

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTĘPY 35 (3)
(200-424) (1989)

1989

tom 35 nr 3

PL ISSN 0032-5422



Pw^o

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

Wskazówki dla autorów

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

Prace przeznaczone do publikacji w *Postęпах Biochemii* mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu nie licząc piśmiennictwa i ilustracji), minirewies (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu). Prace monograficzne należy opierać na możliwie pełnym piśmiennictwie przedmiotu, cytując jednak tylko oryginalne prace z ostatnich kilku lat, starsze zaś wskazując pośrednio poprzez odpowiednio dobrane prace przeglądowe z uwzględnieniem artykułów ogłoszonych wcześniej w naszym kwartalniku; minirewies i noty wystarczy oprzeć na piśmiennictwie przykładowo wybranym. Cytowanie nazwisk należy ograniczyć, wskazując jedynie badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace numeruje się w kolejności ich cytowania, a w tekście zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26].

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

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

Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w *Postęпах Biochemii*. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk. Autorów obowiązuje **korekta autorska**. Poprawki wynikające z winy drukarni nanosi się ołówkiem zwykłym, niezbędne poprawki autorskie niebieskim atramentem lub długopisem. Koszty zmian tekstu

w korekcie ponoszą Autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 25 odbitek swego artykułu.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Zgodnie z wymogami Państwowego Wydawnictwa Naukowego, maszynopis powinien być napisany jednostronnie, czcionką wielkości standardowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm i prawym ok. 1 cm, z 30 wierszami na stronie i 60 znakami w wierszu (litery + odstępy), odstępy pomiędzy wyrazami powinny odpowiadać jednemu znakowi. Wydawnictwo nie przyjmuje wydruków komputerowych z czcionką obcą, drobną i sporządzoną linią punktową. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polski i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji, adresy prywatne autorów, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrót tytułu pracy.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 35 ZESZYT 3

1989

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

POSTBAH 35 (3)
(200-424) (1989)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: M. Gumińska (*Kraków*)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (*Warszawa*)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (*Warszawa*)

Członkowie: T. Chojnacki (*Warszawa*), M. Chorąży (*Gliwice*), M. Fikus (*Warszawa*), E. Gąsior (*Lublin*), W. Jachymczyk (*Warszawa*), A. Jerzmanowski (*Warszawa*), W. Korohoda (*Kraków*), W. J. Krzyżosiak (*Poznań*), J. Kwiatkowska (*Wrocław*), J. Kączkowski (*Warszawa*), E. Lisowska (*Wrocław*), S. Maleszewski (*Warszawa*), G. Palamarczyk (*Warszawa*), K. Raczyńska-Bojanowska (*Warszawa*), I. Siemion (*Wrocław*), L. Wojtczak (*Warszawa*), B. Wielgat (*Warszawa*), A. Taylor (*Gdynia*), J. Zborowski (*Warszawa*), Z. Zielińska (*Warszawa*)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ZASTĘPCY REDAKTORA NACZELNEGO

G. Palamarczyk

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

A. Jerzmanowski

Instytut Biochemii UW
ul. Żwirki i Wigury 93, 02-809 Warszawa

SEKRETARZ REDAKCJI

M. Szyszko

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

CZŁONKOWIE REDAKCJI

B. Czartoryska (*Warszawa*), M. Garstka (*Warszawa*)

B. Kamińska (*Warszawa*), J. Skangiel-Kramska (*Warszawa*)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1989

Nakład 1700 (1608 + 92)	Oddano do składania 14.IV.1989 r.
Ark. wyd. 19,0, ark. druk. 14,0	Podpisano do druku w grudniu 1989 r.
Papier offset. kl. III, 70 g 70 × 100	Druk ukończono w kwietniu 1990 r.
Zam. nr 390/12/89	Cena zł 240,--

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



PROFESOR BRONISŁAW FILIPOWICZ
1904-1988

16 sierpnia 1988 roku zmarł Bronisław Filipowicz, profesor i doktor honoris causa Akademii Medycznej w Łodzi, członek honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, nauczyciel i wychowawca licznych pokoleń lekarzy, uczony i popularyzator biologii współczesnej, w czasie wojny żołnierz Polski Podziemnej.

Bronisław Filipowicz urodził się w Warcie koło Sieradza 19 lipca 1904 roku w rodzinie robotniczej. Lata młodzieńcze spędził w Krotoszynie uczęszczając do Gimnazjum im. Hugo Kołłątaja. Z tych trudnych pod względem materialnym czasów, gdy utrzymywał się – tak, jak i w okresie studiów – z korepetycji, wyniósł też barwne wspomnienia. Działal w harcerstwie, współorganizował i grał w teatrze szkolnym – tytułową rolę w „Panu Jowialskim” Fredry zaliczał do osiągnięć, z których był szczególnie dumny. Szkołę średnią ukończył w roku 1925, a następnie w roku 1930 studia chemii na Uniwersytecie Warszawskim. Już przed ich ukończeniem podjął pracę w Zakładzie Chemii Fizjologicznej UW pod kierunkiem prof. Stanisława Przyłęckiego, a w roku 1931 opublikował swą pierwszą pracę pt. „Influence of proteins and protein derivatives on the enzymic hydrolysis of starch by malt diastase” (Biochem. J., 25, str 1874). W roku 1933 obronił na Uniwersytecie Warszawskim pracę doktorską na ten temat. W następnych latach publikuje wspólnie z prof. Przyłęckim dalsze prace o tej tematyce w Biochemische Zeitschrift.

W czasie okupacji Profesor Filipowicz podejmuje dorywcze zajęcia. Jednocześnie w r. 1940 pod pseudonimem „Ochocki” wstępuje do Tajnej Organizacji Wojskowej, włączonej później do Armii Krajowej. W laboratorium uniwersyteckim i różnych improwizowanych pracowniach gromadzi niezbędne chemikalia, produkuje materiały wybuchowe, zapalniki, granaty i trucizny. Był podwładnym Józefa Skarżyńskiego (pseudonim „Jerzy”), odtąd swego współpracownika i przyjaciela. W szeregach zgrupowania „Radosław” brał udział w Powstaniu Warszawskim. Uzyskuje kolejno stopień podporucznika, a później porucznika zostaje odznaczony złotym Krzyżem Zasługi z Mieczami i Krzyżem Walecznych.

Po wojnie przenosi się do Łodzi, której pozostanie wierny do końca życia. W 1945 roku podejmuje pracę w Zakładzie Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Łódzkiego kierowanym początkowo przez prof. Ernesta Syma, a następnie przez prof. Antoniego Dmochowskiego. Były to pionierskie lata przesyconej trudem improwizacji – w ciężkich warunkach w zdewastowanym kraju tworzono nowe uczelnie i laboratoria naukowe. Bronisław Filipowicz prowadzi ćwiczenia i wykłady, opracowuje pierwsze powojenne skrypty i podręczniki. W 1949 roku przejmuje obowiązki kierownika Katedry Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Łódzkiego, a po reorganizacji – Akademii Medycznej w Łodzi. Jednocześnie przez kilka lat kieruje Zakładem

Chemii Fizjologicznej powstającej w Łodzi Wojskowej Akademii Medycznej. W roku 1954 uzyskuje tytuł profesora nadzwyczajnego, a w roku 1965 – profesora zwyczajnego.

Zainteresowania naukowe i prace badawcze Profesora Filipowicza i Jego zespołu koncentrują się wokół przemiany węglowodanowej oraz biochemii kwasów nukleinowych, przy czym ta ostatnia problematyka pozostała trwale zaszczerpiona w tradycji kierowanych przezeń Zakładów. Lista publikacji Profesora Bronisława Filipowicza obejmuje około stu pięćdziesięciu pozycji stanowiących indywidualny jego dorobek i wykonanych ze współpracownikami. Są wśród nich prace doświadczalne, są prace przeglądowe o różnorodnej tematyce biochemii świadczące o rozległości zainteresowań Profesora.

W Jego dorobku na szczególne wyróżnienie zasługują podręczniki oraz książki i artykuły popularno-naukowe. Dwutomowy podręcznik biochemii, opracowany wspólnie z Władysławem Więckowskim, doczekał się szeregu wydań. Książki takie jak: „Głód utajony” „Hormony, eliksiry życia”, „Z tajemnic biochemii”, czy „Chemia i życie”, oraz liczne artykuły dały Profesorowi Filipowiczowi zasłużony rozgłos popularyzatora biochemii współczesnej, poświadczony nagrodą miesięcznika „Problemy”. Była to także ta część działalności, która obok kontaktów z ludźmi, dawała mu najwięcej radości i satysfakcji.

Dorobek naukowy Profesora obejmuje także ponad dwadzieścia zakończonych pod Jego kierunkiem przewodów doktorskich. Był on także opiekunem kilku przewodów habilitacyjnych, a usamodzielnieni w jego Katedrze nauczyciele akademicy kierują zakładami naukowymi w naszej i innych uczelniach. Prowadził ruchliwy tryb życia. Często zapraszany był do recenzowania rozpraw doktorskich i habilitacyjnych. Opracował łącznie z wnioskami o nadanie tytułów profesora ponad dwieście recenzji.

Profesor Filipowicz pełnił szereg funkcji w Uczelni. Był m.in. prodziekanem Wydziału Lekarskiego. Dowodami uznania Jego pracy i działalności są liczne odznaczenia i nagrody. Profesor Filipowicz odznaczony został m.in. Krzyżem Komandorskim i Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, Medalem Komisji Edukacji Narodowej i Krzyżem Partyzanckim. W roku 1984 Uczelnia przyznaje Profesorowi najwyższe swe wyróżnienie, godność doktora honoris causa.

