi, które występują w organizmach posiadających tylko mutację w genie dla koneksyny 43. Na przykład, mogą istnieć mutacje, które pozwalają na funkcjonowanie koneksyn na pewnym zmniejszonym poziomie lub ze zmienionymi właściwościami dotyczącymi bramkowania czy przepuszczalności kanału. Mutacje mogą spowodować również, że jedna z koneksyn nabierze właściwości inhibicyjnych w stosunku do innych koneksyn lub białek regulacyjnych.

4.5. Rola połączeń szczelinowych w okresie ciąży i porodu

Jak już powiedzieliśmy poprzednio, połączenia szczelinowe wiążą ze sobą metabolicznie i elektrycznie wszystkie komórki przez całe ich życie z wyjątkiem mięśni szkieletowych, kości i komórek krwi. Istnieją jednak narządy, których komórki są jedynie okresowo połączone metabolicznie i elektrycznie przez połączenia szczelinowe. Do takich narządów należy macica, a przede wszystkim jej mięśniówka. W okresie tzw. ciszy biologicznej mięśniówki macicy, którą można ograniczyć do okresów międzyciążowych, komórki mięśni gładkich mięśniówki nie są ze sobą metabolicznie i elektrycznie połączone. Jeżeli nawet występują połączenia szczelinowe w okresie ciszy biologicznej macicy w jej mięśniówce, to są one bardzo nieliczne, a co za tym idzie niewykrywalne dostępnymi nam metodami.

Połączenia szczelinowe pojawiają się w mięśniówce macicy dopiero na kilka lub kilkanaście godzin przed porodem. Proces ten objawia się, dobrze znanym klinicytom – położnikom zjawiskiem występowania synchronicznych skurczów macicy, które w efekcie prowadzą do spontanicznego porodu.

Nagromadziło się sporo dowodów, że połączenia w dużym stopniu regulują motoryczne czynności macicy w końcowej fazie ciąży. Doświadczalna owariektomia, podanie dużej dawki prostataglandyn czy też estrogenów wywoływały pojawienie się połączeń szczelinowych w mięśniówce macicy i przedwczesny poród [12]. Podawanie pod koniec ciąży owariektomizowanym szczurom progesteronu lub jego pochodnych hamowało formowanie się połączeń szczelinowych i przedłużało poród. Obserwacje prowadzone na wielu gatunkach wskazywały jednoznacznie, że tuż przed porodem wzrastała istotnie ilość połączeń szczelinowych. Obecność połączeń nie była jednak warunkiem bezwzględny do zakończenia ciąży. I tak, odnerwienie miednicy ciężarnych szczurów zapobiegało porodowi, ale nie blokowało formowania połączeń szczelinowych. Podawanie zaś dużych dawek estrogenów w okresie ciąży stymulowało przedwczesne formowanie się połączeń szczelinowych bez nastąpienia równocześnie przedwczesnego porodu [12].

Obserwacje prowadzone głównie na zwierzętach laboratoryjnych, szczurach, królikach, powiązały formowanie się połączeń szczelinowych w mięśniówce macicy z poziomem dwóch głównych hormonów: progesteronu i estradiolu. Wysokie stężenie progesteronu w krwi matczynej było związane z tzw. blokiem ciążowym, a równocześnie z jego inhibującym wpływem na formowanie się połączeń szczelinowych. Wzrost poziomu estradiolu, pod koniec ciąży w wyniku metabolizowania progesteronu do estradiolu, zniósł inhibujący efekt tego pierwszego oraz inicjował formowanie się połączeń szczelinowych i terminację ciąży.

W przypadku ciąży ludzkiej udział zarówno estrogenów, jak i progesteronu w jej utrzymaniu i terminacji pozostaje bezsporny, aczkolwiek niejednoznaczny. Zarówno bowiem poziom progesteronu w krwi matczynej może się wahać w znacznym stopniu i nie pozostawać w efektywnej korelacji z rozwiązaniem, ani też z inicjacją

formowania się połączeń szczelinowych. Estradiol w organizmie kobiety ciężarnej nie powstaje, jak to ma miejsce u szczurów z progesteronu pod wpływem 17 α hydroksylazy, lecz jest pochodzenia łożyskowego i zarodkowego, gdzie jest syntetyzowany z siarczanu dehydroisoandrosteronu [61], a tym samym nie następuje obniżenie stężenia progesteronu pod koniec ciąży.

Wspólne badania prowadzone w Krakowie, Uppsali i Londynie nad 62 przypadkami ciąży nie wykazały istotnej różnicy w ilości połączeń szczelinowych w mięśniówce kobiet rodzących normalnie, odpornych na oksytocynę i kobiet nie wykazujących żadnych skurczów macicy w terminie porodu. Nie zaleziono również istotnej zależności pomiędzy tymi trzema grupami pacjentek a poziomem progesteronu w ich krwi. Nie oznacza to jednak, że połączenia szczelinowe nie odgrywają żadnej roli w procesie porodu. Analizę połączeń szczelinowych prowadzono przy pomocy mikroskopu elektronowego [29] oraz metody immunocytochemicznej [28,29]. Obie te metody pozwalają jedynie na stwierdzenie, albo obecności połączeń szczelinowych w postaci uformowanej (mikroskopia elektronowa) (fot. 1 i fot. 4), albo obecności białek, koneksyny 43 (immunohistochemia) (fot. 3). Żadna z tych metod nie informuje natomiast o czynnościowym stanie kanałów - koneksonów. Nie możemy bowiem dostępnymi technikami zmierzyć *in vivo*, czy kanał jest otwarty czy nie. Uzyskane *in vitro* wyniki nie są jednoznaczne [58]. Zabiegi techniczne poprzedzające fizjologiczną analizę wycinków macic mogą bowiem wpływać deformacyjnie na stan czynnościowy koneksonów. Można było jedynie stwierdzić, że poziom białek połączeń szczelinowych, koneksyny 43, macic kobiet rodzących normalnie, pozostaje w korelacji dodatniej ze stosunkiem estradiolu do progesteronu (E/P). Badania *in vitro* wycinków mięśniówki macicy pozyskanych przy pomocy cesarskiego cięcia, wykazały istotną zależność skurczów od ilości koneksyny 43, która była zależna od wysokiego stężenia estradiolu, progesteronu i oksytocyny w płynie doświadczalnym i utrzymywała poziom tych białek przez 5 godzin [30,31,32].

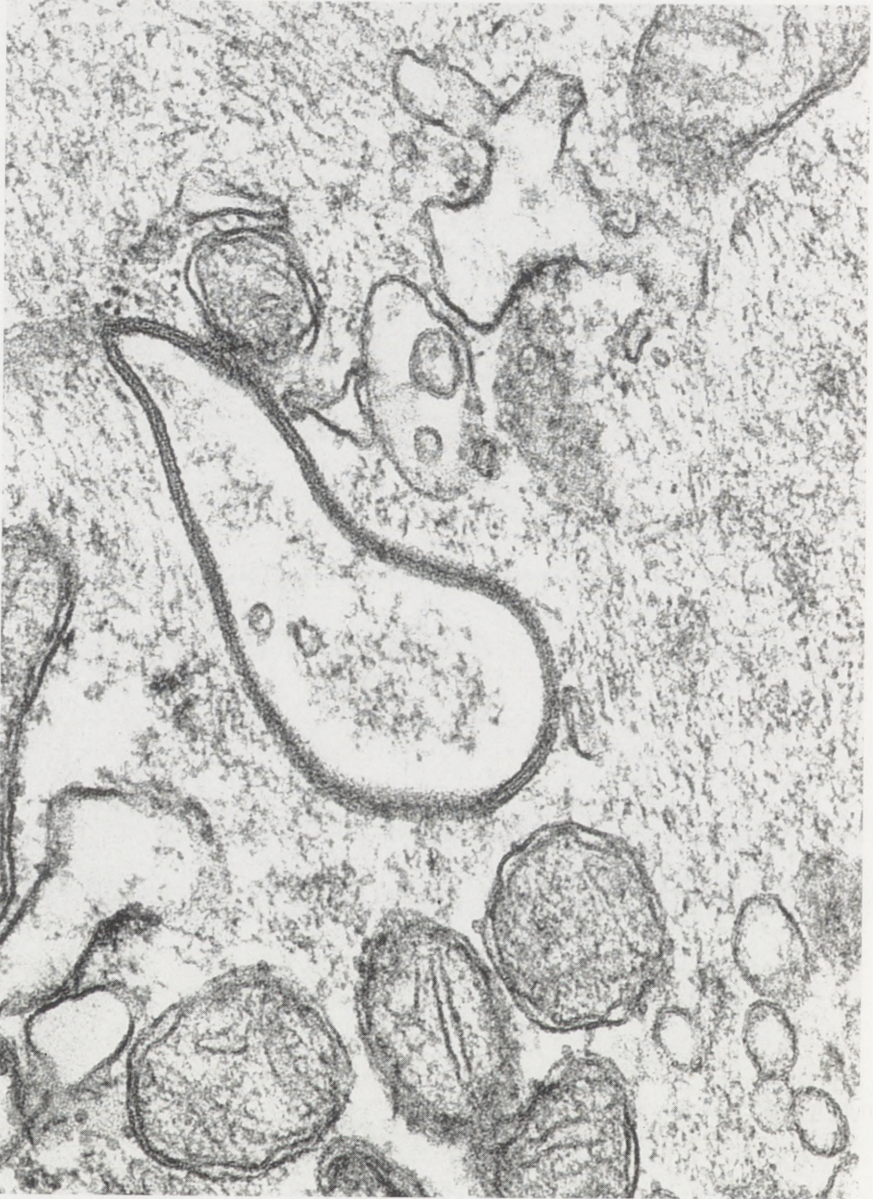
4.5. Degradacja połączeń szczelinowych

Podczas rozwoju, różne mechanizmy mogą regulować komunikację poprzez połączenia szczelinowe. Jak już wspomniano, procedury rozłączające mogą, między innymi, obejmować fosforylację koneksyn, zależne od wapnia wiązanie kalmoduliny, czy zmiany w zagęszczeniu koneksonów w płaszczyźnie błony komórkowej. Kolejnym ważnym mechanizmem wydaje się być degradacja połączeń szczelinowych, która zachodzi poprzez rozpraszanie się płytek połączeń szczelinowych (na przykład podczas metamorfozy motyla z rodziny zawisakowatych, *Manduca sexta* [69*]), lub częściej poprzez pojawianie się tzw. anularnych połączeń szczelinowych. Opisywane one były w komórkach jajowych przez Koike [69*], mięśniu sercowym przez Spraya [69*], neuroepitelium zarodka szczura przez Schustera [69*], śluzówce



Fot. 4. Przekrój przez trzy wypustki komórek mięśni gładkich mięśniówki macicy ludzkiej. Wycinek pobrano w czasie dokonywania cesarskiego cięcia. Połączenia szczelinowe zaznaczono strzałkami (powiększenie około 80 000)

torby policzkowej chomika przez White'a [69*], siatkówce ryb przez Vaughana i Lasatera [69*] czy wreszcie w mięśniówce macicy kobiet tuż po przebytych porodzie przez Kilarskiego (nie publ.) (fot. 5). Główną siłą w kształtowaniu anularnych połączeń szczelinowych wydaje się być endocytoza zależna od aktyny opisana przez Larsena [69*], która kończy się degradacją cząsteczek w lizosomach. Z drugiej strony, rozległe obszary związków filamentów aktynowych z połączeniami szcze-



Fot. 5. Przekrój podłużny przez postać anularną połączenia szczelinowego, które znajduje się w stadium degradacji w komórce mięśnia gładkiego macicy ludzkiej. Wycinek pobrano w czasie dokonywania cesarskiego cięcia (pow. około 200 000)

linowymi nie mogą brać udziału w ich usuwaniu, lecz raczej w stabilizowaniu struktury błony, jak to zostało pokazane przez Lo [40] w soczewkach ssaków naczelnych.

Mamy niewiele informacji o związkach pomiędzy morfologicznymi i enzymologicznymi aspektami degradacji z jednej strony a molekularnymi z drugiej. W każdym razie, wiele badań wskazuje na to, że fosforylacja aminokwasów ma miejsce podczas degradacji połączeń szczelinowych i istnieją dowody, że większość białek jest degradowana w stanie największej fosforylacji [11]. W dodatku, fosforylacja ma różny wpływ na proteolizę koneksyny 32 *in vitro* w zależności od rodzaju kinazy (kinaza A lub kinaza C) [16]. Okazuje się, że rola fosforylacji nie ogranicza się tylko do bramkowania kanałów połączeń szczelinowych [16], lecz wpływa także na ich degradację. Jednakże, mechanizmy fosforylacji biorące udział w blokowaniu komunikacji pomiędzy komórkami poprzez degradację połączeń szczelinowych, wciąż wymagają intensywnych badań.

Miejmy nadzieję, że dynamicznie rozwijające się techniki i metody badawcze pozwolą na ostateczne wyjaśnienie mechanizmów powstawania, trwania i degradacji, wciąż jeszcze enigmatycznych połączeń szczelinowych.

LITERATURA

- [1] BERGOFFEN J, SCHERER SS, WANG S, SCOTT MO, BONE LJ, PAUL DL, CHEN K, LENSCH MW, CHANCE PF, FISHBECK KH. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993; **262**: 2039–2042.
- [2] BERTHOUD VM, LEDBETTER MLS, HERTZBERG EL, SAEZ JC. Connexin 43 in MDCK cells: Regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca^{2+} . *Eur J Cell Biol* 1992; **57**: 40–50.
- [3] BEYER EC. Gap junctions. *Int Rev Cytol* 1993; **137**: 1–37.
- [4] BOHRMANN J. Antisera against a channel-forming 16 kDa protein inhibit dye-coupling and bind to cell membranes in Drosophila ovarian follicles. *J Cell Sci* 1993; **105**: 513–518.
- [5] BRISETTE JL, KUMAR NM, GILULA NB, HALL JE, DOTTO GP. Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6453–6457.
- [6] BRITZ-CUNNINGHAM SH, SHAH MM, ZUPPAN CW, FLETCHER WH. Mutations of the connexin 43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1323–1329.
- [7] BRUZZONE R, HAEFLIGER JA, GIMLICH LR, PAUL DL. Connexin 40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell* 1993; **4**: 7–20.
- [8] BRUZZONE R, WHITE TW, SCHERER SS, FISHBECK KH, PAUL DL. Null mutations of connexin 32 in patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 1994; **13**: 1253–1260.
- [9] CHARLES AC, NAUS CCG, ZHU D, KIDDER GM, DIRKSEN ER, SANDERSON J. Intercellular calcium signalling via gap junctions in glioma cells. *J Cell Biol* 1992; **118**: 195–201.

- [10] CHURCHILL D, COODIN S, SHIVERS RR, CAVENEY S. Rapid de novo formation of gap junctions between insect hemocytes in vitro: A freeze-fracture, dye-transfer and patch-clamp study. *J Cell Sci* 1993; **104**: 763–772.
- [11] CROW DS, BEYER EC, PAUL DL, KOBE SS, LAU AF. Phosphorylation of connexin 43 gap junction protein in uninfected and RSV-transformed mammalian fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 1754–1763.
- [12] DANIEL EE. Gap Junctions in smooth muscle. [w]: Cell-toCell Communication. De Mello W [red.], Plenum Press, New York and London 1987.
- [13] DEVRIES SH, SCHWARTZ EA. Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *J Physiol London* 1992; **445**: 201–230.
- [14] DEALY CN, BEYER EC, KOSHER RA. Expression patterns of mRNAs for the gap junction proteins connexin 43 and connexin 42 suggest their involvement in chick limb morphogenesis and specification of the arterial vasculature. *Dev Dyn* 1994; **199**: 156–167.
- [15] DERMIETZEL R, SPRAY DC. Gap junctions in the brain: Where, what type, how many and why? *Trends Neurosci* 1993; **16**: 186–192.
- [16] ELVIRA M, DIET JA, WANG KKW, VILLALOBO A. Phosphorylation of connexin 32 by protein kinase C prevents its proteolysis by -calpain and m-calpain. *Biol Chem* 1993; **268**: 14294–14300.
- [17] ENKVIST MO, MCCARTHY KD. Activation of protein kinase C blocks astroglial gap junction communication and inhibits the spread of calcium waves. *J Neurochem* 1992; **59**: 519–526.
- [18] FALK MM, KUMAR NM, GILULA NB. Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J Cell Biol* 1994; **127**: 343–355.
- [19] FARQUHAR GM, PALADE GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; **17**: 375–412.
- [20] FINBOW ME, PITTS JD. Is the gap junction channel- the *connexon*- made of connexin or ductin? *J Cell Sci* 1993; **106**: 463–472.
- [21] HAEFLIGER JA, BRUZZONE R, JENKINS NA, GILBERT DJ, COPELAND NG, PAUL L. Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. *Biol Chem* 1992; **267**: 2057–2064.
- [22] HENDRIX EM, MAO SJ, EVERSON W, LARSEN WJ. Myometrial connexin trafficking and gap junction assembly at term and in preterm labor. *Mol Reprod Dev* 1992; **33**: 27–38.
- [23] HENNEMANN H, SCHWARZ HJ, WILLECKE K. Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: Molecular cloning of mouse connexin and 45 cDNAs. *Eur J Cell Biol* 1992; **57**: 51–58.
- [24] HENNEMANN H, DAHL E, WHITE JB, SCHWARZ HJ, LALLEY PA, CHANG S, NICHOLSON J, WILLECKE K. Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17225–17233.
- [25] HENNEMANN H, SUCHYNA T, LICHTENBERG-FRATE H, JUNGBLUTH S, DAHL E, SCHWARZ J, NICHOLSON BJ, WILLECKE K. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin 40 a second gap junction gene preferentially expressed in lung. *Cell Biol* 1992; **1117**: 1299–1310.
- [26] JIANG JX, PAUL DL, GOODENOUGH DA. Posttranslational phosphorylation of lens fiber connexin 46: a slow occurrence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; **34**: 3558–3565.
- [27] JOHN SA, REVEL JP. Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: Intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin 43. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **178**: 1312–1318.
- [28] KILARSKI WM, SEVERS NJ, GOURDIE RG, REZAPOUR M, BÄCKSTRÖM T, ROMANS GM ULMSTEN U. Gap Junction Density in Human Myometrium at Term Revealed

- by an Anti-Peptide Antibody and Laser Scanning Confocal Microscopy. *Folia Histochem Cytobiol* 1993; **31**: 4, 155–160
- [29] KILARSKI WM, REZAPOUR M, BÄCKSTRÖM T, ROOMANS GM, ULMSTEN U. Morphometric Analysis of Gap Junction Density in Human Myometrium at Term. *Acta Obstet Gynecol* 1994; **73**: 377–380
- [30] KILARSKI WM, WITCZUK B, PLUCIŃSKI T, KUPRYSZEWSKI G, ROOMANS GM, ULMSTEN U. Antisera against three connexin 43 fragments react with a 43-kD protein localised to gap junctions in myocardium and human myometrium. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; **32**: 4, 219–224
- [31] KILARSKI WM, XIN FU, BÄCKSTRÖM T, ROOMANS GM, ULMSTEN U. Decrease of gap junction protein in human myometrium at term in vitro. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; **33**: 3, 151–155
- [32] KILARSKI WM, XIN FU, BÄCKSTRÖM T, ROOMANS GM, ULMSTEN U. Progesterone, estradiol and oxytocin and their in vitro effect on maintaining the number of gap junction plaques in human myometrium at term. *Acta Physiologica Scandinavica* 1996; **157**: 461–469
- [33] KREN BT, KUMAR NM, WANG S, GILULA NB, STEER CJ. Differential regulation of multiple gap junction transcripts and proteins during rat liver regeneration. *Cell Biol* 1993; **123**: 707–718.
- [34] KUMAR NM, FRIEND DS, GILULA NB. Synthesis and assembly of human I gap junctions in BHK cells by DNA transfection with the human I cDNA. *J Cell Sci* 1995; **108**: 3725–3734.
- [35] KUMAR NM, GILULA NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996; **84**: 381–388.
- [36] KURAOKA A, IIDA H, HATAE T, SHIBATA Y, ITOH M, KURITA T. Localization of gap junction proteins, connexin-32 and connexin-26, in rat and guinea pig liver as revealed by quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 971–980.
- [37] KURZ-ISLER G, VOIGT T, WOLBURG H. Modulation of connexon densities in gap junctions of horizontal cell perikarya and axon terminals in fish retina: Effects of light/ dark cycles, interruption of the optic nerve and application of dopamine. *Cell Tissue Res* 1992; **268**: 267–275.
- [38] LAIRD DW, PURANAM KL, REVEL JP. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin 43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biothem J* 1991; **273**: 67–72.
- [39] LO WK, REESE TS. Multiple structural types of gap junctions in mouse lens. *J Cell Sci* 1993; **106**: 227–235.
- [40] LO WK, MILLS A, KUCK JFR. Actin filament bundles are associated with fiber gap junctions in the primate lens. *Exp Eye Res* 1994; **58**: 189–196.
- [41] MALEWICZ B, KUMAR VV, JOHNSON RG, BAUMANN W J. Lipids in gap junction assembly and function. *Lipids* 1990; **25**: 419–427.
- [42] MAZET JL, JANY T, GROS D, MAZET F. Voltage dependence of liver gap junction channels reconstituted into liposomes and incorporated into planar bilayers. *Eur Biochem* 1992; **210**: 249–256.
- [43] MEYER RA, MALEWICZ B, BAUMANN WJ, JOHNSON RG. Increased gap junction assembly between cultured cells upon cholesterol supplementation. *J Cell Sci* 1990; **96**: 231–238.
- [44] MINKOFF R, RUNDUS VR, PARKER SB, BEYER EC, HERTZBERG EL. Connexin expression in the developing avian cardiovascular system. *Circ Res* 1993; **73**: 71–78.
- [45] MUSIL LS, GOODENOUGH DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin 43, occurs after exit from the ER. *Cell Cambridge Mass* 1993; **74**: 1065–1078.
- [46] NEDERGAARD M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 1994; **263**: 1768–1771.

- [47] NEVEU MJ, HULLY JR, BABCOCK KL, HERTZBERG EL, NICHOLSON BJ, PAUL L, PITOT HC. Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver. *J Cell Sci* 1994; **107**: 83–95.
- [48] OH SY, DUPONT E, MADHUKAR BV, BRIAND JP, CHANG CC, BEYER E, TROSKO JE. Characterization of gap junctional communication-deficient mutants of a rat liver epithelial cell line. *Eur J Cell Biol* 1993; **60**: 250–255.
- [49] OYAMADA M, KIMURA H, OYAMADA Y, MIYAMOTO A, OHSHIKA H, MORI M. The expression, phosphorylation and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Exp Cell Res* 1994; **212**: 351–358.
- [50] PARPURA V, BASARSKY TA, LIU F, JEFTINIJA K, JEFTINIJA S, HAYDON PG. Glutamate mediated astrocyte neuron signalling. *Nature* 1994; **369**: 744–747.
- [51] PAUL DL. New functions for gap junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 665–672.
- [52] PURANAM KL, LAIRD DW, REVEL JP. Trapping an intermediate form of connexin 43 in the Golgi. *Exp Cell Res* 1993; **206**: 85–92.
- [53] RAHMAN S, CARLILE G, EVANS WH. Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies. *J Biol Chem* 1993; **268**: 1260–1265.
- [54] RASH JE, YASUMURA T. Improved structural detail in freeze-fracture replicas: High-angle shadowing of gap junctions cooled below -170°C and protected by liquid nitrogen-cooled shrouds. *Microsc Res Tech* 1992; **20**: 187–204.
- [55] REAUME AG, DE SOUSA PA, KULKARNI S, LANGILLE BL, ZHU D, DAVIES TC, JIJENJA SC, KIDDER GM, ROSSANT J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43. *Science* 1995; **267**: 1831–1834.
- [56] REED KE, WESTPHALE EM, LARSON DM, WANG HZ, VEENSTRA RD, BEYER C. Molecular cloning and functional expression of human connexin 37, an endothelial cell gap junction protein. *J Clin Invest* 1993; **91**: 997–1004.
- [57] RISEK B, KLIER FG, GILULA NB. Developmental regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions. *Develop Biol* 1994; **164**: 183–196.
- [58] ROOMANS GM, KILARSKI WM, CIRAY N, PRESSON BE, BÄCSTRÖM T, ULMSTEN U. Structural and Functional Studies of Gap Junctions in Human Myometrium. *Eur J Morphol* 1993, **31**: 1–2, 55–59.
- [59] ROSENBERG E, SPRAY DC, REID LM. Matrix regulation of gap junctions and of excitability in cells. [w]: Extracellular Matrix, Zern MA, Reid LM [red.], New York and Basel 1993; 449–462.
- [60] RUPDM, VEENSTRA RD, WANG HZ, BRINK PR, BEYER EC. Chick connexin 56, a novel lens gap junction protein. *J Biol Chem* 1993; **268**: 706–712.
- [61] SOLOMON S. The placenta as an endocrine organ: steroids. [w]: The Physiology of Reproduction, Knobil E, Neil J [red.], Raven Press, New York 1988; **51**
- [62] SPRAY DC. Physiological and pharmacological regulation of gap junction channels. [w]: Molecular Mechanisms of Epithelial Cell Junctions: From Development to Disease, Citi S [red.], LG Landes Company, Austin, Texas 1994; 195–215.
- [63] SPRAY DC, DERMIETZEL R. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap junction disease of the nervous system. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 256–262.
- [64] STAUFFER KA, KUMAR NM, GILULA NB, UNWIN N. Isolation and purification of gap junction channels. *J Cell Biol* 1991; **115**: 141–150.
- [65] WERNER R, LEVINE E, RABADAN-DIEHL C, DAHL G. Gating properties of connexin 32 cell-cell channels and their mutants expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc London* 1991; Ser B **243**: 5–11.
- [66] WHITE TW, BRUZZONE R, WOLFRAM S, PAUL DL, GOODENOUGH DA. Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second

- extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J Cell Biol* 1994; **125**: 879–892.
- [67] WHITE TW, PAUL DL, GOODENOUGH DA, BRUZZONE R. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 459–470.
- [68] WILLECKE K, JUNGBLUTH S, DAHL E, HENNEMANN H, HEYNKES R, GRZESCHIK H. Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. *Eur J Cell Biol* 1990; **53**: 275–280.
- [69] WOLBURG H, ROHLMANN A. Structure-Function Relationships in Gap Junctions. *Int Rev Cytol* 1995; **157**: 315–373.
- [70] WOLSZON LR, GAO WQ, PASSANI MB, MACAGNO ER. Growth cone "collapse" *in vivo*: Are inhibitory interactions mediated by gap junctions? *J Neurosci* 1994; **14**: 999–1010.
- [71] YAMAMOTO T, KARDAMI E, NAGY JI. Basic fibroblast growth factor in rat brain. Localization to glial gap junctions correlates with connexin 43 distribution. *Brain Res* 1991; **554**: 336–343.
- [72] YAMASAKI H, NAUS CCG. Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 1996; **6**: 1199–1213
- [73] YOST HJ. Vertebrate left-right development. *Cell* 1995; **82**: 689–692.