Równie żywa i ceniona jest działalność Profesora Filipowicza poza Uczelnią. Profesor Bronisław Filipowicz był członkiem – założycielem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz drugim, po prof. Bolesławie Skarżyńskim Prezesem Towarzystwa w latach 1961-63. Był również współzałożycielem łódzkiego oddziału Towarzystwa. Jako Prezes Towarzystwa i jako Przewodniczący Komitetu Naukowego Profesor Filipowicz organizował w Łodzi we wrześniu 1963 r. I Krajowy Kongres Biochemii, pierwsze spotkanie grupujące liczne grono tak biochemików jak i ludzi pracujących w dziedzinach pokrewnych. Spotkanie to miało duże znaczenie dla integracji środowiska i przyczyniło się do upowszechnienia tradycji corocznych zjazdów o różnorodnej problematyce naukowej. Profesor Filipowicz był również Przewodniczącym Rady Redakcyjnej organu

Towarzystwa, kwartalnika *Postępy Biochemii*. Polskie Towarzystwo Biochemiczne w dowód uznania obdarzyło Profesora godnością członka honorowego.

Był również czynnym członkiem szeregu innych krajowych organizacji naukowych. Przez wiele lat był członkiem Komitetu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Był członkiem Biochemical Society.

Przejście Profesora na emeryturę w roku 1974 nie odrazu przerwało jego aktywność naukową. Nadal pisał, recenzował prace, uczęszczał w życiu macierzystej placówki.

Zawsze, ale może szczególnie w tych ostatnich latach, gdy zaczynało mu brakować sił do własnej pracy, czerpał właściwą każdemu dobremu nauczycielowi szlachetną radość z sukcesów swych uczniów i mocno przeżywał ich niepowodzenia. Zawsze cechowały go wierność zawartym przyjaźniom, pogoda ducha i poczucie humoru, które jednały mu serca i otwierały drzwi wielu pracowni także i poza granicami kraju. Dzięki jego życzliwej zapobiegliwości otwierały się drzwi laboratoriów zagranicznych pierwszej rangi przed Jego wychowankami.

Ostatnie lata nie wolne były od refleksji nad własnymi dokonaniem. Wdzięcznie przyjmował wyrazy uznania, jakich mu nie szczędzono. Zdarzało się, przecież, wyznawał, że Jemu i wielu z Jego pokolenia przyszło zastąpić tych, lepszych i zdolniejszych, których wojna wyrwała z szeregu. Było w tym sporo pokory, potrosze i autoironii, tej cennej cechy charakteru co skutecznie broni przed śmiesznością. Było też pewno i trochę bezwiednej kokieterii.

Z tą swoją życzliwością i pogodą ducha pozostaje w naszej pamięci.

Uczniowie

Od redakcji

Bieżący zeszyt *Postępów Biochemii* zawiera artykuły stanowiące rozwinięcie referatów przedstawionych na konferencji n.t.: „Regulacyjne funkcje fosforylacji białek”, która odbyła się w Lublinie w dn. 14 i 15 czerwca 1988. Sprawozdanie z konferencji kończy materiały konferencji.

SŁOWNICTWO

Klasyfikacja kinaz białkowych wyższych Eukaryota – wskazania doraźne

An ad hoc classification of the protein Kinases of higher Eukaryotes

A. Kinazy białkowe serynowo/treoninowe

I. Kinazy białkowe zależne od cyklicznych nukleotydów

1. Kinazy białkowe A, zależne od cAMP (typ I i II)

2. Kinazy G, zależne od cGMP

II. Kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} i kalmoduliny (Ca/CM) w tym: kinaza fosforylazy, kinazy lekkiego łańcucha miozyny, tzw. kinaza typu II i inne

III. Kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} i fosfolipidów, w tym: kinazy białkowe C

IV. Kinazy białkowe o innym (bądź nieznanym) sposobie regulacji,

w tym: – kinaza białkowa zależna od dwuniciowego RNA,

– kinaza białkowa indukowana w lizatach retikulocytów w nieobecności hemu,

– kinazy kazeinowe, typ I i typ II,

– kinaza białka rybosomowego S 6,

– kinaza syntazy glikogenu 3,

– kinaza dehydrogenazy pirogronianowej itp.

B. Kinazy białkowe tyrozynowe

I. Kinazy retrowirusów i ich komórkowe homologi, w tym m.in.:

– kinazy kodowane przez gen *src* wirusa mięsaka Rousa (szczep ptasi) oraz *c-src*,

– kinazy kodowane przez gen *abl* wirusa leukemii Abelsona (szczep myszy) oraz *c-abl*,

– kinazy kodowane przez gen *fes* wirusa mięsaka Snyder-Theilena (szczep koci) oraz *c-fes*,

II. Kinazy receptorów czynników wzrostowych, w tym: receptora EGF – naskórkowego czynnika wzrostowego,

receptora PDGF – czynnika wzrostowego z płytek krwi, receptora insuliny i inne.

Proponowaną klasyfikację przekonsultowano z przedstawicielami Komisji Słownictwa Biochemicznego P.T.Bioch. Klasyfikacja wyróżnia dwie grupy kinaz białkowych w zależności od rodzaju fosforylowanego aminokwasu. Są to: A. kinazy serynowo-treoninowe i B. kinazy tyrozynowe. W grupie A umieszczono szereg klas kinaz różniących się sposobami i mechanizmami regulacji ich aktywności enzy-

matycznej. W grupie B natomiast wydzielono dwie klasy kinaz: I – kinazy kodowane przez onkogeny wirusowe i ich komórkowe homologi, II – kinazy receptorów czynników wzrostowych. W tabeli umieszczono jedynie enzymy względnie dobrze scharakteryzowane. Z klasyfikacji wyłączona została grupa kinaz histydynowo-lizynowych ze względu na brak charakterystyki któregośkolwiek enzymu należącego do tej grupy. Tabela nie zawiera również informacji o właściwościach poszczególnych grup i klas kinaz. Informacje takie znajdzie czytelnik w artykułach niniejszego numeru *Postępów Biochemii* oraz w artykułach przeglądowych [1–3].

PIŚMIENNICTWO:

1. Hunter T., Cooper J. A. (1955), *Ann. Rev. Biochem.*, **5**, 897–930.
2. Hunter T., (1987), *Cell*, **50**, 823–829.
3. Edelman A.M., Blumenthal D. K., Krebs E. G., (1987), *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 567–617.

ARTYKUŁY

EUGENIUSZ GĄSIOR*

Kinazy białkowe, strukturalne i funkcjonalne podobieństwa i różnice

Protein kinases, structural and functional similarities and differences

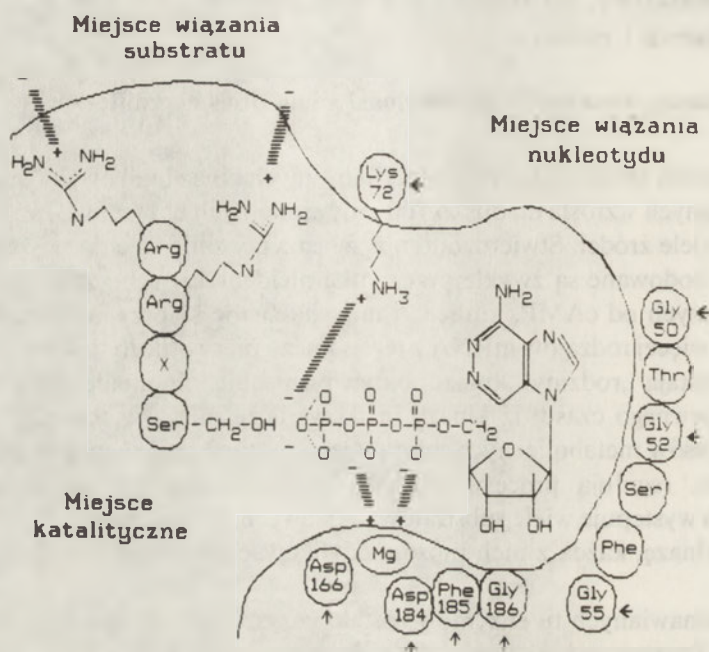
W ostatnich 10 latach liczba zidentyfikowanych kinaz białkowych organizmów eukariotycznych wzrosła do blisko 100 indywidualnych enzymów. Ta „mnogość” kinaz ma wiele źródeł. Stwierdzono np., że enzymy zaliczane do poszczególnych klas kinaz kodowane są zwykle przez kilka nieidentycznych genów. Dotyczy to kinaz zależnych od cAMP, kinaz C i innych. Znane są przypadki powstawania dwóch lub więcej rodzajów mRNA z tego samego pierwotnego transkryptu. W ten sposób powstają „rodziny” kinaz, pokrewnych sobie, ale nieidentycznych. Wiadomo od pewnego czasu, iż kinazy białkowe uczestniczą w regulacji ogromnej liczby procesów metabolicznych, biorą udział w transmisji sygnałów przez błony komórkowe, regulują procesy wzrostu i różnicowania się komórek [1]. W komórkach występuje wiele substratów białkowych fosforylowanych przez więcej niż jedną kinazę, każda z nich może modyfikować określone miejsca w substracie.

Wiele omawianych tu enzymów zostało oczyszczonych i dobrze scharakteryzowanych. Poznano też sekwencję aminokwasową niektórych z nich, co pozwoliło na badania porównawcze struktury pierwszorzędowej różnych kinaz białkowych. Początki tych badań przyniosły wyniki nieoczekiwane. Stwierdzono bowiem, że podjednostka katalityczna kinazy białkowej A i kinaza tyrozynowa, produkt genu *v-src*, wykazują wysoki stopień homologii w sekwencji aminokwasowej zawierającej blisko 300 aminokwasów [2]. Późniejsze prace potwierdziły te obserwacje i pozwoliły na sformułowanie, nie podważanego dziś poglądu, że wszystkie eukariotyczne kinazy białkowe zawierają pewne homologiczne regiony. Stanowią one centra katalityczne tych enzymów i mogą świadczyć, że kinazy białkowe pochodzą od wspólnego prapłodu.