Redaktor prowadzący – Szczepan Biliński

Otrzymano: 12.03.1997 r.

Przyjęto: 22.04.1997 r.

*Adres autora: Instytut Zoologii UJ,
30-060 Kraków, ul R. Ingardena 6*

BIAŁKA SURFAKTANTU**THE PROTEINS OF THE SURFACTANT**

Krzysztof HELEWSKI, Grażyna KOWALCZYK-ZIOMEK, Janusz KONECKI,
Maria GŁOWACKA

I Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze

Streszczenie: W niniejszej pracy autorzy opisują budowę, funkcję i wydzielanie specyficznych białek surfaktantu płucnego. Wśród tych białek wyróżnia się białko A (SP-A), białko B (SP-B), białko C (SP-C) i białko D (SP-D). Dwa z nich, SP-A i SP-D są duże i hydrofilne, a pozostałe dwa SP-B i SP-C są małe i silnie hydrofobowe.

Słowa kluczowe: surfaktant płucny, białka surfaktantu, komórki pęcherzykowe typu II

Summary: The authors describe structure, function and secretion of specific proteins of the lung surfactant. From these proteins one distinguishes: surfactant protein A (SP-A), protein B (SP-B), protein C (SP-C), protein D (SP-D). SP-A and SP-D are big and hydrophilous and the remainder, namely SP-B and SP-C are small and hydrophobously strong.

Key words: lung surfactant, surfactant proteins, alveolar type II cells

WSTĘP

Charakterystyczną cechą komórek pęcherzykowych typu II jest występowanie w ich cytoplazmie ciałek blaszkowatych odpowiedzialnych za magazynowanie surfaktantu [45,68]. Surfaktant wyścielający nabłonek pęcherzyków płucnych ma właściwości detergentu obniżającego napięcie powierzchniowe występujące w pęcherzykach płucnych. Zapobiega to zapadaniu się pęcherzyków płucnych w czasie wydechu oraz gromadzeniu się płynu w ich świetle. Surfaktant wpływa także pośrednio na wilgotność powietrza oddechowego stabilizując zawartość wody w hi-

pofazie oraz bierze udział w systemie obronnym organizmu zwiększając między innymi fagocytozę drobnoustrojów przez makrofagi pęcherzykowe [29,50].

Głównym składnikiem chemicznym surfaktantu stanowiącym około 90% są lipidy. Ponadto surfaktant składa się w 7–10% z białek i w około 2% z węglowodanów [29]. Pod względem morfologicznym surfaktant składa się z dwóch warstw. Pierwszą z nich, przylegającą bezpośrednio do nabłonka oddechowego jest hipofaza, składająca się z hydrofilnej substancji bogatej w białka. Leżąca nad nią epifaza jest cieńsza i zawiera przede wszystkim fosfolipidy, wśród których przeważa dwupalmitynian fosfatydylocholiny.

Najlepiej poznanym składnikiem surfaktantu są fosfolipidy, natomiast stosunkowo niewiele wiadomo o białkach, wśród których wyróżnia się cztery białka specyficzne określane jako apoproteiny surfaktantu. W surfaktancie występują również niewielkie ilości białek surowicy, takich jak: albuminy, immunoglobulina G i fibrynogen [36,49,73].

Niniejsza praca ma na celu omówienie budowy, funkcji i wydzielania specyficznych białek surfaktantu. Do apoprotein surfaktantu należą białko A (SP-A), białko B (SP-B), białko C (SP-C) i białko D (SP-D). Dwa z nich SP-A i SP-D są duże i rozpuszczalne w wodzie, podczas gdy SP-B i SP-C są małe, silnie hydrofobowe i stanowią 1–2% masy surfaktantu, przy czym stosunek molarny SP-B /SP-C wynosi około 1: 2 [26].

BIĄŁKO A SURFAKTANTU

Do najwcześniej zidentyfikowanych białek surfaktantu należy sialoglikoproteina określana mianem białka A surfaktantu. Została ona opisana po raz pierwszy w roku 1972 przez R. Kinga i J. Clementsa [28]. SP-A stanowi prawie 50% całkowitej ilości białek surfaktantu i obejmuje grupę cząsteczek o różnej masie (26–38 kDa) oraz różnym ładunku elektrycznym (punkty izoelektryczne pH 4–5) [26,36]. Różnice te są spowodowane dużą ilością modyfikacji post-translacyjnych jego cząsteczek. Białko A składa się z łańcuchów polipeptydowych, zawierających na końcu N sekwencje podobne do kolagenu, a na końcu C reszty charakterystyczne dla lektyny typu C [4,22,47]. W pęcherzyku płucnym białko A surfaktantu występuje jako polimer złożony z sześciu potrójnych spiral łańcuchów polipeptydowych (18 łańcuchów) o masie cząsteczkowej około 700 kDa, co w mikroskopie elektronowym widziane jest w postaci charakterystycznej struktury "bukietu tulipanów" [4,20]. Poznanie składu i sekwencji aminokwasów tego białka stało się możliwe po wyizolowaniu genu odpowiedzialnego za jego syntezę. Białko A jest uważane za lektynę typu C lub zależną od jonów wapnia i podobnie jak kilka innych związków o podobnych właściwościach należy do grupy białek zwanych kolektykami [44]. Istnieją sprzeczne

informacje dotyczące komórkowego rozmieszczenia SP-A. Uważa się, że białko A występuje głównie w ciałkach blaszkowatych [1,72], choć istnieją doniesienia dotyczące izolowanych ciałek blaszkowatych płuc szczura [40] oraz ciałek blaszkowatych pochodzących z hodowli płodowych płuc ludzkich [17], w których ilość SP-A jest stosunkowo niewielka. Pogodzeniem tych dwóch sprzecznych koncepcji mogą być opublikowane przez Groniowskiego jeszcze w roku 1983 wyniki wskazujące na dwa kierunki rozmieszczenia SP-A w pneumocytach typu II. Jeden z nich prowadzi od aparatu Golgiego do wewnętrznej powierzchni błony otaczającej ciałka blaszkowate, a drugi pomijając ciałka blaszkowate prowadzi do błony plazmatycznej komórki pęcherzykowej typu II i tworzy na jej powierzchni pokład hydrofilny [19]. Co więcej doświadczenia przeprowadzone *in vivo* sugerują, że białko A surfaktantu jest wydzielane z komórek typu II inną drogą niż ciałka blaszkowate [18,23]. Wydaje się również, że wydzielanie SP-A z izolowanych komórek typu II ma określony poziom i nie podlega regulacji [18,46]. Z drugiej strony wiadomo jednak, że SP-A bierze udział w regulacji ilości pęcherzykowego surfaktantu w drodze sprzężenia zwrotnego i może powodować regulację wydzielania samego SP-A.

Białko A surfaktantu ma zdolność wiązania lipidów i węglowodanów oraz oddziaływania ze specyficznymi receptorami powierzchni komórek pęcherzykowych typu II [67]. Wiązanie SP-A z receptorami jest możliwe dzięki obecności reszt węglowodanowych, natomiast reakcja z lipidami zachodzi przez hydrofobową część cząsteczki [33]. SP-A mocno związane z fosfolipidami surfaktantu, w obecności SP-B, SP-C i jonów wapnia powoduje przekształcanie się ciałek blaszkowatych w tubularne struktury mielinowe [47]. Białko A surfaktantu przy współudziale SP-B i SP-C bierze także udział w tworzeniu cienkiej fosfolipidowej warstwy wyścielejającej powierzchnię pęcherzyków płucnych, powodującej zmniejszenie napięcia powierzchniowego [21,55]. Mimo iż SP-A jest organizatorem struktur tubularnych, to jego brak nie upośledza w sposób znaczący aktywności surfaktantu jako całości.

Białko A zwiększa wchłanianie fosfolipidów z przestrzeni pęcherzykowej i hamuje wydzielanie fosfatydylocholino surfaktantu przez izolowane komórki typu II [8,22,29,33,57]. Procesy te zachodzą poprzez połączenie się SP-A z wysoce specyficznymi receptorami zlokalizowanymi na szczytowej powierzchni komórek typu II [22,51] dzięki resztom końca C o sekwencji niepodobnej do kolagenu [35].

Istotną funkcją SP-A jest również udział w mechanizmach obronnych płuc. Wykazano, że SP-A wiąże się z makrofagami pęcherzykowymi [56,73] zwiększając ich zdolność do migracji i fagocytozy w odpowiedzi na endotoksyny [26,34,41,69]. Właściwości związane z obroną organizmu przed drobnoustrojami potwierdza podobieństwo budowy tego białka do składnika C1q dopełniacza [62]. Białko A surfaktantu wpływa także na funkcję komórek immunologicznych w płucach, regulując produkcję cytokin i wydzielanie immunoglobulin. SP-A zwiększa poziom mediatorów zapalenia, takich jak czynnik TNF- α oraz interleukiny - 1 α , -1 β i

6 [29]. Cytokininy te powodują proliferację i różnicowanie się limfocytów oraz oddziałują na makrofagi, neutrofile i komórki śródbłonkowe. Pobudzają one również wzrost produkcji kolagenu przez fibroblasty, co może mieć szkodliwy wpływ na strukturę płuc. Udowodniono także, że SP-A zwiększa produkcję immunoglobulin IgA, IgG i IgM [29]. W związku z hamującym działaniem lipidów surfaktantu na wyżej opisane procesy sugeruje się, że normalna równowaga immunologiczna jest wynikiem odpowiednich proporcji lipidów i białka A surfaktantu. Całkowite lub względne zwiększenie ilości SP-A prowadzi do pobudzenia funkcji komórek immunologicznych. Potwierdzeniem tego jest wzrost ilości SP-A przy niskim poziomie lipidów surfaktantu u pacjentów z zapaleniem płuc wywołanym przez *P. carinii* [24,42] czy spadek ilości lipidów u chorych zarażonych wirusem HIV [15].

BIAŁKO B SURFAKTANTU

Białko B surfaktantu (SP-B) ma właściwości silnie hydrofobowe, charakterystyczne dla białek wbudowanych w struktury błon komórkowych. Ten proteolipid pozostaje związany z fosfolipidami surfaktantu nawet podczas ekstrakowania rozpuszczalnikami organicznymi [21]. Świadczy to o rozmieszczeniu cząsteczek SP-B w głębi blaszek lipidowych ciałek blaszkowatych, a także innych struktur surfaktantu [47,66].

Białko B surfaktantu jest syntetyzowane w postaci prekursorowego polipeptydu o masie cząsteczkowej 40–42 kDa. Proteolipid pochodzący z formy prekursorowej ma masę cząsteczkową 7 kDa w formie zredukowanej i 18 kDa w formie niezredukowanej [47]. SP-B składa się z 79 aminokwasów [32], zawiera siedem reszt cysteinowych, z których sześć tworzy trzy wewnątrzłańcuchowe mostki dwusiarczkowe. Siódma bierze udział w wiązaniu dwusiarczkowym pomiędzy dwoma cząsteczkami SP-B tworzącymi dimer [25,26,64].

SP-B ma biofizyczne cechy zwiększające efektywność surfaktantu. Wpływa ono na fosfolipidy, powodując szybką ich adsorbcję na granicy faz, co prowadzi do znacznego obniżenia napięcia powierzchniowego [21,24,54]. Wraz z białkiem A i C surfaktantu SP-B bierze udział w tworzeniu tubularnych struktur mielinowych [26]. U dzieci z dziedzicznym niedoborem SP-B w przebiegu proteinozy pęcherzykowej obserwowano nie tylko brak tworzenia się tubularnych struktur mielinowych, ale i zaburzenia w ilości i rozmieszczeniu białka A i białka C. Ilościowemu wzrostowi tych białek towarzyszyło nieprawidłowe ich rozmieszczenie między komórkami pęcherzykowymi typu II a ich błoną podstawną pomimo nieuszkodzonych złącz komórkowych [14]. Może to sugerować istotną rolę SP-B w wydzielaniu surfaktantu.

Ponadto SP-B bierze udział w stabilizacji fosfolipidów surfaktantu. Cząsteczki tego białka połączone są z fosfolipidami specjalnymi wiązaniami, co ułatwia i przyspiesza obniżanie napięcia powierzchniowego [52,73].

Dodać należy, że badania immunocytochemiczne wskazują, iż SP-A i SP-B są także syntetyzowane w nieorzęsonych komórkach oskrzelikowych tzw. komórkach Clara. Nie wiadomo jednak, czy synteza tych białek dostarcza znaczących ilości białek do systemu pęcherzykowego surfaktantu [26].

BIAŁKO C SURFAKTANTU

Białko C surfaktantu (SP-C), podobnie jak SP-B, jest silnie hydrofobowym proteolipidem otrzymanym przez proteolizę z prekursora o masie cząsteczkowej 22 kDa. Jego forma niezredukowana ma masę 10 kDa, a zredukowana 5 kDa [47]. SP-C składa się z około 35 aminokwasów o unikalnym układzie poliwaliny i zawiera dwie reszty kwasu palmitynowego połączone kowalentnie z cysteiną na końcu aminowym białka [13,26], co decyduje o jego hydrofobowych właściwościach [63]. W części środkowej dojrzałego peptydu 20 hydrofobowych aminokwasów tworzy α -helisę, odpowiedzialną za powstanie podwójnej warstwy lipidowej surfaktantu [26,58]. Sposób wydzielania SP-B i SP-C nie jest dokładnie poznany, ale wiadomo, że występują one w ciałkach blaszkowatych [40]. SP-C podobnie jak białko B surfaktantu bierze udział w obniżaniu napięcia powierzchniowego, lecz jego działanie jest słabsze [21,24]. Znaczenie tych białek podkreśla fakt, że u dzieci z zespołem zaburzeń oddychania (RDS) leczenie za pomocą surfaktantu zawierającego SP-B i SP-C jest skuteczniejsze niż przy użyciu syntetycznego surfaktantu pozbawionego tych białek [26].

BIAŁKO D SURFAKTANTU

Białko D surfaktantu (SP-D) jest lektyną kolagenową typu C [39] o budowie podobnej do SP-A, białka surowicy wiążącego mannozę oraz konglutyniny bydłowej [9,12]. Sekwencja podobna do kolagenu w białku D surfaktantu jest znacznie dłuższa od tej występującej w SP-A [12]. SP-D jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 43 kDa [10,11]. Składa się ono z czterech trójłańcuchowych podjednostek tworzących 12-mer, który następnie może łączyć się w cząsteczki o bardziej złożonej strukturze [7,9,26]. Natomiast pojedynczy łańcuch SP-D składa się z krótkiej sekwencji niepodobnej do kolagenu zawierającej 2 reszty cysteiny na końcu aminowym, sekwencję podobną do kolagenu, krótki fragment ułożony w α -helisę oraz nie-

podobny do kolagenu odcinek na końcu C wykazujący duże podobieństwo z innymi lektykami typu C [10,12]. Ze względu na fakt, że wykazano obecność SP-D zarówno w komórkach pęcherzykowych typu II, jak i w ziarnach wydzielniczych komórek Clara [11] oraz w makrofagach pęcherzykowych [61] jest ono wydzielane nie tylko na powierzchnię pęcherzyków płucnych, ale i do światła dystalnych dróg oddechowych [9]. Jednakże ciała blaszkowate nie zawierają SP-D [61]. Ze względu na podobieństwo budowy SP-D do białka A surfaktantu mają one podobne znaczenie. Wykazano, że SP-D bierze udział w mechanizmach obronnych płuc. Białko to oddziałuje z wieloma mikroorganizmami (*Escherichia coli*) oraz łączy się z makrofagami, powodując przy dużych stężeniach aglutynację bakterii [10,26,30]. O ile SP-A łączy się z dipalmitoylofosfatydylocholiną, to białko D surfaktantu wybiórczo łączy się z fosfatydyloinozytolem [37]. Sugeruje to, że wraz z białkiem A surfaktantu, SP-D bierze udział w zewnątrzkomórkowym metabolizmie surfaktantu [9,10,37].

REGULACJA WYDZIELANIA BIAŁEK SURFAKTANTU

Synteza białek surfaktantu jest zależna zarówno od wieku płodu jak i od wpływu szeregu czynników hormonalnych [47,65]. SP-B i SP-C pojawiają się we wcześniejszym okresie ciąży niż SP-A, co potwierdza fakt, że mRNA dla ludzkiego SP-B i SP-C są wykrywane od drugiego trymestru, podczas gdy mRNA dla SP-A pojawia się od trzeciego trymestru ciąży [31]. Wiadomo również, że u zarodków myszy tworzenie ciałek blaszkowatych poprzedza pojawienie się SP-A. Wewnątrzkomórkowe przekształcenia i wydzielanie SP-A jest uwarunkowane hydroksylacją proliny, natomiast SP-B i SP-C jest prawdopodobnie regulowane niezależnie ponieważ nie stwierdzono wyraźnych zależności między poziomami ich odpowiednich mRNA w płucach [31].

Jednym z najważniejszych hormonów regulujących syntezę białek surfaktantu są wydzielane przez korę nadnerczy glikokortykoidy. Wykazano, że poziom SP-B i SP-C w płucach płodu wzrasta po podaniu glikokortykoidów [2], przy czym w przypadku SP-B działanie to polega na wzroście transkrypcji i stabilności mRNA, a w przypadku SP-C na wzroście tylko transkrypcji bez zmian w stabilności mRNA [60]. Natomiast wpływ glikokortykoidów na syntezę SP-A nie jest jednoznaczny. Opisano zarówno pobudzający, jak i hamujący wpływ tego hormonu na syntezę SP-A i jego mRNA [47]. Wyjaśnieniem takiego wpływu jest prawdopodobnie fakt, że SP-A wykazuje zależną od dawki odpowiedź na podawanie glikokortykoidów, gdzie za pobudzenie lub hamowanie jego syntezy są odpowiedzialne odpowiednio wzrost transkrypcji i zmniejszenie stabilności mRNA. Pobudzający wpływ gliko-

kortykoidów na poziom SP-A może być także zależny od gatunku oraz okresu rozwoju płodu, w którym działanie tych hormonów się rozpoczęło [47].

Innym istotnym czynnikiem regulującym syntezę białek surfaktantu jest cAMP i jego analogi. Podanie ich powoduje wzrost poziomu mRNA i syntezy SP-A w płodowych płucach królika oraz płucach ludzkich zarodków. W odróżnieniu od znacznego efektu analogów cAMP na syntezę SP-A, w przypadku SP-B i SP-C obserwuje się jedynie nieznaczny ich wpływ na poziomy odpowiednich mRNA w płucach ludzkich płodu [31]. Jednakże badania płodowych płuc szczura wskazują na mniejszy wpływ analogów cAMP na poziom mRNA dla SP-B [16], a większy w przypadku mRNA dla SP-C [59]. W badaniach płodowych płuc królika wykazano, że analogi cAMP powodują dwukrotny wzrost gromadzenia się mRNA dla SP-C po 48 godzinach od ich podania [5]. Istnieją także doniesienia, że wpływ glikokortykoidów i cAMP jest sumujący się w odniesieniu do syntezy SP-A i SP-B [26].

Synteza SP-D ma ścisły związek z okresem rozwojowym płodu. W badaniach płodowych płuc szczura SP-D pojawiało się po raz pierwszy w 19 dniu ciąży i następnie jego ilość szybko wzrastała do poziomu obserwowanego w płucach dorosłych osobników [38]. W innych badaniach, mRNA dla SP-D oznaczono po raz pierwszy w płodowych płucach szczura w 21 dniu ciąży [11]. Badania te wskazują, że synteza SP-D zachodzi w okresie późniejszym niż synteza fosfolipidów oraz innych białek surfaktantu.

RECYLKULACJA BIAŁEK SURFAKTANTU

Po spełnieniu roli czynnika obniżającego napięcie powierzchniowe, surfaktant jest usuwany z pęcherzyków płucnych pozostawiając miejsce dla nowo syntetyzowanych i wydzielanych cząsteczek. Większość fosfolipidów opuszcza pęcherzyki płucne i wchodzi ponownie do komórek typu II [68]. Ponadto niewielka ilość surfaktantu jest pochłaniana i rozkładana przez makrofagi pęcherzykowe [70], a następnie usuwana przez drogi oddechowe i układ krążenia.

Wiadomo również, że wraz z lipidami SP-A, SP-B i SP-C także wchodzi ponownie do komórek pęcherzykowych typu II [3,6,71]. Co więcej istnieją dane mówiące, że SP-C przechodzi do komórek pęcherzykowych typu II szybciej niż fosfatydylocholina [3]. Wyższa zawartość SP-A niż SP-B czy SP-C w pęcherzykach płucnych w zestawieniu z niższą zawartością SP-A w porównaniu z SP-B czy SP-C w ciałkach blaszkowatych, może sugerować dłuższy okres przebywania SP-A w pęcherzyku płucnym lub inne drogi wydzielania dla SP-A i białek hydrofobowych surfaktantu [18]. Wykazano, że w przypadku SP-A przechodzenie do komórek pęcherzykowych

typu II jest procesem endocytozy pośredniczonej przez receptor o wysokim powinowactwie do tego białka.

Autoradiografia z zastosowaniem mikroskopu elektronowego wykazała, że jedynie komórki pęcherzykowe typu II oraz makrofagi pęcherzykowe pochłaniają znaczące ilości znakowanego SP-A czy fosfatydylocholiny [71]. Inne komórki przegrody pęcherzykowej, a także komórki Clara nie uczestniczą w recyrkulacji.

Po przejściu przez błonę komórkową komórek pęcherzykowych typu II SP-A i SP-B oraz fosfatydylocholina są obecne początkowo w ciałkach wielopęcherzykowych, a w kilka minut później są już znajdowane w ciałkach blaszkowatych. SP-A znajduje się jedynie w ciałkach wielopęcherzykowych jasnych elektronowo podczas gdy fosfatydylocholina występuje zarówno w ciałkach wielopęcherzykowych jasnych elektronowo, jak i gęstych elektronowo [71]. Istnieje możliwość, że ciałka wielopęcherzykowe gęste elektronowo zawierają materiał podlegający rozkładowi i ponownemu użyciu do syntezy, podczas gdy ciałka wielopęcherzykowe jasne elektronowo wbudowują swoją zawartość bezpośrednio do ciałek blaszkowatych. Tak więc SP-A wprowadza podlegającą recyrkulacji pulę fosfolipidów do ciałek blaszkowatych chroniąc je przed rozkładem [47].

W związku z faktem, że lektyny są wchłaniane przez komórki pęcherzykowe typu II i przenoszone do ciałek blaszkowatych, SP-D podobnie jak SP-A mając cechy budowy lektyny może brać udział w recyrkulacji surfaktantu [26].

ZAKOŃCZENIE

Badania nad białkami surfaktantu nabierają szczególnego znaczenia ze względu na zastosowanie kliniczne egzogennych preparatów surfaktantu [43,48,53].

Metabolizm surfaktantu obejmuje zarówno rozkład lipidów i białek, jak i ich recyrkulację do ciałek blaszkowatych. Niezbędne jest poznanie mechanizmów komórkowych określających, które składniki surfaktantu są rozkładane, a które podlegają recyrkulacji. Zrozumienie tych procesów pozwoli na bardziej skuteczne zastosowanie leków w leczeniu RDS oraz programowanie składu egzogennych preparatów surfaktantu. Stwierdzono bowiem wyższą efektywność leczenia preparatami surfaktantu zawierającymi białka [27]. Szczególną rolę odgrywają tutaj hydrofobowe białka SP-B i SP-C, którym przypisuje się główną rolę w obniżaniu napięcia powierzchniowego.

LITERATURA

- [1] ALCORN IL, MENDELSON CR. Trafficking of surfactant protein A in fetal rabbit lung in organ culture. *Am J Physiol* 1993; **264**: L 27-L 35.