Wykorzystując różne techniki dla charakterystyki centrów aktywnych kinaz zidentyfikowano szereg aminokwasów, których obecność jest niezbędna dla zachowania aktywności enzymów. W przypadku podjednostki katalitycznej kinazy A takim niezbędnym aminokwasem okazała się lizyna w pozycji 72 łańcucha polipeptydowego: a także triada glicyn w pozycjach 50, 52, 55, dwie

* Prof. dr hab. Eugeniusz Gąsior, Zakład Biochemii Molekularnej, UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

sekwencje trójpeptydowe o składzie: Asp - Phe -Gly i Ala - Pro -Glu, oraz Asp w pozycji 166 (Ryc. 1). Mimo wyraźnego podobieństwa centrów aktywnych kinaz serynowo/treoninowych i kinaz tyrozynowych u tych ostatnich wyróżniono dodatkowe sekwencje. Jedna z nich zawierająca tyrozynę ulegającą autofosforylacji zlokalizowana została pomiędzy wymienionymi wyżej dwoma trójpeptydami [1]. Inną charakterystyczną sekwencją centrum katalicznego kinaz tyrozynowych jest heksapeptyd o składzie: Asp -Val - Trp - Ser - Phe - Gly [4].



Ryc. 1. Hipotetyczna struktura miejsca aktywnego w podjednostce katalicznej kinazy A według Taylor [3,5] – zmodyfikowane. Strzałkami oznaczono aminokwasy występujące w regionach katalicznych wszystkich kinaz białkowych.

Z dotychczasowych informacji wynika, że większość aminokwasów wspólnych dla domen katalicznych kinaz wchodzi w skład miejsca wiążącego ATP. Mg (Ryc. 1). Sądzi się na przykład, że reszty glicynowe zapewniają geometrię zgięcia fragmentu łańcucha tworzącego „kieszę” z ulokowanym w niej miejscem wiązania nukleotydu [3]. Istnieją dane wskazujące na udział reszt kwasu asparaginowego w wiązaniu $\text{ATP} \cdot \text{Mg}^{2+}$ poprzez mostki magnezowe [3,5].

Niewiele wiadomo dotąd o miejscu katalicznym kinaz, które formuje się prawdopodobnie dopiero po przyłączeniu $\text{ATP} \cdot \text{Mg}^{2+}$. Postulowany jest udział bliżej niezidentyfikowanych grup nukleofilowych centrum katalicznego w aktywowaniu tlenu, który staje się w następstwie akceptorem reszty fosforanowej. Być może w katalizie uczestniczą bezpośrednio dwie reszty kwasu asparaginowego znajdujące się w miejscu wiązania nukleotydu (Ryc. 1).

Nieco więcej danych zebrano na temat swoistości miejsc rozpoznanych przez

kinazy w substratach białkowych. Swoistość miejsc fosforytowanych jest jednym z czynników, które różnią poszczególne kinazy czy rodziny kinaz między sobą. W badaniach wykorzystane są naturalne substraty komórkowe oraz, obecnie coraz częściej, syntetyczne oligopeptydy odpowiadające sekwencjom fosforylowanym w naturalnych substratach [6,7]. Nierzadko o fosforylacji odpowiedniego miejsca w substracie decyduje nie tylko I-rzędowa struktura polipeptydu, ale sposób jego pofałdowania. Specyficzność fosforylacji zależy może także od lokalizacji w komórce [7]. Tabela 1 przedstawia przykłady swoistych miejsc rozpoznawanych przez różne kinazy białkowe.

Tabela 1

Strukturalne determinanty miejsc rozpoznawanych przez kinazy białkowe. S. P (fosfoseryna) w poz. 3 polipeptydu rozpoznawana jest jako aminokwas kwaśny przez kinazę kazeinową II. D = Asp, E = Glu, K = Lys, R = Arg, S = Ser, Y = Tyr, X = dowolny aminokwas, P = fosforan. Miejsce fosforylacji podkreślono

Kinaza białkowa	Wymagane minimum struktury I-rzędowej polipeptydu	Inne dane
Kinaza A Kinaza G	-R(K)-R-X- <u>S(T)</u> -X -R.....- <u>S(T)</u> -R	Fosforyluje miejsca rozpoznawane przez kinazę A
Kinaza kazeinowa II	- <u>S(T)</u> X ₀₋₂ -(E,D,S-P) _{n=3}	Kwaśne reszty aminokwasowe w poz. n = 4 i n = 5 obniżają Km dla substratu fosforylowanego
Kinaza C nieaktywowana Kinaza C + Ca ²⁺ + fosfolipid Kinazy tyrozynowe	-R _n -X-X- <u>S(T)</u> -X-R _n - -R _n -X-X- <u>S(T)</u> - <u>S(T)</u> -X-R _n - -E(D)-X-X-X-Y- ?	n = 2-4 Fosforyluje miejsca rozpoznawane przez kinazę A Obserwowana jest duża różnorodność miejsc fosforylacji

Wydaje się pewne, że struktura centrum rozpoznającego odpowiednie miejsce w substracie będzie odmienna w poszczególnych przypadkach. Tak np. w przypadku kinazy białkowej A dwa aminokwasy, Thr₁₉₇ i Cys₁₉₉ zlokalizowane w podjednostce katalitycznej enzymu zdają się uczestniczyć w rozpoznawaniu miejsca fosforylacji [8].

O odmienności strukturalnej różnych klas kinaz białkowych decydują przede wszystkim ich regiony regulatorowe. Są one miejscem przyłączenia swoistych efektorów czy ligandów regulujących aktywność kinaz, a w wielu przypadkach determinują także lokalizację komórkową tych enzymów.

Badania nad regionami regulatorowymi kinaz, w tym też nad charakterystyką i lokalizacją miejsc przyłączenia efektorów, zostały w ostatnich latach poważnie zaawansowane. Podobnie jak w przypadku podjednostki katalitycznej kinazy A także podjednostki regulatorowe R_I i R_{II} tego enzymu zostały dobrze scharakteryzowane. Poznano strukturę miejsc wiążących cAMP, fragmenty N-końcowe podjednostek odpowiedzialnych za dimeryzację, miejsce ulegające autofosforylacji

w podjednostce R^{II}, czy wreszcie miejsce przyłączenia podjednostki katalitycznej. Stwierdzono, że region regulatorowy kinazy białkowej G i podjednostki regulatorowe kinazy A zawierają sekwencje homologiczne. Pomimo tego struktura cząsteczki kinazy G różni się wyraźnie od struktury kinaz A. Wykazano bowiem, że oba regiony, katalityczny i regulatorowy, kinazy zależnej od cGMP znajdują się w jednym łańcuchu polipeptydowym. Aktywacja enzymu przez cykliczny nukleotyd związana jest ze zmianami konformacyjnymi cząsteczki kinazy, a nie z oddysocjowaniem fragmentu regulatorowego. Podobnie jednak jak kinaza A także kinaza G może ulegać dimeryzacji.

Ostatnie badania dostarczyły wielu nowych informacji dotyczących regionów regulatorowych kinaz C [9], receptora naskórkowego czynnika wzrostowego [3, 7], czy kinaz kodowanych przez wirusowe i komórkowe onkogeny [10]. Warto podkreślić, że w szeregu kinaz tyrozynowych kodowanych przez onkogeny wykryto ostatnio [10] obecność 3 konserwatywnych domen zlokalizowanych w regionach regulatorowych tych enzymów. Takie same domeny stwierdzono w fosfolipazie C, enzymie swoistym dla fosfatydylo-inozytydów, katalizującym powstanie trójfosforanu inozytolu i diacyloglicerolu. Świadczyć to może o wspólnym błonowym mechanizmie regulacji aktywności różnych enzymów stanowiących elementy składowe układu przekazywania sygnałów do komórki.

W tym kontekście warto wspomnieć o kinazach białkowych Prokaryota. Przez długi czas możliwość fosforylacji białek bakteryjnych była kwestionowana. Dopiero na początku lat osiemdziesiątych wykazano ponad wszelką wątpliwość, że wiele bakteryjnych białek ulega fosforylacji [11, 12]. Obecnie wiadomo, że fosforylacja zachodzi u bakterii właściwych Gram⁺ i Gram⁻, oraz u archebakterii [12]. Fosfoproteiny bakteryjne zawierają zmodyfikowane reszty serynowe i treoninowe. Prokariotyczne kinazy białkowe kodowane są przez genom bakteryjny niektórych fągów, między innymi T₃ i T₇ oraz T₄ [12, 16]. Spośród ponad 100 białek ulegających fosforylacji [12] jedynie kilka substratów zostało dotąd zidentyfikowanych. Do nich należą m.in.: dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od NADP [17, 18], produkt genu *dna K* [19], białko HPr systemu transportującego cukry [15] u bakterii (fosforylowane w reszcie histydyny a także seryny) oraz białka uczestniczące w chemotaksji u *E.coli* [16]. Dehydrogenaza izocytrynianowa jest kluczowym enzymem cyklu Krebsa. W doświadczeniach nad adaptacją *E.coli* oraz *Salmonella typhimurium* do wzrostu na octanie, jako jedynym źródle węgla w podłożu, zaobserwowano, iż aktywność tego enzymu stopniowo spada. Jednocześnie następuje indukcja nowych enzymów, liazy izocytrynianowej i syntazy jableczanowej, odpowiedzialnych za metabolizm izocytrynianu w cyklu glioksalowym. Bliższa analiza procesu wspomnianej adaptacji wykazała, że równolegle z syntezą enzymów cyklu glioksalowego pojawia się enzym fosforylujący dehydrogenazę izocytrynianu zależną od NADP. Fosforylacja dehydrogenazy powoduje zahamowanie jej aktywności, co z kolei umożliwia przejście izocytrynianu z cyklu Krebsa do cyklu glioksalowego. Zamiana octanu na glukozę w podłożu pozwala na szybkie odwrócenie tego procesu. Geny kodujące enzymy cyklu glioksalowego i enzym fosforylujący dehydrogenazę mieszczą się w tym samym operonie „ace” i

znajdują się pod wspólną kontrolą [20]. Enzym fosforylujący został już wyizolowany i scharakteryzowany. Okazało się, że cechuje go jednocześnie aktywność kinazy białkowej i fosfatazy białkowej. Obie aktywności zlokalizowano w jednej domenie łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 66 000 [17, 18]. Tę niezwykle właściwość kinazy/fosfatazy uwydatniają jeszcze dodatkowe obserwacje wskazujące, że dla aktywności niezbędne są ATP lub ADP oraz że białko to katalizuje reakcję ATP-azową. Co więcej, aktywność ATP-azowa jest wyraźnie wyższa niż mierzone niezależnie aktywność kinazowa czy fosfatazowa. Wy tłumaczenie zaobserwowanych właściwości wielofunkcyjnego enzymu nie jest łatwe. Przypuszcza się, że aktywność fosfatazowa enzymu jest wynikiem odwracalności reakcji kinazowej, ściśle sprzężonej z hydrolizą ATP. Jeśli tak, to proces defosforylacji dla swojego przebiegu wymagałby utworzenia kompleksu potrójnego zawierającego wielofunkcyjną kinazę/fosfatazę, ufosforylowaną dehydrogenazę izocytrynianową (substrat) i ATP. Fosforan zaś przenoszony byłby z ufosforylowanego substratu na ADP (odwrócenie reakcji kinazowej) a następnie na H₂O (reakcja ATP-azowa). Sugerowany mechanizm jest w dużej mierze spekulatywny i wymaga weryfikacji doświadczalnej. Gen *ace K* kodujący kinazę/fosfatazę dehydrogenazy izocytrynianowej został ostatnio sklonowany i zsekwencjonowany [20].