- [2] BALLARD PL, ERTSEY R, GONZALES LW, GONZALES J. Transcriptional regulation of human pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C by glucocorticoids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; **14**: 599–607.
- [3] BARITUSSIO A, PETTENAZZO A, BENEVENTO M, ALBERTI A, GAMBA P. Surfactant protein C is recycled from the alveoli to the lamellar bodies. *Am J Physiol* 1992; **263**: L 607–L 611.
- [4] BATES SR, DODIA C, FISHER AB. Surfactant protein A regulates uptake of pulmonary surfactant by lung type II cells on microporous membranes. *Am J Physiol* 1994; **267**: (Lung Cell Mol Physiol) L 753–L 760.
- [5] BOGGARAM V, MARGANA RK. Rabbit surfactant protein C: cDNA cloning and regulation of alternatively spliced surfactant protein C mRNAs. *Am J Physiol* 1992; **263**: L 634–L 644.
- [6] BRESLIN JS, WEAVER T. Binding, uptake, and localization of surfactant protein B in isolated rat alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1992; **262**: L 699–L 707.
- [7] BROWN AUGSBURGER P, CHANG D, RUST K, CROUCH EC. Biosynthesis of surfactant protein D. Contributions of conserved NH₂-terminal cysteine residues and collagen helix formation to assembly and secretion. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18912–18919.
- [8] CORBET A, BEDI H, OWENS M, TAEUSCH W. Surfactant protein-A inhibits lavage-induced surfactant secretion in newborn rabbits. *Am J Med Sci* 1992; **304**: 246–251.
- [9] CROUCH E, CHANG D, RUST K, PERSSON A, HEUSER J. Recombinant pulmonary surfactant protein D. Post-translational modification and molecular assembly. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15808–15813.
- [10] CROUCH E, PERSSON A, CHANG D, HEUSER J. Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *J Biol Chem* 1994; **269**: 17311–17319.
- [11] CROUCHE E, RUST K, MARIENCHEK W, PARGHI D, CHANG D, PERSSON A. Developmental expression of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *Am J Resp Cell Mol Biol* 1991; **5**: 13–18.
- [12] CROUCH E, RUST K, VEILE R, DÓNIS - KELLER H, GROSSO L. Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10 q 22.2-23.1. *J Biol Chem* 1993; **268**: 2976–2983.
- [13] CURSTEDT T, JOHANSSON J, PERSSON P, EKLUND A, ROBERTSON B, LOWENADLER B, JORNVALL H. Hydrophobic surfactant - associated polypeptides : SP-C is a lipopeptide with two palmitoylated cysteine residues, whereas SP-B lacks covalently linked fatty acyl groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 2985–2989.
- [14] DeMeLLO DE, HEYMAN S, PHELPS DS, HAMVAS A, NOGEE L, COLE S, COLTEN HR. Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Mol Biol* 1994; **11**: 230–239.
- [15] ESCAMILLA R, PREVOST MC, CARIVEN C, HERMANT C, KREMPF M, CHAP H. Bronchoalveolar lavage phospholipid abnormalities in HIV-infected patients. *Eur Respir J* 1993; **6**: 1301–1307.
- [16] FLOROS J, GROSS I, NICHOLS KV, VELETZA SV, DYNIA DW, LU II, WILSON CM, PETEREC SM. Hormonal effects on the surfactant protein B (SP-B) mRNA in cultured fetal rat lung. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1991; **4**: 449–454.
- [17] FROH D, BALLARD PL, WILLIAMS MC, GONZALES J, GOERKE J, ODOM MW, GONZALES LW. Lamellar bodies of cultured human fetal lung : content of surfactant protein A (SP-A), surface film formation and structural transformation *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1052**: 78–89.
- [18] FROH D, GONZALES LW, BALLARD PL. Secretion of surfactant protein A and phosphatidylcholine from type II cells of human fetal lung. *Am J Respir Cell Moll Biol* 1993; **8**: 556–561.
- [19] GRONIEWSKI J. Ultrastructure of the Pulmonary Alveolar Lining Layer. Published for the National Library of Medicine and the National Science Foundation. Washington D.C. : Warsaw 1983.

- [20] HATTORI A, KUROKI Y, SOHMA H, OGASAWARA Y, AKINO T. Human surfactant protein A with two distinct oligomeric structures which exhibit different capacities to interact with alveolar type II cells. *Biochem J* 1996; **317**: 939–944.
- [21] HAWGOOD S, SHIFFER K. Structures and properties of the surfactant - associated proteins. *Annu Rev Physiol* 1991; **53**: 375–394.
- [22] HIRAIKE N, SOHMA H, KUROKI Y, AKINO T. Epitope mapping for monoclonal antibody against human surfactant protein A (SP-A) that alters receptor binding of SP-A and the SP-A-dependent regulation of phospholipid secretion by alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1257**: 214–222.
- [23] IKEGAMIM, LEWIS JF, TABOR B, RIDER ED, JOBE AH. Surfactant protein A metabolism in preterm ventilated lambs. *Am J Physiol* 1992; **262**: L 765–L 772.
- [24] JAVORKA K, CALKOVSKA A. Plucny surfaktantovy faktor. Sucasne poznatky, smery vyskumu a pouzitie u klinickej praxi. *Bratisl Lek Listy* 1994; **95**: 452–456.
- [25] JOHANSSON J, CURSTEDT T, JORNVALL H. Surfactant protein B : disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities. *Biochemistry* 1991; **30**: 6917–6921.
- [26] JOHANSSON J, CURSTEDT T, ROBERTSON B. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 1994; **7**: 372–391.
- [27] JOHANSSON J, CURSTEDT T, ROBERTSON B. Synthetic protein analogues in artificial surfactants. *Acta Paediatr* 1996; **85**: 642–646.
- [28] KING RJ, CLEMENTS JA. Surface-active materials from dog lung. I. Method of isolation. *Am J Physiol* 1972; **223**: 707–714.
- [29] KREMLEV SG, PHELPS DS. Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production. *Am J Physiol* 1994; **11**: L 712–L 719.
- [30] KUAN SF, RUST K, CROUCH E. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an *Escherichia coli* - binding protein in broncho-alveolar lavage. *J Clin Invest* 1992; **90**: 97–106.
- [31] LILEY HG, WHITE RT, WARR RG, BENSON BJ, HAWGOOD S, BALLARD PL. Regulation of messenger RNAs for the hydrophobic surfactant proteins in human lung. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1191–1197.
- [32] LIN S, AKINBI HT, BRESLIN JS, WEAVER TE. Structural requirements for targeting of surfactant protein B (SP-B) to secretory granules *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 19689–19695.
- [33] McCORMACK FX, KUROKI Y, STEWART JJ, MASON RJ, VOELKER DR. Surfactant protein A amino acids Glu 195 and Arg 197 are essential for receptor binding phospholipid aggregation, regulation of secretion and the facilitated uptake of phospholipid by type II cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 29801–29807.
- [34] McNEELY TB, COONROD JD. Comparison of the opsonic activity of human surfactant protein A for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with rabbit and human macrophages. *J Infect Dis* 1993; **167**: 91–97.
- [35] MURATA Y, KUROKI Y, AKINO T. Role of the C-terminal domain of pulmonary surfactant protein A in binding to alveolar type II cells and regulation of phospholipid secretion. *Biochem J* 1993; **291**: 71–76.
- [36] NG VL, HERNDON VL, MENDELSON CR, SNYDER JM. Characterization of rabbit surfactant-associated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1983; **754**: 218–226.
- [37] OGASAWARA Y, KUROKI Y, AKINO T. Pulmonary surfactant protein D specifically binds to phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 1992; **267**: 21244–21249.
- [38] OGASAWARA Y, KUROKI Y, SHIRATORI M, SHIMIZU H, MIYAMURA K, AKINO T. Ontogeny of surfactant apoprotein D, SP-D, in the rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1083**: 252–256.

- [39] OGASAWARA Y, VOELKER DR. The role of the amino-terminal domain and the collagenous region in the structure and the function of rat surfactant protein D. *J Biol Chem* 1995; **270**: 19052–19058.
- [40] OOSTERLAKEN - DIJKSTERHUIS MA, van EIJK M, van BUEL BLM, van GOLDE LMG, HAAGSMAN HP. Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung. *Biochem J* 1991; **274**: 115–119.
- [41] PHELPS DS. Pulmonary surfactant modulation of host-defense function. *Appl Cardiopulm Pathophysiol* 1995; **5**: 221–229.
- [42] PHELPS DS, UMSTEAD TM, ROSE RM, FISHMAN IA. Surfactant protein-A levels increase during *Pneumocystis carinii* pneumonia in the rat. *Eur Respir J* 1996; **9**: 565–570.
- [43] RAJA K, LANGENBORG P. Pulmonary hemorrhage and exogenous surfactant therapy: A metaanalysis. *J Ped* 1993; **123**: 603–610.
- [44] REID KBM. Structure / function relationships in the collectins (mammalian lectins containing collagen-like regions). *Biochem Soc Trans* 1993; **21**: 464–468.
- [45] RISCO C, ROMERO C, BOSCH MA, PINTO da SILVA P. Type II pneumocytes revisited : intracellular membranous systems, surface characteristics, and lamellar body secretion. *Lab Invest* 1994; **70**: 407–417.
- [46] ROONEY SA, GOBRAN LI, UMSTEAD TM, PHELPS DS. Secretion of surfactant protein A from rat type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1993; **265**: L 586–L 590.
- [47] ROONEY SA, YOUNG SL, MENDELSON CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J* 1994; **8**: 957–967.
- [48] RUTKOWSKA M. Kryteria kwalifikacji do leczenia sztucznym surfaktantem noworodków z zespołem zaburzeń oddychania (RDS). *Anest Inten Ter* 1993; **25**: 157–168.
- [49] RUTKOWSKA M. Surfaktant płucny: od fizjopatologii do zastosowania w praktyce. *Klin Pediat* 1995; **3**: 24–28.
- [50] SHERMAN MP, GANZ T. Host defense in pulmonary alveoli. *Annu Rev Physiol* 1992; **54**: 331–350.
- [51] STRAYER DS, PINDER R, CHANDER A. Receptor-mediated regulation of pulmonary surfactant secretion. *Exp Cell Res* 1996; **226**: 90–97.
- [52] SZYMANKIEWICZ M, GADZINOWSKI J. Białka surfaktantu. *Kliniczna Perinatologia i Ginekologia* 1994.
- [53] SZYMANKIEWICZ M, GADZINOWSKI J, BRĘBOWICZ G. Podanie surfaktantu profilaktyczne czy lecznicze? *Kliniczna Perinatologia i Ginekologia* 1994.
- [54] TANEVA SG, KEOUGH KM. Calcium ions and interactions of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C with phospholipids in spread monolayers at the air /water interface. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1236**: 185–195.
- [55] TANEVA S, McEACHREN T, STEWART J, KEOUGH KM. Pulmonary surfactant protein SP-A with phospholipids in spread monolayers at the air- water interface. *Biochemistry* 1995; **34**: 10279–10289.
- [56] TINO MJ, WRIGHT JR. Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1996; **270**: L 677–L 688.
- [57] TSUZUKI A, KUROKI Y, AKINO T. Pulmonary surfactant protein A - mediated uptake of phosphatidylcholine by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1993; **265** (Lung Cell Mol Physiol 9): L 193–L 199.
- [58] VANDENBUSSCHE G, CLERCX A, CURSTEDT T, JOHANSSON J, JORNVALL H, RUYSSCHAERT JM. Structure and orientation of the surfactant - associated protein C in a lipid bilayer. *Eur J Biochem* 1992; **203**: 201–209.
- [59] VELETZA SV, NICHOLS KV, GROSS I, LU H, DYNIA DW, FLOROS J. Surfactant protein C : hormonal control of SP-C mRNA levels *in vitro*. *Am J Physiol* 1992; **262**: L 684–L 687.

- [60] VENKATESH VC, JANNUZZI DM, ERTSEY R, BALLARD PL. Differential glucocorticoid regulation of the pulmonary hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; **8**: 222–228.
- [61] VOORHOUT WF, VEENENDAAL T, KUROKI Y, OGASAWARA Y, van GOLDE LMG, GEUZE HJ. Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 1589–1597.
- [62] VOSS T, MELCHERS K, SCHEIRLE G, SCHAFFER KP. Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences : implications for the chain composition of natural human SP-A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; **4**: 88–94.
- [63] WANGZ, GUREL O, BAATZ JE, NOTTER RH. Acylation of pulmonary surfactant protein-C is required for its optimal surface active interactions with phospholipids. *J Biol Chem* 1996; **271**: 19104–19109.
- [64] WARING AJ, FAULL KF, LEUNG C, CHANG-CHIEN A, MERCADO P, TAEUSCH HW, GORDON LM. Synthesis, secondary structure and folding of the bend region of lung surfactant protein B. *Pept Res* 1996; **9**: 28–39.
- [65] WEAVER TE, WHITSETT JA. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem J* 1991; **273**: 249–264.
- [66] WHITSETT JA, NOGEE LM, WEAVER TE, HOROWITZ AD. Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease. *Physiol Rev* 1995; **75**: 749–757.
- [67] WRIGHT JR, BORCHELT JD, HAWGOOD S. Lung surfactant apoprotein SP-A (26-32 kDa) binds with high affinity to isolated alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 5410–5414.
- [68] WRIGHT JR, DOBBS LG. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu Rev Physiol* 1991; **53**: 395–414.
- [69] WRIGHT JR, YOUMANS DC. Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *Am J Physiol* 1993; **264** (Lung Cell Mol Physiol 8): L 338–L 344.
- [70] WRIGHT JR, YOUMANS DC. Degradation of surfactant lipids and surfactant protein A by alveolar macrophages *in vitro*. *Am J Physiol* 1995; **268**: L 772–L 780.
- [71] YOUNG SL, FRAM EK, LARSON E, WRIGHT JR. Recycling of surfactant lipid and apoprotein – A studied by electron microscopic autoradiography. *Am J Physiol* 1993; **265**: L 19–L 26.
- [72] YOUNG SL, HO YS, SILBAJORIS RA. Surfactant apoprotein in adult rat lung compartments is increased by dexamethasone. *Am J Physiol* 1991; **260**: L 161–L 167.
- [73] ZUPAN V, LACAZE-MASMONTEIL T. Le surfactant pulmonaire : de la physiopathologie a la therapeutique. *Medecine/sciences* 1993; **9**: 277–287.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 20.03.1997 r.

Przyjęto: 24.04.1997 r.

*Adres autora: I Katedra i Zakład Histologii i Embriologii ŚIAM,
41-808 Zabrze, ul. Jordana 19*

KARBOKSYLAZA/OKSYGENAZA RYBULOZO-1,5-BISFOSFORANU – KLUCZOWY ENZYM FOTOSYNTETY I FOTOODDYCHANIA* – OSTATNIA DEKADA BADAŃ

RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE – THE KEY ENZYME IN PHOTOSYNTHESIS AND PHOTORESPIRATION* – THE LAST DECADE RESEARCH

Stanisław MALESZEWSKI, Bożena KOZŁOWSKA-SZERENOS

Instytut Biologii, Uniwersytet Warszawski, Filia w Białymstoku

Streszczenie: Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (rubisco), dwufunkcyjny enzym chloroplastowy, inicjuje fotosyntetyczną asymilację dwutlenku węgla i fotooddychanie. Od aktywności tego enzymu zależy natężenie fotosyntezy i produktywność roślin. Prowadzone w ostatnich latach badania dostarczyły nowych informacji o jego budowie, syntezie i regulacji.

Słowa kluczowe: karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu, rubisco, fotosynteza, fotooddychanie

Summary: Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco), bifunctional chloroplast enzyme, initiates photosynthetic assimilation of carbon dioxide and photorespiration. The photosynthetic rate and plant productivity depend on this enzyme. Recent studies supplied new information concerning its structure, synthesis and regulation.

Key words: ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, rubisco, photosynthesis, photorespiration

Wykaz stosowanych skrótów: CAIP – 2-karboksy-arabinitolo-1-fosforan, ECM – trójskładnikowy kompleks zaktywowanej rubisco (Enzym-CO₂-Mg²⁺), L – duża podjednostka rubisco, PAR – promieniowanie aktywne fotosyntetycznie, PGA – kwas 3-fosfoglicerynowy, rośliny C₃ – rośliny, u których

* Artykuł na taki sam temat, autorstwa S. Maleszewskiego, był zamieszczony w Postępkach Biologii Komórki 1988, tom 15, nr 3, str. 233–254. * Artykuł został napisany podczas realizacji przez B. Kozłowską-Szerenos grantu KBN nr 6 PO4C 104 10

pierwszym trwałym produktem asymilacji CO₂ jest PGA, **rośliny C₄** – rośliny, u których pierwszym produktem wiązania CO₂ jest kwas szczawiooctowy, **RuBP** – rybulozo-1,5-bisfosforan, **rubisco** – karboksylaza/oksygenaza RuBP, **S** – mała podjednostka rubisco, **SF** (*specificity factor*) – współczynnik powinowactwa substratowego CO₂/O₂ rubisco.

WPROWADZENIE

Energia fotosyntetycznie aktywnego promieniowania słonecznego z zakresu długości fal 400–700 nm (PAR), pochłonięta i przetworzona przez rośliny w energię chemiczną związków organicznych, jest następnie wykorzystywana we wszystkich procesach biologicznych. Nagromadzona w pokładach węgla kamiennego, ropy i gazu ziemnego nadal zaspokaja większość potrzeb energetycznych człowieka. Tlen atmosferyczny, "uboczny" produkt fotosyntezy, pełniąc funkcje końcowego akceptora elektronów w oddychaniu, umożliwia wysoką sprawność energetyczną katabolicznych przemian komórkowych. Występowanie tlenu w atmosferze ziemskiej pozwoliło na ewolucyjne wyjście życia z oceanów, gdyż tworzy on filtr osłaniający organizmy lądowe przed zabójczym działaniem słonecznego promieniowania ultrafioletowego.

Rośliny, w naturalnych zespołach jak i w uprawach rolniczych, wiążą fotosyntetycznie tylko od 5 do 12% padającego na nie PAR, a globalna sprawność fotosyntezy jest nawet znacznie mniejsza niż 1% [27,29]. Mimo to całkowita roczna fotosyntetyczna asymilacja CO₂, oceniana na około 10¹¹ ton, wielokrotnie przewyższa obecne roczne światowe zużycie ropy naftowej, wynoszące około 3 x 10⁹ ton [46]. Wydajność pochłaniania i przetwarzania energii w reakcjach fotosyntezy określa biologiczną produkcję pierwotną i ilość energii przepływającą przez biocenozy. Analiza czynników ograniczających wydajność fotosyntetyczną oraz znalezienie sposobów jej podniesienia są nadrzędnymi celami we współczesnych badaniach nad fotosyntezą i produktywnością roślin.

Kluczowe znaczenie rubisco dla sprawności fotosyntetycznej asymilacji dwutlenku węgla jest powodem prowadzenia szczególnie intensywnych i wielostronnych badań nad tym enzymem. Wyniki prac sprzed 1987 roku były przedstawiane w polskim piśmiennictwie [5, 21,22,24,25,28,30,35,36]. Nowsze osiągnięcia są wyczerpująco omówione w kilku artykułach przeglądowych, które niedawno ukazały się w czasopiśmie międzynarodowych [14,16,26,53]. Oksygenacyjną funkcję rubisco oraz próby jej modyfikacji autorzy tego artykułu opisali w ubiegłorocznym Kosmosie [31].

FUNKCJE RUBISCO

Karboksyhlaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (rubisco, EC 4.1.1.39) katalizuje reakcję karboksylacji ($\text{RuBP} + \text{CO}_2 \rightarrow 2 \text{PGA}$), inicjującą procesy fotosyntetycznego wiązania CO_2 , redukcji węgla i akumulacji energii w związkach organicznych. Ten bifunkcyjny enzym katalizuje także reakcję oksygenacji ($\text{RuBP} + \text{O}_2 \rightarrow \text{PGA} + \text{P-glikolan}$), zapoczątkowującą fotooddechowy cykl utleniania związków węgla oraz fotooddychanie. Bezpośrednim akceptorem zarówno CO_2 , jak i O_2 jest przejściowy metabolit 2,3-enodiol RuBP (enol-RuBP) [8, 28, 31]. Stosunek szybkości karboksylacji/oksygenacji RuBP zależy od stężeń obu gazowych substratów i kinetycznych parametrów rubisco:

$$v_c/v_o = V_c K_o / V_o K_c [\text{CO}_2] / [\text{O}_2],$$

gdzie:

v_c , v_o – szybkość karboksylacji, oksygenacji;

V_c , V_o – szybkość maksymalna karboksylacji, oksygenacji;

K_c , K_o – powinowactwo do CO_2 , O_2 ;

$[\text{CO}_2]$, $[\text{O}_2]$ – stężenie CO_2 , O_2 w miejscu działania enzymu.

Wartość wyrażenia $V_c K_o / V_o K_c$, zwanego współczynnikiem powinowactwa substratowego CO_2/O_2 rubisco (SF, ang. *specifity factor*), jest podobna u różnych fotosyntetycznych typów roślin wyższych C_3 , C_4 oraz pośredniego typu $\text{C}_3\text{-C}_4$ i wynosi około 80. SF jest niższy u glonów (około 60) i sinic (około 50). Wartość SF jest szczególnie niska u fotosyntetyzujących bakterii *Rhodospseudomonas sphaeroides* (około 9) i *Rhodospirillum rubrum* (około 15), co jest prawdopodobnie związane z opisaną niżej, prostszą czwartorzędową strukturą ich rubisco [8, 17, 18, 53]. Przy podanych wyżej wartościach SF i stężeniach CO_2 i O_2 występujących podczas zrównoważonej fotosyntezy w miejscu działania rubisco, ocenianych odpowiednio na około 10,5 μM i 258 μM , stosunek v_c/v_o u roślin wyższych ma wartość około 3, zaś u innych fotoautotrofów jest odpowiednio mniejszy [8, 20, 33].

Rubisco charakteryzuje się skrajnie niską aktywnością katalityczną, co wyraża mała liczba obrotów (3 obr. $\cdot \text{s}^{-1}$), lecz osiąga w stromie chloroplastów wyjątkowo duże stężenie. Prawdopodobnie jest białkiem występującym w biosferze w największej ilości [46]. Aktywność rubisco w liściach roślin C_3 jest zwykle nieco większa niż u roślin C_4 [4].

STRUKTURA

Rubisco roślin wyższych i większości innych fotoautotrofów ma jednakową strukturę czwartorzędową. Składa się z ośmiu dużych 55 kD (L) i ośmiu małych

15 kD podjednostek (S), tworzących heksadkameryczny 560 kD holoenzym (L_8S_8). Prostsza strukturę czwartorzędową rubisco L_2 stwierdzono jedynie u bakterii *Rhodospirillum rubrum* i *Rhodobacter sphaeroides* [46]. Katalityczna aktywność enzymu jest związana z dużymi podjednostkami. Małe podjednostki pełnią funkcje regulacyjne i zwiększają aktywność karboksylacyjną holoenzymu rubisco ponad 100-krotnie [1, 26]. Znana jest struktura pierwszorzędowa – liczba aminokwasów oraz ich liniowa sekwencja – obu podjednostek rubisco wielu fotoautotrofów. Podjednostki L enzymów typu L_8S_8 są zbudowane z niespełna 500 (475 u szpinaku) reszt aminokwasowych. Podjednostki te, pochodzące z różnych roślin, charakteryzują się wysoką około 80% homologią sekwencyjną. Natomiast homologia podjednostek L enzymów o budowie L_8S_8 i L_2 z *R. rubrum* wynosi tylko około 25%. Dużym konserwatyżmem ewolucyjnym charakteryzują się zwłaszcza rejony tworzące miejsce aktywne [26].

W badaniach krystalograficznych stwierdzono, że struktura drugo- i trzeciorzędowa – przestrzenna organizacja łańcucha peptydowego – podjednostek L z różnych fotoautotrofów wykazuje również duże podobieństwo. Dotyczy to również enzymów o niskiej homologii sekwencji reszt aminokwasowych. Podjednostka ta składa się z dwu wyraźnie zarysowanych domen o różnej wielkości: mniejszej, obejmującej reszty aminokwasowe 1–150 końca N łańcucha białkowego (domena N-terminalna) i większej, zbudowanej z aminokwasów 151–475 końca C (domena C-terminalna). Centralnym motywem domeny N-terminalnej jest pięcioodcinkowa, mieszana struktura β z dwoma heliksami α (ang. α -*helices*) na końcu. Domena C-terminalna ma ośmioodcinkową, współbieżną strukturę α/β -baryłkową (ang. α/β -*barrel structure*), występującą także w innych enzymach, np. izomerazie triozofosforanowej i oksydazie glikolanowej [26,46].

W budowie miejsca aktywnego rubisco, wspólnego dla reakcji karboksylacji i reakcji oksigenacji, uczestniczą obie domeny. Znajduje się ono na styku domeny C-terminalnej jednej podjednostki L i domeny N-terminalnej drugiej podjednostki L, przy karboksylowym końcu baryłkowej struktury β . W pętłach peptydowych, łączących struktury β i heliksy α baryłki, występuje większość konserwatywnych reszt aminokwasowych łańcucha podjednostki. Reszty te uczestniczą zarówno w wiązaniu substratów, jak i w procesie katalizy [46]. W miejscu aktywnym rubisco zidentyfikowano dwie reszty lizynowe, które prawdopodobnie mają istotne znaczenie dla katalitycznych funkcji enzymu. W rubisco z *R. rubrum* zajmują one pozycje 166 i 329, a w enzymie ze szpinaku 175 i 334, w odległości 12 Å od siebie [46].

Podjednostka S rubisco szpinaku jest zbudowana z 123 reszt aminokwasowych tworzących czteroodcinkową przeciwbieżną strukturę β przykrytą z jednej strony dwoma heliksami α . Pierwsze 20 reszt aminokwasowych końca N jej łańcucha polipeptydowego tworzy nieregularne ramię, które rozciąga się od korpusu tej struktury do sąsiedniej małej podjednostki oligomeru L_8S_8 [26].

Dimer L_2 , będący podstawową jednostką strukturalną rubisco, jest zniekształconą elipsoidą o wymiarach 45 x 70 x 105 Å. Rdzeń dimeru tworzą C-terminalne domeny obu podjednostek. Holoenzym L_8S_8 ma kształt sześcianu o zaokrąglonych brzegach i długości boków około 110 Å. Małe podjednostki (S) wypełniają głębokie bruzdy utworzone na czterech powierzchniach sześcianu przez przylegające do siebie dimery L_2 . Szczegółowe wyniki krystalograficznej analizy rubisco szpinaku są zamieszczone w obszernej publikacji Knight i wsp. [26].

SYNTEZA

Geny rubisco roślin wyższych należą do dwu odmiennych genomów. Jednostka L jest kodowana w genomie chloroplastowym, natomiast gen podjednostki S jest częścią genomu jądrowego.