Druga zidentyfikowana fosfoproteina bakteryjna to produkt genu *dna K*. Warto podkreślić, że jest to białko szoku cieplnego (ang. heat shock protein-hsp) zaliczane do grupy Hsp 70 (o względnej masie cząsteczkowej w granicach 68 000 do 74 000) i charakteryzuje się wysokim procentem homologii z eukariotycznymi hsp zaliczanymi do tej grupy. Z doświadczeń nad mutantami genu *dna K* wynika, że białko to uczestniczy w replikacji faga λ oraz w konwersji jednoniciowego DNA faga M13 w jego dwuniciową, replikatywną formę. Funkcja białka *dna K* w niezakażonej komórce bakteryjnej nie została określona, choć wydaje się być inna od wspomnianej funkcji stymulatora replikacji fagowego DNA. Szereg obserwacji wskazuje, że białko to jest istotne dla wzrostu bakterii, przynajmniej w podwyższonej (stresowej) temperaturze.

Białko *dna K* jest wykrywane w komórkach *E. coli* znajdujących się w logarytmicznej fazie wzrostu jako częściowo ufosforylowane. Wysoce oczyszczone preparaty białkowe łatwo ulegają *in vitro* autofosforylacji w resztach teroninowych. Wydaje się, że autofosforylacja białka *dna K* nie jest wynikiem zanieczyszczenia preparatu bakteryjną fosfokinazą. Można przypuszczać, że samo białko wykazuje właściwości fosfokinazy. Nie ma żadnych danych co do aktywności fosfatazowej samego białka *dna K* czy też obecności w komórkach bakteryjnych odrębnej fosfatazy fosfobiałkowej. Oczyszczone białko *dna K* cechuje słaba aktywność ATP-azowa, co upodabnia je nieco do kinazy/fosfatazy dehydrogenazy izocytrynianowej. Nieoczekiwanie, aktywność ATP-azowa białka *dna K* jest niezależna od DNA mimo jego uczestnictwa w replikacji fagowego DNA. Aktywność ATP-azową, zależną od DNA, wykazują inne białka związane z procesem replikacji DNA jak: białko *dna B*, białko *m*, helikaza 1 i 2. Pełniejsze informacje nt. białka *dna K* może znaleźć czytelnik w artykułach przeglądowych [21, 22].

Interesujące są obserwacje wskazujące na udział fosforylacji białek w chemotaksji u *E. coli*. Jak wiadomo poruszanie się ruchliwych bakterii umożliwia obracające się włókienkowate rzęski. Odpowiednie chemoreceptory błony przyjmują ze środowiska sygnał o obecności atraktanta. Sygnał ten przekazywany jest następnie do aparatu ruchowego komórki. W transmisji sygnału pośredniczą 3 cytoplazmatyczne białka, z których jedno (*cheA*) ma właściwości kinazy białkowej i ulega autofosforylacji. Fosforan przyłączony do kinazy przenoszony jest szybko do dalszych dwóch białek (*CheY* i *CheB*), które, jak można przypuszczać, są substraktami kinazy *CheA*, jakkolwiek sam mechanizm przenoszenia fosforanu nie jest jasny. Czwarte białko *CheZ* może odłączać fosforan od ufosforylowanych pośredników, co pociąga za sobą ich inaktywację i „wyłączenie” systemu sygnałowego. Mechanizm opisanej tu transmisji sygnałów nie został szczegółowo poznany, ale z posiadanych danych można wnosić, że kaskadowa fosforylacja białek, wzmacniająca sygnał, może stanowić sposób przekazywania informacji z bakterii nie ograniczający się do chemotaksji [13, 16].

Prokariotyczne kinazy/fosfatazy nie zawierają sekwencji charakterystycznych dla katalitycznych domen kinaz eukariotycznych [14, 15]. Jest to zrozumiałe, jeśli weźmie się pod uwagę dwufunkcyjność prokariotycznych enzymów. Struktura ich centrów aktywnych powinna być inna niż typowych kinaz białkowych. Stwierdzono jednakże wyraźną homologię sekwencji podjednostek regulatorowych eukariotycznych kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów i bakteryjnych białek CRP (ang. catabolite repression protein) wiążących cAMP [3]. W komórce bakteryjnej funkcje cAMP i CRP nie mają związku funkcjonalnego z aktywnością kinazową, ale z regulacją ekspresji niektórych genów stanowiąc podstawowe elementy kontrolne systemu węglowej represji katabolicznej.

Wykrycie różnego rodzaju konserwatywnych sekwencji w eukariotycznych kinazach białkowych stało się podstawą nowej strategii poszukiwania i identyfikacji genów kodujących te enzymy. Pozwoliło na zastosowanie sond molekularnych do przeglądu sklonowanych genów lub też odpowiednich cDNA. Przyniosło to dobre rezultaty, wykryto bowiem wiele nowych genów pokrewnych ze znanymi rodzinami genów kinaz białkowych zarówno serynowo/treoninowych jak i tyrozynowych (cyt. za 1). Techniki inżynierii genetycznej np. ukierunkowanej mutacji miejscowej (ang. site-directed mutagenesis) w genach kodujących kinazy stają się podstawą nowych podejść eksperymentalnych do badań zależności pomiędzy strukturą a funkcją białka.

Realną wydaje się możliwość syntezy odpowiednio zaplanowanych substratów swoście inaktywujących np. kinazy tyrozynowe uczestniczące w transformacji nowotworowej.

Zastosowanie technik klonowania pozwala na uzyskanie większych ilości określonej kinazy niezbędnych do jej oczyszczenia, sekwencjonowania i krystalizacji. Zrozumienie bowiem mechanizmu katalitycznego działania kinaz, a także sposobu regulacji aktywności enzymów wymaga znajomości ich trójwymiarowej struktury. Nie przypadkowo opublikowanie ostatnio wyników przedstawiających trójwymiarową strukturę katalitycznej domeny produktu onkogenu *C-H-ras p21*

[23] nabrało tak szerokiego rozgłosu [24]. Publikacja ta jest bowiem wyznacznikiem nowych kierunków badań w omawianej tu dziedzinie.

Nowe kierunki badawcze stwarzają nadzieję, że wiele niejasnych dotąd zagadnień wiążących się z przestrzenną i czasową organizacją przekazywania sygnałów do komórki, charakterystyką na poziomie molekularnym odpowiedzi komórki, mechanizmami różnicowania komórkowego i kontrolą cyklu komórkowego, w tym rola genów *CDC* (ang. cell division control) może doczekać się w niedługim czasie wyjaśnienia.

Artykuł napisano w ramach prac finansowych przez CPBR 3.13. i RP-II.13.

Artykuł otrzymano 17 lipca 1988 r.
Zaakceptowano do druku 30 grudnia 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Hunter T., (1987), *Cell*, **50**, 823–829.
2. Barker W. C., Dayhoff M. O., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2836–2839.
3. Taylor S. S., (1987), *BioEssays*, **7**, 24–29.
4. Hunter T., Cooper J. A., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 897–930.
5. Toner-Webb J., Taylor S. S., (1987), *Biochemistry*, **26**, 7371–7378.
6. Edelman A. M., Blumenthal D. K., Krebs E. G., (1987), *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 567–613.
7. Pinna L. A., Agostinis P., Ferrari S., (1986) *Adv. Prot. Phosphatases*, **3**, 327–368.
8. Mobashery S., Kaiser E. T., (1988), *Biochemistry*, **27**, 3691–3696.
9. Nishizuka Y., (1988), *BioFactors*, **1**, 17–20.
10. Katan M., Parker P. J., (1988), *Nature*, **332**, 203.
11. Kurek E., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 281–293.
12. Cortay J. C., Rieul C., Cozzone A. J., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **159**, 227–237.
13. Ninfa A. J., Magasanik B., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 5909–5913.
14. Nixon B. T., Ronson C. W., Ausubel F. M., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7850–7854.
15. Deutscher J., Kessler U., Alpert C. A., Hengstenberg W. (1984), *Biochemistry*, **22**, 4455–4460.
16. Parkinson J. S., (1988), *Cell*, **53**, 1–2.
17. Stueland C. S., Eck K. R., Stieglbauer K. T., LaPorte D. C., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 16 095–16 099.
18. LaPorte D. C., Chung T., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 15 291–15 297.
19. Rieul C., Cortay J. C., Bleicher F., Cozzone A. J., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **168**, 621–627.
20. Cortay J. C., Bleicher F., Rieul C., Reeves H. C., Cozzone A. J., (1988), *J. Bacteriol.*, **170**, 89–97.
21. Craig E. A., (1986), *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **18**, 239–280.
22. Skowrya D., Żylicz M., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 259–276.
23. De Vos A. M., Tong L., Milburn M. V., Matias P. M., Jancarik J., Noguchi S., Nishimura S., Miura K., Chtsuka E., Kim S. H., (1988), *Science*, **239**, 888–893.
24. Jurnak F., (1988), *TIBS*, **13**, 195–198.

BOŻENA KAMIŃSKA*

Właściwości białkowych kinaz tyrozynowych (*Minireview*)

Properties of protein tyrosine kinases (*Minireview*)

Aktywność kinaz tyrozynowych, katalizujących przeniesienie fosforanu z ATP na tyrozynę w białkach, wykryto po raz pierwszy w immunoprecypitatach białkowych z komórek zakażonych wirusami onkogennymi polyoma** i wirusem mysiej białaczki Abelsona – PAb-MuLV [1, 2]. Początkowo odkrycie to było trudne do interpretacji, ponieważ nie znano białka, które byłoby substratem enzymu z taką aktywnością w komórkach normalnych. Dopiero stwierdzenie, że transformujące białko z trzeciego wirusa onkogenego: wirusa mięsaka Rousa (RSV) ma aktywność kinazy i może fosforylować tyrozynę w substratach *in vitro* [4], pozwoliło na wyodrębnienie nowej klasy kinaz białkowych ze specyficznością względem tyrozyny. Ogromny postęp w identyfikacji i charakterystyce tej grupy kinaz, jaki dokonał się w ciągu 9 lat, które upłynęły od ich wykrycia, był konsekwencją odkrycia, że geny kodujące kinazy tyrozynowe są onkogenami. Fakt ten miał podwójne znaczenie. Po pierwsze stymulował zainteresowanie badaczy tą grupą kinaz budząc nadzieje na poznanie mechanizmu nowotworzenia. Po drugie dostarczał niezwykle użytecznych metod zarówno do identyfikacji kinaz jak i do ustalenia zależności między strukturą i funkcją enzymów. Wirus mięsaka Rousa, powodujący złośliwą transformację komórek ptasich, oprócz genów niezbędnych do odtworzenia cząsteczek wirusa zawiera gen *src* (od sarcoma-mięsak). Przyjmuje się powszechnie, że gen *src* został pobrany z genomu komórkowego na drodze rekombinacji w trakcie zakażenia nieonkogennym początkowo retrowirusem. Po włączeniu w genom retrowirusów gen *src* stał się aktywnym onkogenem, gdyż przestał być zależny od nadzoru komórkowych elementów kontrolnych.

Dotychczas poznano kilkanaście retrowirusów, które, podobnie jak RSV, indukują różne formy nowotworów, ponieważ zawierają aktywny onkogen „porwany” z genomu komórkowego [5, 6]. Sekwencje nukleotydowe wielu onkogenów i sekwencja genu *src* są podobne. Produkt onkogeny *src* z RSV, białko pp60^{src} (pp-fosfoproteina), powoduje kompleksowe zmiany w morfologii komórek, ich

* Mgr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, 02-093 Warszawa, Pasteura 3

** Oczyszczony średni antygen T polyoma nie ma aktywności kinazy tyrozynowej. Stwierdzona aktywność pochodziła od komórkowego białka pp60^{c-src}, z którym średni antygen T był w kompleksie [3].

wzroście i metabolizmie prowadzące do transformacji nowotworowej [7, 8]. Odkrycie, że transformujące białko pp60^{v-src} ma aktywność kinazy tyrozynowej [9], pozwalało przypuszczać, że fosforylacja grupy OH tyrozyny odgrywa ważną rolę w regulacji metabolizmu komórkowego. Sugestię tę potwierdziły obserwacje nietypowego wzoru fosforylacji tyrozyny w białkach i podwyższonej aktywności kinaz tyrozynowych w komórkach transformowanych przez wirusy onkogenne [10]. Poznano dotychczas około 20 retrowirusów, które przenoszą onkogeny o dużej homologii z genem *src*. Produkty białkowe wszystkich tych onkogenów są kinazami tyrozynowymi.

Badania nad czynnikami kontrolującymi wzrost komórek ujawniły, że wiele kinaz tyrozynowych jest integralną częścią receptorów czynników wzrostowych. Niektóre produkty onkogenów są prawdopodobnie zmienionymi wersjami receptorów czynników wzrostowych, np. białko p68^{v-erbB}, produkt onkogeny *erb B* z wirusa białaczki ptasiej, jest identyczne z cytoplazmatyczną i transbłonową częścią

Tabela 1

Kinazy kodowane przez onkogeny i odpowiadające im kinazy komórkowe

Kinazy tyrozynowe		
kodowane przez onkogeny		homologiczne kinazy komórkowe
wirus (W)	transformujące białko	
W. mięsaka Rousa	pp60 ^{v-src}	p60 ^{c-src} z komórek nerwowych [12] i z płytek krwi
W. mięsaka Fujinama	p140 ^{gag-fps}	p61 z mózgu [13] p98 ^{c-fps} z komórek krwiotwórczych [12]
W. mięsaka PRC II	p150 ^{gag-fps}	
W. mięsaka PRC IV	p170 ^{gag-fps}	
W. mięsaka UR 1	p150 ^{gag-fps}	
W. mięsaka UR 2	p68 ^{gag-ros}	gp350 receptor insuliny [14]
W. mięsaka Snyder-Theilen	p85 ^{gag-fes}	
W. mięsaka Gardner-Arnstein	p95/105 ^{gag-fps}	
W. mięsaka Y73	p90 ^{gag-yes}	p92 ^{c-yes} z mielocytów [12]
W. mięsaka Esh	p80 ^{gag-yes}	
W. białaczki Abelsona	p160 ^{gag-abl}	p150 ^{c-abl} z komórek krwiotwórczych
W. mięsaka Hardy-Zuckerman 2	p98 ^{gag-abl}	
W. mięsaka Hardy-Zuckerman 4	p80 ^{gag-kit}	[15] gp180 receptor PDGF [16]
W. mięsaka Gardner-Rasheed	p70 ^{gag-figr}	
W. białaczki erytro-blastycznej AEV	p98/72 ^{erb B}	[12] gp170 ^{c-erb B} receptor EGF [12]
W. mięsaka McDonough	gp180 ^{gag-fms}	[12] gp170 ^{c-fms} receptor CSF-1 [12]
W. białaczki Mill-Hill 2	p100 ^{gag-mil}	[12]
W. mięsaka mysiego 3611-MuSV	p90 ^{gag-raf}	[12]
onkogen neu	gp185 ^{neu}	[12] gp170 ^{c-erb B} receptor EGF [12] p40 z grasicy bydłcej [17] p50 ze śledziony bydłcej [18]

Wg [11]. Tabelę zmodyfikowano i rozszerzono (odnośniki w nawiasach)

receptora naskórkowego czynnika wzrostowego-EGF [11]. W tabeli 1 przedstawiono znane kinazy tyrozynowe kodowane przez onkogeny i odpowiadające im kinazy komórkowe.

Wśród kinaz tyrozynowych można wyróżnić kinazy: cytoplazmatyczne i związane z receptorami czynników wzrostowych, biorąc pod uwagę lokalizację w komórce i sposób aktywacji enzymu.

Kinazy tyrozynowe cytoplazmatyczne

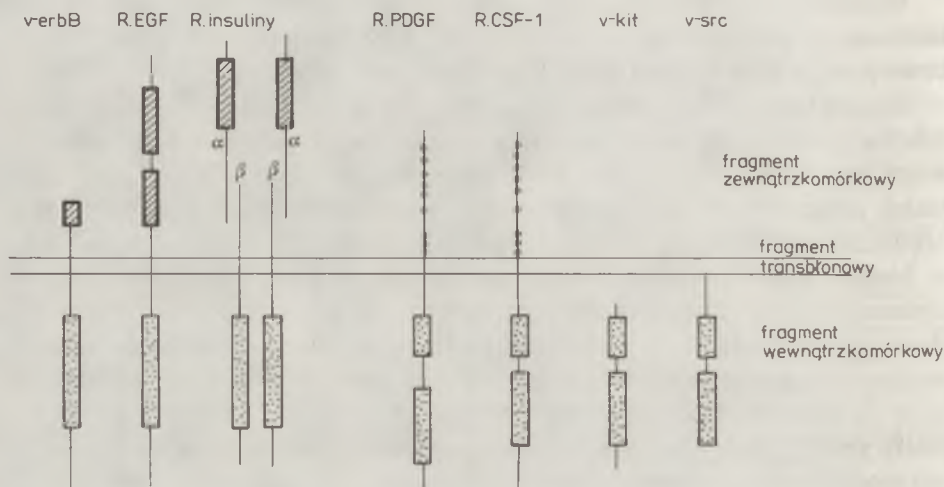
Właściwości kinaz tej grupy można scharakteryzować w oparciu o cechy kinaz kodowanych przez onkogeny retrowirusowe, gdyż homologiczne kinazy komórkowe (z wyjątkiem białka pp60^{c-src}) są jeszcze słabo poznane.