W cząsteczce chloroplastowego DNA jest tylko jeden gen (*rbcL*) kodujący podjednostkę L. Chociaż każdy chloroplast zawiera wiele kopii DNA, a w komórce mogą występować liczne chloroplasty, to rośliny nie będące hybrydami charakteryzują się tylko jedną specyficzną sekwencją białka podjednostki L. Z małymi wyjątkami gen *rbcL* nie zawiera intronów i koduje około 475 aminokwasów. Transkrypcyjne i translacyjne sekwencje rozpoznające genu *rbcL*, tak jak i wielu innych genów chloroplastowych, są podobne do sekwencji występujących u organizmów prokariotycznych. Dowodem tego jest możliwość ekspresji tego genu u *Escherichia coli* [13]. Na transkrypcję genu *rbcL*, oprócz jego promotora, ma wpływ sąsiedni promotor *atpB*, znajdujący się w odległości około 100 par zasad w przeciwległej orientacji [16,50].

Podjednostkę S w genomie jądrowym koduje rodzina genów (*rbcS*), licząca od 2 do 12 genów, które mogą wykazywać odmienną ekspresję w różnych typach komórek i fazach rozwojowych rośliny [50, 51]. Jądrowe geny *rbcS* zawierają od 1 do 3 intronów i są bardziej zróżnicowane niż chloroplastowe geny dużej podjednostki. Kodują one polipeptyd przejściowy, dłuższy od dojrzałej S o około 50 reszt aminokwasowych. Ekspresja *rbcS* zwiększa się na świetle, a w procesie tym uczestniczy zarówno fitochrom, jak i specyficzny fotoreceptor światła niebieskiego [12,16,50,52]. Przejściowy polipeptyd podjednostki S ulega transformacji polegającej na skróceniu końca N i po przetransportowaniu z cytosolu do chloroplastu łączy się z L tworząc holoenzym rubisco. W ostatnim procesie uczestniczą tzw. białka towarzyszące (ang. *chaperon protein*), które zapewniają właściwą konformację końcowej postaci enzymu [9,14,15,46].

AKTYWACJA I REGULACJA AKTYWNOŚCI

Aktywność rubisco zależy od wielu czynników i jest regulowana przez złożony mechanizm, którego działanie, zwłaszcza *in vivo*, nie jest zadowalająco poznane.

W doświadczeniach *in vitro* wyizolowany i częściowo oczyszczony enzym (E), obu znanych typów (L_2 i L_8S_8), dla uzyskania maksymalnej aktywności musi być poddany specyficznej aktywacji. Podczas tego procesu następuje najpierw, zależne od pH, samorzutne przyłączenie aktywującej cząsteczki CO_2 (C) do ϵ -aminowej grupy Lys-201, zlokalizowanej na dużej podjednostce w pobliżu centrum aktywnego. Wytworzony karbaminian (EC) jest następnie stabilizowany przez przyłączenie Mg^{2+} (M), co prowadzi do powstania trójskładnikowego kompleksu enzym- CO_2 - Mg^{2+} (ECM), stanowiącego katalitycznie aktywną formę enzymu, wiążącą RuBP (R). Końcowy stan równowagi pomiędzy zaktywowaną formą enzymu a jej prekursorami (stopień aktywacji) zależy od warunków, w jakich aktywacja przebiega: $[H^+]$, $[CO_2]$, $[Mg^{2+}]$. W obecności RuBP i innych fotosyntetycznych fosforanów cukrów (S) aktywacja rubisco ma przebieg bardziej złożony. Substraty te łączą się bowiem ze wszystkimi formami enzymu, tworząc ES, ECS i ECMS. Uniemożliwia to przejścia pomiędzy E, EC i ECM oraz tworzenie kompleksu ECMR [37].

Wytwarzanie ukarbamylowanego trójskładnikowego kompleksu ECM jest związane ze zmianami chemicznych właściwości enzymu. Karbamylicacja wpływa na reaktywność i nukleofilność reszt lizynowych znajdujących się w jego miejscu aktywnym. Proces ten wpływa na powinowactwo enzymu do RuBP i innych fosforanów cukrów [46].

AKTYWAZA

Aktywacja rubisco *in vitro*, wyizolowanego i częściowo oczyszczonego enzymu, do poziomu odpowiadającego natężeniu fotosyntezy *in vivo* wymaga bardzo wysokich stężeń CO_2 i Mg^{2+} . W komórce natomiast może przebiegać przy fizjologicznych, znacznie niższych stężeniach tych czynników i zależy od warunków środowiskowych: poziomu żywienia fosforowego i azotowego, stężeń CO_2 i O_2 oraz temperatury. W doświadczeniach z różnymi gatunkami fotoautotrofów stwierdzono też, że ważnym czynnikiem wpływającym na aktywację rubisco *in situ* jest światło. Badania nad tym ostatnim zjawiskiem doprowadziły do odkrycia [43] rozpuszczalnego białka chloroplastowego, aktywazy rubisco, enzymu "odpowiedzialnego" za właściwości i przebieg aktywacji rubisco *in vivo*. Aktywaza, występująca u wszystkich badanych pod tym względem fotoautotrofów, umożliwia osiągnięcie w oświetlanych komórkach przy atmosferycznym stężeniu CO_2 i obecności RuBP aktywności rubisco zbliżonej do maksymalnej [37,38,39,42].

Mechanizm funkcjonowania aktywazy rubisco nie został jeszcze szczegółowo poznany, niewątpliwie jednak polega na oddziaływaniu na kompleksy rubisco - fosforany cukrów (ECMS) [32]. Aktywaza znosi niekorzystny wpływ silnie wiążących się fosforanów cukrów na aktywację rubisco. Umożliwia też karbamylację oraz przebieg reakcji katalizowanych przez rubisco przy niskim poziomie CO_2 w chloroplastach. Funkcjonowanie aktywazy jest regulowane przez stosunek stężeń ATP/ADP, zależny od warunków świetlnych. Enzym ten jest więc też kluczowym elementem koordynacji świetlnej i ciemnej fazy fotosyntezy [42].

Aktywaza rubisco licznych gatunków roślin składa się z dwu różnych polipeptydów mieszczących się w zakresie 41–46 kDa. Są one syntetyzowane na cytosolowych rybosomach w postaci nieco dłuższych prekursorów i transportowane do chloroplastów. Pierwszorzędowa struktura tego enzymu wykazuje ponad 80% poziom konserwatywności ewolucyjnego [42].

Zakładając, że aktywaza jest tetramerem zbudowanym z podjednostek 47 kDa [37] obliczono, że w liściach tytoniu molowy stosunek tego enzymu do rubisco jest 1:10 [32].

SPECYFICZNY INHIBITOR

Drugim elementem mechanizmu regulacji rubisco jest wytwarzany podczas ciemności specyficzny inhibitor 2-karboksy-arabinitolo-1-fosforan (CAIP). Nie występuje on jednak u wszystkich roślin. Inhibitor ten budową przypomina pośredni produkt karboksylacji RuBP 2-karboksy-3-keto-arabinitolo-1,5-bisfosforan. Nie jest wyjaśnione, jaką drogą powstaje w chloroplastach i jakim przemianom ulega. CAIP wiąże się bardzo silnie z zaktywowaną postacią rubisco ECM i hamuje katalizę w sposób niekompetycyjny. Poziom inhibitora zależy od warunków świetlnych; zwiększa się w ciemności, a zmniejsza na świetle [3,47,48].

Początkowo sądzono, że pomiędzy działaniem aktywazy rubisco i CAIP istnieje bezpośredni związek. Jednakże obecność aktywazy u wszystkich badanych pod tym względem roślin wyższych, a inhibitora tylko u niektórych przeczy takiej sugestii. Wydaje się, że udział obu omówionych czynników w mechanizmie regulacji rubisco u różnych roślin jest zróżnicowany. U szpinaku, który nie gromadzi CAIP w ciemności, regulacja rubisco następuje prawdopodobnie wyłącznie przy udziale aktywazy. U fasoli zaś, u której poziom CAIP może być bardzo wysoki i w dużym stopniu jest zależny od warunków świetlnych, regulacja rubisco odbywa się głównie przy jego udziale. U większości roślin regulacja aktywności rubisco przebiega jednak z udziałem obu czynników [37,41].

INNE CZYNNIKI REGULACJI

Wartość współczynnika powinowactwa substratowego rubisco (SF) ma istotne znaczenie dla stosunku v_c/v_o , natężenia fotosyntetycznego wiązania CO_2 netto oraz produktywności roślin. Z tego względu podejmowano liczne badania mające na celu znalezienie czynników powodujących modyfikacje tego współczynnika.

W katalitycznie aktywnym trójskładnikowym kompleksie ECM jon Mg^{2+} może być zastąpiony przez jony innych metali: Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} . Osiągnięty stopień aktywności enzymu zależy wówczas zarówno od przyłączonego metalu, jak i typu rubisco. Rodzaj aktywującego metalu ma także wpływ na SF i stosunek obu aktywności v_c/v_o rubisco. Podobne zmiany stwierdzono także po zmianie reszt aminokwasowych, zlokalizowanych w pobliżu centrum aktywnego enzymu [46].

Od dawna znany jest też wpływ temperatury na v_c/v_o rubisco. Niewątpliwie efekt ten częściowo można tłumaczyć różnym działaniem temperatury na rozpuszczalność CO_2 i O_2 oraz na stężenie tych substratów w stromie chloroplastów [28]. Ostatnio wykazano jednak, że temperatura wpływa także bezpośrednio na SF rubisco. Reakcja pomiędzy enolo-RuBP i O_2 ma bowiem wyższą swobodną energię aktywacji (ΔG_o) niż odpowiednia reakcja z CO_2 (ΔG_c). Z tego powodu oksygenacja jest bardziej wrażliwa na zmiany temperatury niż karboksylacja. Występuje też wyraźny związek pomiędzy wartością SF rubisco odmienną u różnych grup fotoautotrofów a wielkością różnicy $\Delta G_o - \Delta G_c$ [8,17,53].

Wykazano ścisłą korelację pomiędzy aktywnością rubisco a stosunkiem stężeń ATP/ADP w chloroplastach. Prawdopodobnie związek ten jest pośredni i spowodowany głównie wspomnianą wyżej zależnością aktywacji rubisco od stosunku ATP/ADP [42].

Częściowo oczyszczona i całkowicie zaktywowana rubisco *in vitro* inkubowana z RuBP stopniowo traci aktywność podczas wiązania CO_2 [55]. Uzyskano dane wskazujące, że zjawisko to jest spowodowane akumulacją inhibitora, wiążącego się silnie w miejscu katalitycznym enzymu. Prawdopodobnie jest nim ksylulozo-1,5-bisfosforan lub 3-ketoarabinitolo-1,5-bisfosforan [10,11]. Obecność w mieszaninie inkubacyjnej aktywacji rubisco i ATP zapobiega lub nawet odwraca tę inaktywację. Przypuszcza się, że aktywacja rubisco zwiększa szybkość dysocjacji przyłączonego inhibitora, podobnie jak w przypadku RuBP i CA1P [37,40].

Ostatnio doniesiono, że u pszenicy (*Triticum aestivum*), która należy do roślin nie akumulujących CA1P, dobową regulację rubisco następuje przy udziale niezidentyfikowanego inhibitora innego niż wymienione wyżej [34,48]. Wysłunięto przypuszczenie, że może to być prekursor CA1P lub związek o podobnej budowie działający w procesie aktywacji rubisco na etapie karbamylicacji [23].

Rubisco i inne enzymy cyklu Calvina tworzą w chloroplastach zintegrowany system, którego równowagę działania regulują mechanizmy sprzężenia zwrotnego (*feedback*)

i sprzężenia do przodu (*feedforward*) funkcjonujące przy udziale wspólnych metabolitów. Na szybkość reakcji katalizowanych przez rubisco pozytywny efekt, oprócz bezpośrednich substratów tego enzymu, wywierają produkty świetlnej fazy fotosyntezy: ATP i NADPH. Negatywny wpływ ma PGA. RuBP działa hamująco na fosforybulokinazę, enzym katalizujący odtwarzanie RuBP [49]. Dużo uwagi poświęcono też działaniu nieorganicznego ortofosforanu (P_i), który w reakcjach fotosyntezy jest substratem, produktem oraz czynnikiem regulacji enzymów [54]. Od stężenia P_i może zależeć stopień aktywacji [44,45] oraz współczynnik powinowactwa substratowego CO_2/O_2 rubisco [18]. Uzyskano dane świadczące, że P_i jest ważnym czynnikiem wzmagającym karbamylację rubisco, wielokrotnie zwiększającym powinowactwo rubisco do aktywującego CO_2 [2].

W doświadczeniach z mutantami *Arabidopsis thaliana* z defektami w szlaku fotooddechowym stwierdzono, że glioksylan – pośredni metabolit fotooddychania – może zmniejszać aktywację rubisco [7]. Glioksylan *in vitro* wykazywał takie działanie tylko przy stężeniu dwuwęglanu odpowiadającym atmosferycznemu stężeniu CO_2 i w obecności błon tylakoidów. Sugeruje to, że w zależnym od światła procesie aktywacji rubisco pośredniczy jakiś nieznany składnik, wrażliwy na glioksylan [6]. Wydaje się jednak, że regulacja rubisco przy udziale glioksylanu może nie mieć istotnego znaczenia przy normalnym przebiegu fotosyntezy u roślin odpowiednio zaopatrzonych w azot. Metabolit ten nie gromadzi się bowiem w liściu, lecz w wyniku transaminacji przekształcany jest w glicynę [6,38].