Kinazy tyrozynowe cytoplazmatyczne syntetyzowane są na wolnych rybosomach w cytoplazmie, jednak większa ich część związana jest z błonami komórkowymi jako białka peryferyczne. Do glicyny znajdującej się w N-końcowej części białek dołączony jest kwas mirystynowy. Modyfikacja ta sprawia, że N-koniec cząsteczki jest bardziej hydrofobowy i łatwiej wiąże się z błoną komórkową. Jeżeli w białku pp60^{v-src} zamiast N-końcowej glicyny znajduje się alanina, to tak zmienione białko nie ulega mirystylacji i jest znajdowane wyłącznie w cytoplazmie. Pomimo że posiada aktywność kinazy tyrozynowej, nie ma właściwości transformujących. Sugeruje to, że związanie kinaz tyrozynowych z błoną w istotny sposób łączy się z ich zdolnością do transformacji. Pozornym wyjątkiem od tej reguły jest białko p68^{gab-rcs} kodowane przez gen *ros* z wirusa ptasiego mięsaka UR2, które nie jest modyfikowane przez mirystylację. Jednakże w N-końcowym fragmencie białka znajdują się aminokwasy obojętne, które mogłyby być miejscem przyłączenia do błony komórkowej. Badania nad lokalizacją białka p68^{gab-ros} we frakcjach komórkowych wykazywały jego obecność we frakcji błonowej. Wydaje się, że wiązanie się kinaz tyrozynowych tej grupy z błoną komórkową odgrywa ważną rolę w mechanizmie ich działania. Nowo syntetyzowane cząsteczki kinaz tyrozynowych (pp60^{v-src}, pp60^{c-src}, p90^{gab-yes}, p140^{gar-fps}) są związane z dwoma białkami komórkowymi pp88 i pp50. Pierwsze białko jest jednym z białek szoku cieplnego, natomiast funkcja pp50 nie jest znana. Aczkolwiek wiązanie się białka szoku cieplnego z kinazami tyrozynowymi jest bardzo intrygujące, brak na razie danych na temat funkcjonalnego znaczenia kompleksu. Pewne obserwacje pozwalają przypuszczać, że białka pp88 i pp50 działają jako negatywne regulatory aktywności fosfotransferaz. Stwierdzono bowiem, że aktywność kinazy tyrozynowej p60^{v-src} związanej z tymi białkami jest niższa niż formy wolnej od kompleksu. Ponieważ białek pp88 i pp50 nie wykrywano w błonach komórkowych, sugerowano, że ich rola polega na ułatwieniu transportu kinaz z cytoplazmy do błony komórkowej z jednoczesnym blokowaniem aktywności na czas transportu [10, 12].

Kinazy receptorów czynników wzrostowych

Kinazy tyrozynowe są integralną częścią receptorów czynników wzrostowych takich jak: naskórkowy czynnik wzrostu-EGF; czynnik wzrostu pochodzący z

platek krwi-PDGF; insulina; somatomedyna C (IGF-I); czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów- CSF-I. Receptory czynników wzrostowych składają się z trzech domen funkcjonalnych: domeny zewnątrzkomórkowej wiążącej ligand, domeny transbłonowej odpowiedzialnej za zakotwiczenie białka w błonie komórkowej i domeny cytoplazmatycznej o aktywności kinazy tyrozynowej. Wszystkie receptory czynników wzrostowych są glikoproteinami, zwykle występującymi w błonie komórkowej w postaci monomeru. Wyjątkiem jest receptor insuliny mający formę tetramery (Ryc. 1).



Ryc. 1. Topologiczne porównanie struktury kinaz tyrozynowych receptorów czynników wzrostowych i ich onkogenicznych wariantów. Wskazano rejony ścisłej homologii z kinazami tyrozynowymi z rodziny *src* (pole zakropkowane). Wg [21], zmodyfikowano.

Wbudowanie receptora w błonę komórkową jest warunkiem jego aktywacji i podjęcia funkcji biologicznej. Jest to także czynnik krytyczny dla transformacji. Wrażliwy na temperaturę mutant wirusa ptasiej białaczki (AEV), przenoszący onkogen *v-erb B*, w temperaturze restrykcyjnej nie transformuje komórek. W tych warunkach produkt wirusowego onkogenu *v-erb B*, białko gp74^{v-erbB}, nie jest syntetyzowane i nie występuje na powierzchni komórek. Za właściwe usytuowanie cząsteczek receptorów w błonie odpowiada hydrofobowy fragment transbłonowy, gdyż delecje tego fragmentu w mutantach, uniemożliwiają wbudowywanie receptora w błonę komórkową. Takie mutanty delecyjne także nie mają właściwości transformujących [10,12]. Zarówno domena wiążąca ligand jak i domena transbłonowa są niezbędne, aby cząsteczka receptora mogła sprawnie funkcjonować. Sposób, w jaki związanie ligandu przez receptor zmienia właściwości katalityczne kinazy tyrozynowej prowadząc do jej uaktywnienia, nie jest dobrze poznany. Wiadomo jednak, że jest on taki sam w przypadku znanych receptorów czynników wzrostowych. Świadczą o tym wyniki badań Ullricha i wsp., którzy posługując się metodami inżynierii genetycznej, wytworzyli hybrydowy receptor będący połączeniem zewnątrzkomórkowej domeny receptora wiążącej insulinę z

transbłonową i cytoplazmatyczną częścią receptora EGF. Aktywność kinazy tyrozynowej takiego hybrydowego białka charakterystyczna dla receptora EGF (inna wartość K_m dla ATP niż w przypadku receptora insuliny) była stymulowana przez insulinę [19]. Świadczy to, że mechanizm aktywacji kinazy jest taki sam w przypadku obu receptorów, pomimo iż ich części zewnątrzkomórkowe mają odmienną strukturę i że receptor insuliny jest tetramerem.

Rozważane są dwie hipotezy dotyczące mechanizmu aktywacji kinazy tyrozynowej [20]. Pierwsza z nich *flush chain* zakłada istnienie (α)-helikalnego łącznika pomiędzy domeną zewnątrz- i wewnątrzkomórkową (ang. membrane-spanning connector). Związanie ligandu zmienia połączenie części zewnętrznej receptora z błoną komórkową, co prowadzi do zmiany pozycji łącznika, a to z kolei powoduje przekształcenie domeny cytoplazmatycznej. Proponowana hipoteza jest koncepcyjnie bardzo atrakcyjna z powodu swojej prostoty, brak jednak dowodów empirycznych. Druga hipoteza *cluster* proponuje, że związanie ligandu indukuje skupienie się monomerycznych receptorów i tworzenie agregatów, co powoduje zmiany w strukturze receptorów i aktywację kinazy. Pewne obserwacje fizjologiczne mogą wskazywać na słuszność tej hipotezy. EGF rzeczywiście indukuje tworzenie się skupień receptorów na powierzchni komórek. Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorowi EGF, które stymulują aktywność kinazy tyrozynowej receptora oraz naśladują efekty biologiczne EGF np.: stymulację syntezy DNA i pewnych procesów wydzielniczych, indukują także agregację receptorów. Hipoteza ta ma wielu zwolenników, między innymi dlatego, że agregacja receptorów po związaniu ligandu jest powszechną właściwością kompleksów ligand-receptor podlegających endocytozie. Jednakże są pewne zastrzeżenia względem hipotezy *cluster* bazujące na obserwacjach, że niektóre przeciwciała mogą aktywować kinazę tyrozynową receptora bez wywoływania jego agregacji, bądź indukować agregację nie wpływając na aktywność kinazy. Biorąc pod uwagę wszystkie zastrzeżenia, nie sposób w chwili obecnej wyrokować, która z hipotez dotyczących aktywacji kinazy receptorów jest prawdziwa.

Główną różnicę między kinazami cytoplazmatycznymi i kinazami receptorów czynników wzrostowych stanowi sposób aktywacji kinazy wynikający z odmiennej struktury cząsteczek. Właściwości strukturalne i enzymatyczne samej domeny katalitycznej są podobne na tyle, że będą omawiane łącznie.

Wszystkie kinazy tyrozynowe charakteryzują się obecnością domeny katalitycznej (około 30 kDa) w C-końcowej części białka. W kilku przypadkach położenie domeny katalitycznej zlokalizowano na podstawie badań izolowanych fragmentów proteolitycznych. W większości przypadków istnienie tej domeny wydedukowano na podstawie homologii sekwencji z sekwencją domeny katalitycznej pp60^{vsrc}. Domena katalityczna 13 badanych kinaz tyrozynowych jest wysoce homologiczna; blisko 70 aminokwasów zajmuje takie same pozycje w C-końcowej części białek (Ryc. 1) [21]. Stwierdzono też znaczne podobieństwo części katalitycznej kinaz tyrozynowych do domen katalitycznych klasycznych kinaz fosforylujących serynę: kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów, podjednostki γ kinazy fosforylazy i kinazy lekkiego łańcucha miozyny. Podobieństwo dotyczy

tych fragmentów domeny katalitycznej, które odpowiadają miejscu wiązania ATP i miejscu katalitycznemu. Jedno z miejsc krytycznych dla aktywności kinazy zidentyfikowano przy pomocy analogu ATP. Analog ten wiąże się z lizyną w sekwencji X-Ala-X-Lys zajmującą to samo położenie we wszystkich kinazach i hamuje aktywność enzymatyczną. Przypuszcza się, że jest to miejsce wiązania ATP. W C-końcowej części kinaz znajdują się miejsca homologiczne tylko w grupie kinaz tyrozynowych. Prawdopodobnie właśnie te rejony cząsteczki odpowiedzialne są za rozpoznanie i specyficzność substratu-tyrozyny [10].

Mechanizm reakcji fosforylacji przez kinazy tyrozynowe został szczegółowo zbadany w oczyszczonych do homogenności preparatach: pp60^{v-src}, p50^{v-abl} i receptora EGF. Analiza kinetyczna wskazuje, że najpierw wiąże się peptyd, potem ATP, następnie odłączany jest ufosforylowany substrat, a ostatni uwalniany produkt to ADP (ang. *ordered BiBi reaction*). Nie stwierdza się występowania ufosforylowanego enzymu jako pośrednika [22]. Większość kinaz wykorzystuje wyłącznie ATP jako substrat, tylko nieliczne mogą używać również GTP (pp60^{v-src} i p50^{v-abl}), ale wartość K_m dla GTP (100 μM) jest dużo wyższa niż dla ATP (10–30 μM). Wszystkie kinazy tyrozynowe wymagają obecności jonów Mg^{+2} lub Mn^{+2} . Żadna z kinaz tyrozynowych nie wykazuje zależności od cyklicznych nukleotydów i nie znane są niskocząsteczkowe modulatory aktywności tych fosfotransferaz.

Rolę regulatora aktywności kinaz odgrywa fosforylacja [10]. Wszystkie znane kinazy tyrozynowe zawierają przynajmniej jedno, a często kilka miejsc, w których fosforylowana jest seryna lub treonina. Fosforylację seryny katalizuje kinaza zależna od cyklicznego AMP i ta fosforylacja, aczkolwiek podwyższa nieznacznie aktywność kinazy tyrozynowej, nie ma większego znaczenia regulatorowego. Duże znaczenie ma natomiast fosforylacja kinaz tyrozynowych katalizowana przez kinazę C. Kinaza C, aktywowana przez ester forbolu-TPA w całych komórkach lub dodawana *in vitro* do preparatów receptora EGF, katalizuje fosforylację treoniny (Thr 654) w cząsteczce receptora. Fosforylacja Thr 654 obniża powinowactwo receptora względem EGF i zmniejsza aktywność kinazy tyrozynowej. Kinaza C katalizuje również fosforylację seryny w białku pp60^{c-src} w pozycji 12, która odpowiada dokładnie pozycji Thr 654 w cząsteczce receptora EGF (jeżeli porównuje się część cytoplazmatyczną licząc od błony) [23]. Przypuszcza się, że fosforylacja katalizowana przez kinazę C moduluje aktywność kinaz tyrozynowych, gdyż hamując ich aktywność powoduje, że działają one tylko przez krótki okres czasu. Dzięki temu w warunkach fizjologicznych fosforylacja tyrozyny w białkach ma charakter przejściowy (pulsowy) i może pełnić rolę sygnału aktywującego procesy komórkowe.

Charakterystyczną cechą kinaz tyrozynowych jest autofosforylacja. *In vivo* większość, a *in vitro* wszystkie kinazy tyrozynowe zawierają ufosforylowaną tyrozynę, a jej położenie w C-końcowej części domeny katalitycznej jest podobne w kilku badanych kinazach wirusowego pochodzenia. Zamiana Tyr w tej pozycji na inny aminokwas w białkach pp60^{v-src} i p140^{gag-lps} powoduje zmniejszenie aktywności kinazy i ogranicza zdolność do transformowania komórek (mutant pp60^{v-src} z taką

substytucją wywoływał mniej raków u kurcząt niż typ dziki i wolniej indukował ogniska komórek transformowanych w hodowli). Ponadto stwierdzono, że ufosforylowany preparat pp60^{v-src} ma aktywność dwu-trzykrotnie wyższą niż forma nieufosforylowana. Wzrost aktywności kinazy receptora EGF obserwowany *in vitro* jest także konsekwencją autofosforylacji. Prawdopodobnie autofosforylacja pełni rolę pozytywnego regulatora aktywności enzymu, chociaż gwoili ścisłości trzeba dodać, że niektórzy badacze negują znaczenie regulatorowe autofosforylacji, widząc w niej tylko przejaw aktywności enzymu [10].

Warto dodać w tym miejscu, że w komórkowym białku pp60^{c-src} fosforylowana jest tyrozyna w zupełnie innym miejscu (Tyr 527) niż w białku pp60^{v-src} i taka fosforylacja obniża aktywność enzymu. Obserwacja, że w białku wirusowym nie występuje fosforylacja Tyr 527 zmniejszająca aktywność kinazy, tylko fosforylacja Tyr 416, która podwyższa aktywność enzymu, ma duże znaczenie. Pozwala bowiem zrozumieć, dlaczego transformujące białko retrowirusowe ma wyższą aktywność specyficzną niż jego komórkowy odpowiednik. Różnice aktywności specyficznych obu kinaz powodują, że komórki normalne zawierają dziesięciokrotnie niższy poziom fosfotyrozyny w białkach niż komórki transformowane, nawet jeżeli ilości obu kinaz są podobne [10]. Pozwala to przypuszczać, że podwyższenie poziomu ufosforylowanej tyrozyny w białkach, odgrywa istotną rolę w transformacji komórek indukowanej przez onkogenne retrowirusy [24, 25]. Wzrost ilości fosfotyrozyny w białkach powodują także czynniki kontrolujące proliferację komórek [26–28], a więc identyfikacja substratów komórkowych dla kinaz tyrozynowych, może być kluczem do poznania zarówno mechanizmu nowotworzenia jak i kontroli cyklu komórkowego.

Identyfikacja komórkowych substratów kinaz tyrozynowych przez długi czas nastroczała wielu trudności, ponieważ ilość ufosforylowanej tyrozyny w białkach jest bardzo mała; zwykle stanowi około 0,03% ufosforylowanych aminokwasów w białku całkowitym [29]. Konwencjonalne metody oparte na elektroforetycznym rozdziale białek izolowanych z komórek preinkubowanych z ³²P, były mało przydatne do identyfikacji, gdyż większość ufosforylowanych białek stanowią polipeptydy zawierające fosfoserynę. Dopiero obserwacja, że fosfotyrozyna jest bardziej stabilna w warunkach alkalicznych niż fosfoseryna, pozwoliła na identyfikację prawdziwych substratów kinaz tyrozynowych. Obecnie stosuje się także przeciwciała rozpoznające ufosforylowaną tyrozinę do izolowania zawierających ją peptydów przy pomocy chromatografii powinowactwa. Przy użyciu takich przeciwciał można badać rozmieszczenie białek z ufosforylowaną tyroziną w komórce.

W tabeli 2 przedstawiono białka fosforylowane w komórkach przez kinazy tyrozynowe: pp60^{v-src} i kinazy receptorów czynników wzrostowych. Substratami kinaz tyrozynowych są: enzymy glikolityczne i białka cytoszkieletu. W komórkach transformowanych przez wirusy onkogenne enolaza, mutaza fosfoglicerynianu i dehydrogenaza mleczanowa są fosforylowane przez kinazy tyrozynowe w tym samym miejscu co *in vitro*. W komórkach normalnych żaden z tych enzymów nie zawiera fosfotyrozyny. Początkowo sądzono, że fosforylacja enzymów glikolitycz-

Tabela 2

Substraty kinaz tyrozynowych w komórkach prawidłowych i transformowanych

Substraty kinaz tyrozynowych w komórkach				
	zarażonych wirusem RSV	traktowanych		
		EGF	Insuliną	PDGF
1,6-difosfofruktokinaza	+	-	+	
dehydrogenaza mleczanowa	+	-	-	
enolaza	+	-	-	
dehydrogenaza malonowa	+	-	-	
mutaza fosfoglicerynianu	+		+	
p 36	+	+		+
p 42	+	+		+
p 81	+	+		
winkulina	+	+		
białka mikrotubul	+	+	+	
tubulina	+	+	+	

Opracowano na podstawie [9, 11, 29, 31]

nych ma duże znaczenie fizjologiczne, tym bardziej, że w komórkach transformowanych poziom glikolizy jest podwyższony dwu-trzykrotnie. Jednakże w szczegółowych badaniach wykazano, że katalizowana przez pp60^{v-src} fosforylacja enzymów glikolitycznych nie podwyższa ich aktywności i żaden z nich nie wydaje się być enzymem ograniczającym reakcję glikolizy [12].

Substratami kinaz tyrozynowych są też białka cytoszkieletu: winkulina, fodryna, tubulina, MAP-2, [10, 31, 32]. Stwierdzono, że w komórkach transformowanych przez RSV oraz w komórkach traktowanych mitogenami: EGF i PDGF, białka zawierające fosfotyrozynę zlokalizowane są po wewnętrznej stronie błony komórkowej w miejscach zw. ogniskami adhezji (ang. *focal adhesion plates*). Są to miejsca służące do przyczepiania wiązek filamentów aktyno-miozynowych do błony komórkowej, uczestniczące jednocześnie w zakotwiczeniu komórek do podłoża. Jednym z białek wiążących wiązki mikrofilamentów z błoną jest winkulina będąca substratem kinaz tyrozynowych. Fosforylacja tyrozyny w winkulinie jest dziesięciokrotnie podwyższona w komórkach transformowanych. Białko pp60^{v-src} znajdujące się zwykle w ogniskach adhezji, ma więc doskonałą pozycję, aby fosforylować winkulinę. Komórki transformowane przez RSV mają zmniejszoną zdolność adhezji do podłoża i zdeorganizowany system mikrofilamentów, czego konsekwencją są zmiany morfologii komórek. Sugerowano, że za zmiany morfologii komórek może być odpowiedzialna fosforylacja winkuliny zakotwiczonej cytoszkielet w błonie komórkowej [33]. W normalnych komórkach pod wpływem czynników wzrostowych następuje przejściowy rozpad kontaktów międzykomórkowych i ognisk adhezji, a ufosforylowana winkulina ulega przemieszczeniu. Stwierdza się zależność między intensywnością fosforylacji tyrozyny i rozpadem kontaktów między komórkami [34]. W komórkach transformowanych przez RSV sytuacja wygląda podobnie z tą różnicą, że stan ten nie ma

charakteru przejściowego i prowadzi do drastycznych zmian w morfologii komórek. Kinazy tyrozynowe zarówno wirusowe jak i kinazy receptorów czynników wzrostowych fosforylują także klasyczne składniki cytoszkieletu: fodrynę i białka mikrotubul (tubulinę, MAP-2, *tau*). Jednakże szczegółowa analiza fosforylacji tych białek ujawnia subtelne różnice w zestawie substratów fosforylowanych przez poszczególne kinazy [31]. Specyficzność substratowa kinaz tyrozynowych receptorów insuliny i EGF jest podobna, natomiast kinaza wirusowa pp60^{v-src} wykazuje różną specyficzność substratową. Konsekwencją obserwowanych różnic specyficzności substratowej kinaz wirusowych i kinaz receptorów, może być odmienny sposób reorganizacji cytoszkieletu. Pozwala to zrozumieć, dlaczego zmiany w morfologii komórek wywoływane przez retrowirusy są różne od tych indukowanych przez mitogeny [31]. Inne białka komórkowe, których fosforylacja przez kinazy tyrozynowe może mieć duże znaczenie fizjologiczne, to: p35 i p36.