UWAGI KOŃCOWE

W rezultacie badań prowadzonych w ostatnich latach wiedza o rubisco, kluczowym enzymie fotosyntezy i fotooddychania, uległa znacznemu wzbogaceniu. Dokonano istotnych ustaleń dotyczących struktury i genetycznych aspektów enzymu. Mechanizm aktywacji został uzupełniony o działanie fosforanów cukrów i światła. Fundamentalnym osiągnięciem było odkrycie specyficznych inhibitorów oraz aktywazy, które uczestniczą w zależnej od światła i ciemności dobowej regulacji rubisco. Nie udało się natomiast próby zmiany współczynnika powinowactwa substratowego CO_2/O_2 rubisco w kierunku zwiększenia aktywności karboksylacyjnej, korzystnym dla fotosyntetycznej produktywności roślin. Modyfikacje enzymu powodowały bowiem zawsze efekt odwrotny od pożądanego. Nie wyjaśniono też, czym jest bezpośrednio uwarunkowana większa wartość współczynnika charakterystyczna dla postaci enzymu L_8S_8 niż dla postaci L_2 . Dalsze badania powinny doprowadzić do lepszego rozumienia zasad integracji rubisco z pozostałymi składnikami aparatu fotosyntetycznego oraz z innymi procesami przebiegającymi w chloroplastcie, komórce i całej roślinie.

LITERATURA

- [1] ANDREWS TJ. Catalysis by cyanobacterial ribulose-bisphosphate carboxylase large subunits in the complete absence of small subunit. *J Biol Chem* 1988; **263**: 1213–1219.
- [2] ANWARUZZAMAN, SAWADA S, USUDA H, YOKOTA A. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation by inorganic phosphate through stimulating the binding of the activator CO₂ to activation sites. *Plant Cell Physiol* 1995; **36**(3): 425–433.
- [3] BERRY JA, LORIMER GH, PIERCE J, SEEMANN JR, MEEK J, FREAS S. Isolation, identification, and synthesis of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate, a diurnal regulator of ribulose-bisphosphate carboxylase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 734–738.
- [4] BROWN HR, BOUTON JH. Physiology and genetics of interspecific hybrids between photosynthetic types. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 435–456.
- [5] BYTNIEWSKA K. Karboksylaza/oksygenaza rybulozodwufosforanu. *Post Biochem* 1978; **24**: 333–346.
- [6] CAMPBELL WJ, OGREN WL. Glyoxylate inhibition of ribulosebis-phosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed, and reconstituted chloroplasts. *Photosynth Res* 1990; **23**: 257–268.
- [7] CHASTAIN CJ, OGREN WL. Glyoxylate inhibition of ribulosebis-phosphate carboxylase/oxygenase activation state *in vivo*. *Plant Cell Physiol* 1989; **30** : 937–944.
- [8] CHEN Z, SPREITZER RJ. How various factors influence the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate caboxylase/oxygenase. *Photosynth Res* 1992, **31**: 157–164.
- [9] ELLIS RJ. Molecular chaperones: The plant connection. *Science* 1990; **250**: 954–959.
- [10] EDMONDSON DL, BADGER MR, ANDREWS TJ. Slow inactivation of ribulose bisphosphate carboxylase during catalysis is not due to decarbamylation of catalytic site. *Plant Physiol* 1990; **93**: 1383–1389.
- [11] EDMONDSON DL, BADGER MR, ANDREWS TJ. Slow inactivation of ribulose bisphosphate carboxylase during catalysis caused by accumulation of a slow, tight-binding inhibitor at catalytic site. *Plant Physiol* 1990; **93**: 1390–1397.
- [12] FLUHR R, CHUA N-H. Developmental regulation of two genes encoding ribulose-bisphosphate carboxylase small subunit in pea and transgenic petunia plants: Phytochrome response and blue-light induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**: 2358–2362.
- [13] GATENBY AA, CASTLETON JA, SAUL MW. Expression in *E. coli* of maize and wheat chloroplast genes for large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase. *Nature* 1981, **291**: 117–121.
- [14] GATENBY AA, ELLIS RJ. Chaperone function: the assembly of ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu Rev Cell Biol* 1990; **6**: 125–149.
- [15] GOLOUBINOFF P, GATENBY AA, LORIMER GH. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* 1989; **337**: 44–47.
- [16] GUTTERIDGE S, GATENBY AA. Rubisco synthesis, assembly, mechanism, and regulation. *The Plant Cell* 1995, **7**: 809–819.
- [17] HARTMAN FC, HARPEL MR. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu Rev Biochem* 1994, **63**: 197–234.
- [18] JACOB J, LAWLOR DW. Extreme phosphate deficiency decreases the *in vivo* CO₂/O₂ specificity factor of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in intact leaves of sunflower. *J Exp Bot* 1993; **44**: 1635–1641.
- [19] JORDAN DB, OGREN WL. A sensitive assay procedure for simultaneous determination of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase activity. *Plant Physiol* 1981, **67**: 237–245.

- [20]JORDAN DB, OGREN WL. Species variation in kinetic properties of RuBP carboxylase/oxygenase. *Arch Biochem Biophys* 1983, **227**: 425–433.
- [21]KANIUGA Z. Regulacja włączania CO₂ w procesie fotosyntezy. *Post Biochem* 1976; **22**: 247–305.
- [22]KANIUGA Z. Regulacja fotooddychania. *Zesz Nauk Univ Jagiell* 1977; **464**: 75–86.
- [23]KEYS AJ, MAJOR I, PARRY AJ. Is there another pleyer in the game of rubisco regulation? *J Exp Bot* 1995; **46**: 1245–1251.
- [24]KLECZKOWSKI L. "Aktywaza" karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-difosforanu i fosforan karboksyarabinitolu – klucze do rozumienia mechanizmu regulacji fotosyntezy? *Post Biochem* 1987; **33**: 629–633.
- [25]KLECZKOWSKI LA, ŁOBODA T, NALBORCZYK E. Pomiarzy fotooddychania u roślin wyższych. *Wiad Bot* 1988; **32**: 227–240.
- [26]KNIGHT S, ANDERSSON I, BRÄNDEN CI. Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 1990; **215**: 113–160.
- [27]LARCHER W. Physiological plant ecology. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1980.
- [28]MALESZEWSKI S. Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu – kluczowy enzym fotosyntezy i fotooddychania. *Post Biol Kom* 1988; **15**(3): 233–254.
- [29]MALESZEWSKI S, BYSTRZEJEWSKA G. Czynniki biofizyczne i biochemiczne warunkujące produktywność roślin. *Post Biol Kom* 1981; **8**(3): 211–225.
- [30]MALESZEWSKI S, KAMIŃSKA Z. Działanie tlenu w fotosyntetycznym metabolizmie węgla. *Post Biochem* 1884; **30**: 317–334.
- [31]MALESZEWSKI S, KOZŁOWSKA B. Czy fotooddychanie jest "marnotrawnym" procesem biologicznym? *Kosmos* 1995; **44**(3–4): 653–668.
- [32]MATE CJ, von CAEMMERER S, EVANS JR, HUDSON GS, ANDREWS TJ. The relationship between CO₂-assimilation rate, Rubisco carbamylation and Rubisco activase content in activase-deficient transgenic tobacco suggest a simple mode of activase action. *Planta* 1996; **198**: 604–613.
- [33]OGREN WL. Photorespiration: Pathways, regulation, and modification. *Ann Rev Plant Physiol* 1984, **35**: 415–442.
- [34]PERCHOROWICZ JT, RAYNES DA, JENSEN RG. Light limitation of photosynthesis and activation of ribulose bisphosphate carboxylase in wheat seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 2985–2989.
- [35]POSKUTA J. Fotooddychanie u roślin. *Wiadom Bot* 1970; **14**: 43–54.
- [36]POSKUTA J. Zależność pomiędzy fotosyntezą i oddychaniem u roślin. *Wiadom Bot* 1992; **36**: 7–52.
- [37]PORTIS ARJr. Rubisco activase. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1015**: 15–28.
- [38]PORTIS ARJr. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1992; **43**: 415–437.
- [39]PORTIS ARJr. The regulation of rubisco by rubisco activase. *J Exp Bot* 1995; **46**: 1285–1291.
- [40]ROBINSON SP, PORTIS ARJr. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase activase protein prevents the *in vitro* decline in activity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol* 1989; **90**: 968–971.
- [41]SALVUCCI ME. Regulation of rubisco activity *in vivo*. *Physiol Plant* 1989; **77**: 164–171.
- [42]SALVUCCI ME, OGREN WL. The mechanism of rubisco activase: Insights from studies of the properties and structure of enzyme. *Photosynth Res* 1996; **47**: 1–11.
- [43]SALVUCCI ME, PORTIS ARJr OGREN WL. A soluble chloroplasts protein catalyzes ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation *in vivo*. *Photosynth Res* 1985; **7**: 193–201.

- [44]SAWADA S, USUDA H, TSUKUIT T. Participation of inorganic orthophosphate in regulation of the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylate activity in response to changes in the photosynthetic source-sink balance. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 943–949.
- [45]SHARKEY TD. Feedback limitations of photosynthesis and the physiological role of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase carbamylation. *Bot Mag Tokyo Special Issue* 1990; **2**: 87–105.
- [46]SCHNEIDER G, LINDQVIST Y, BRÄNDEN CI. Rubisco: structure and mechanism. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992; **21**: 119–143.
- [47]SEEMANN JR, BERRY JA, FREAS SM, KRUMP MA. Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity *in vivo* by a light-modulated inhibitor of catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; **82**: 8024–8028.
- [48]SEEMANN JR, KOBZA J, MOORE B. Metabolism of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate and regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activity. *Photosynth Res* 1990; **23**: 119–130.
- [49]SERVAITES JC, GEIGER DR. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by metabolites. *J Exp Bot* 1995; **46**: 1277–1283.
- [50]SPREITZER RJ. Genetic dissection of Rubisco structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 411–434.
- [51]SPREITZER RJ, THOW G, ZHU G. Pseudoreversion substitution at large-subunit residue 54 influences the CO₂/O₂ specificity of chloroplast ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol* 1995; **109**: 681–685.
- [52]TOBIN EM, SILVERTHORNE J. Light regulation of gene expression in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 1985; **36**: 569–593.
- [53]WILDNER GF, SCHLITZER J, MÜLLER M. Rubisco, and old challenge with new perspectives. *Z Naturforsch* 1996, **51c**: 263–276.
- [54]WOODROW IE, BERRY JA. Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1988; **39**: 533–594.
- [55]ZHU G, JENSEN RG. Fallover of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. Decarbamylation of catalytic sites depends on pH. *Plant Physiol* 1991; **97**: 1354–1358.

Redaktor prowadzący – Szczepan Biliński

Otrzymano: 14.11.1996 r.

Przyjęto: 20.03.1997 r.

15-950 Białystok, ul. Świerkowa 20b

KOMUNIKATY

Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1996 i 1997, za wyróżniającą się oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content bądź Medline.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 34-03-44, fax 3404470

Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

- * 1. Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- * 2. Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- * 3. Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- * 4. Preferowane będą prace młodych autorów.
- * 5. Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- * 6. Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- * 7. Pracę należy zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- * 8. Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- * 9. Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postęпах Biologii Komórki".
- * 10. Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwalana zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Zamawianie odbitek prac przez Autorów

Autorzy, którzy chcą otrzymać odbitki swoich artykułów, są proszeni o **przesłanie zamówienia wraz z korektą pracy.**

Cennik odbitek prac dla Autorów

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

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. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

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) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) 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. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach i rysunków na dyskietce (wskazówki na s. 400) przyspieszy publikację. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy 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, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (*Index Medicus*), o ile są tam zawarte. 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 ówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. 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 zestawiać 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 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 doby. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik na s. 400. Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,

tabel i rycin.

tak

nie

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została wysłana do innej redakcji.

tak

nie

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.

tak

nie

Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM

tak

nie

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-

Odповідаć za całość pracy opisanej w zał. maszyn.

tak

nie

kowane są zamieszczone w tekście artykułu

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpis

TREŚĆ

W tym Zeszyście	301
ŻBIKOWSKA H. M.: Metabolizm selenu w komórce i organizmie człowieka	303
ŻBIKOWSKA H. M.: Antykarcynogenne działanie selenu	315
WIDŁAK P.: Struktura nukleosomowa chromatyny a naprawa DNA	325
FERTAK A., KILARSKI W.: Połączenia szczelinowe	339
HELEWSKI K., KOWALCZYK-ZIOMEK G., KONECKI J., GŁOWACKA M.: Białka surfaktantu	375
MALESZEWSKI S., KOZŁOWSKA-SZERENOS B.: Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu – Kluczowy enzym fotosyntezy i fotooddychania – Ostatnia dekada badań	387
Komunikaty	399
Wskazówki przygotowania rysunków	400

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1998

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1998 na konto:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka
99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1998:
dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1998 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705