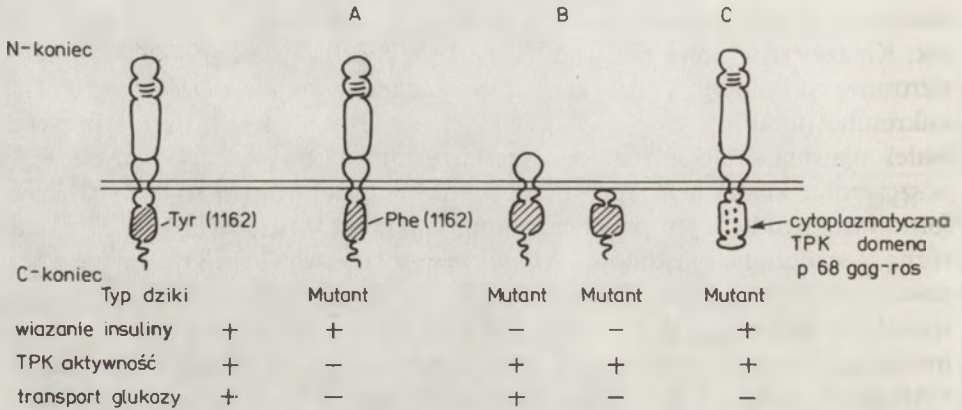
Tabela 3

Porównanie specyficzności substratowej kinaz tyrozynowych

	Kinazy receptorów EGF i insuliny	Kinaza pp60 ^{v-src}
fosforylują	β -podjednostkę fodryny	α -podjednostkę fodryny
fosforylują	słabo spektrynę ($\alpha > \beta$)	znacząco, β -podjednostkę spektryny
fosforylacja fodryny	hamowana przez F-aktynę	nie hamowana przez F-aktynę
fosforylują	głównie MAP-2, słabiej <i>tau</i> i tubulinę	głównie tubulinę, słabiej MAP-2 i <i>tau</i>
fosforylują MAP-2	w tych samych miejscach	w unikalnym miejscu
fosforylują	kinaza receptora EGF preferuje β -podjednostkę tubuliny, a kinaza receptora insuliny α -podjednostkę tubuliny	

Wykazano, że substraty kinaz tyrozynowych są podobne do lipokortyny I i II, dwóch białek komórkowych hamujących aktywność fosfolipazy A₂. Enzym ten kontroluje syntezę biologicznie aktywnych substancji takich jak prostaglandyny i leukotrieny. Stwierdzono, że w komórkach traktowanych mitogenami fosforylacja lipokortyn zmniejsza ich zdolność do hamowania fosfolipazy A₂. Jednakże nie ma pewności, czy właśnie kinazy tyrozynowe odpowiedzialne są za ten efekt [35]. Gdyby jednak tak było, to kinazy tyrozynowe fosforylując p36/p36 mogłyby uwalniać fosfolipazę A₂. Konsekwencją byłoby uruchomienie kaskady kwasu arachidonowego i synteza związków o charakterze hormonów, np.: prostaglandyn E₂ i D₂, które podwyższają poziom cAMP w komórkach i aktywują szereg procesów łącznie z syntezą DNA.

Kinazy tyrozynowe mogą też grać pewną rolę w regulacji metabolizmu



Ryc. 2. Badania zależności między strukturą i funkcją kinaz tyrozynowych przeprowadzone przez Ellisa i współautorów. A. Autofosforylacja receptora warunkuje aktywność kinazy tyrozynowej i odpowiedź fizjologiczną; B. Nieobecność domeny wiążącej ligand powoduje konstytutywną aktywację kinazy; C. Kinaza tyrozynowa hybrydowego receptora powstałego z połączenia domeny wiążącej insulinę i domeny innej kinazy jest aktywowana przez insulinę, ale brak specyficznej odpowiedzi fizjologicznej.

fosfatydyloinozytoli. Wykazano, że białko pp60^{v-src}, kinaza tyrozynowa kodowana przez onkogen *ros* oraz receptor EGF mają także aktywność kinazy lipidów i mogą przekształcać fosfatydyloinozytol do odpowiednich mono- i difosfosfatydyloinozytoli [37–39]. Te obserwacje pozwalają przypuszczać, że kinazy tyrozynowe stymulując metabolizm inozytoli, mogą pośrednio brać udział w tworzeniu przekaźników II rzędu: trisfosforanu 1, 4, 5-inozytoli i diacyloglicerolu.

Poznanie molekularnych oddziaływań związanych z odpowiedzią fizjologiczną wymaga nie tylko określenia strukturalnych i funkcjonalnych domen cząsteczek, ale także interakcji tych domen w trakcie wytwarzania odpowiedzi komórkowej. Wspaniałym przykładem badań nad zależnością między strukturą i funkcją enzymów są eksperymenty przeprowadzone przez Ellisa i wsp. [40]. Wyniki tych badań stanowią jednocześnie podsumowanie właściwości kinaz tyrozynowych. Ellis i wsp. przy pomocy ukierunkowanej mutagenyzy lub delecji fragmentów genu wprowadzali specyficzne zmiany w DNA kodującym receptor insuliny. Tak zmienione geny wprowadzono do hodowanych *in vitro* komórek jajnika chomika chińskiego CHO, które nie mają endogennych receptorów insuliny. Następnie izolowano stabilne linie mutantów i mierzono w nich aktywność kinazy tyrozynowej receptora (TRK) i efekty fizjologiczne po podaniu insuliny (schemat tych doświadczeń przedstawiono na ryc. 2). Wyniki badań Ellis i wsp. świadczą, że:

- 1) autofosforylacja receptora warunkuje aktywność kinazy tyrozynowej i odpowiedź fizjologiczną;
- 2) nieobecność domeny wiążącej ligand powoduje konstytutywną aktywację kinazy;
- 3) kinaza tyrozynowa hybrydowego białka jest aktywowana po związku ligandu

czyli mechanizmu aktywacji kinazy receptora jest uniwersalny, ale brak specyficznej odpowiedzi fizjologicznej; sugeruje to, że domena kinazy uczestniczy w specyficzności odpowiedzi poprzez selekcję substratów.

Biorąc pod uwagę wszystkie opisane zjawiska wydaje się, że fosforylacja katalizowana przez kinazy tyrozynowe odgrywa ważną rolę w kontroli metabolizmu komórki. Transformujące białka kodowane przez onkogeny są prawdopodobnie zmienionymi wariantami kinaz komórkowych, w których zmiany strukturalne powodują podwyższoną lub konstytutywną aktywność kinazy. Konsekwencją tego jest stała aktywacja pewnych procesów komórkowych prowadząca do rozregulowania mechanizmów kontrolnych i w konsekwencji do transformacji nowotworowej [40]. W poznaniu fizjologicznej roli fosforylacji tyrozyny niezwykle pomocne mogą okazać się specyficzne inhibitory kinaz tyrozynowych, których intensywne poszukiwania rozpoczęto [41].

Artykuł otrzymano 15 października 1988 r.

Zaakceptowano do druku 12 lutego 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Eckhart W., Hutchinson M. A., Hunter T. (1979), *Cell*, **18**, 925–933.
2. Witte O. N., Dasgupta A., Baltimore D. (1980), *Nature*, **283**, 826–831.
3. Courtneidge S. A., Smith A. E. (1983), *Nature*, **303**, 435–439.
4. Hunter T., Sefton B. M. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1311–1315.
5. Chorąży M., Szala S. (1983), *Postępy Biochemii*, **29**, 261–298.
6. Bishop J. M. (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 301–321.
7. Brugge J. S., Erikson R. L. (1977), *Nature*, **269**, 346–348.
8. Purchio A. F., Erikson E., Brugge J. S., Erikson R. L. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1567–1571.
9. Erikson E., Colett M. S., Erikson R. L. (1987), *Nature*, **274**, 919–921.
10. Hunter T., Cooper J. A. (1986), *The Enzymes*, T. XVII, Control by Phosphorylation, Part A, 191–246.
11. Downward J., Yarden Y., Hayes E., Scrace G., Totty N., Stockwell P., Ulrich A., Schlessinger J., Waterfield M. D. (1984), *Nature*, **307**, 521–523.
12. Sefton B. M., Hunter T. (1984), *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* T. 18, 194–226.
13. Neer E. J., Lok J. M. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6025–6029.
14. Gammeltaft S., Van Obberghen E. (1986), *Biochem. J.*, **235**, 1–11.
15. Besmer P., Murphy J. P., George P. C., Qiu F., Bergold P. J., Lederman L., Snycler H. W., Brodeur D., Zuckerman E. E., Hardy W. D. (1986), *Nature*, **320**, 415–421.
16. Bowen-Pope D. F., Seifert R. A., Ross R. (1985), *Control of Animal Cell Proliferation*, T. I, 281–314.
17. Zioncheck T. F., Harrison M. L., Geahlen R. L. (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 15 637–15 643.
18. Kong S. K., Wang J. H. (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2597–2603.
19. Ullrich A., Riedel H., Yarden Y., Coussens L., Gray A., Dull T., Schlessinger J., Waterfield M. D., Parker P. J. (1986), *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* T. LI, 713–723.

20. Carpenter G. (1987), *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 881–914.
21. Yarden Y., Escobedo J.A., Kuang W.-J., Yang-Feng T.L., Daniel T.O., Tremble P.M., Chen E.Y., Ando M.E., Harkins R.N., Francke U., Fried V.A., Ullrich A., Williams L.T. (1986), *Nature*, **323**, 226–232.
22. Erneux C., Cohen S., Garbers D.L. (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 4137–4140.
23. Gould K.L., Woodgett J.R., Cooper J.A., Buss J.E., Shalloway D., Hunter T. (1985), *Cell*, **42**, 849–857.
24. Hunter T., Sefton B.M. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1311–1315.
25. Cooper J.A., Hunter T. (1981), *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 394–407.
26. Hunter T., Cooper J.A. (1981), *Cell*, **24**, 741–752.
27. Cooper J.A., Sefton B.M., Hunter T. (1984), *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 30–37.
28. Morla A.O., Wang J.Y.J. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8191–8195.
29. Sefton B.M. (1985), Control of Animal Cell Proliferation, T. I, 315–330.
30. Cobb M.H., Rosen O.M. (1984), *Biochem. Biophys. Acta*, **738**, 1–8.
31. Akiyama T., Kadowaki T., Nishida E., Kadooka T., Ogawara H., Fukami Y., Sakai H., Takaku F., Kasuga M. (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 14 797–14 803.
32. Sen A., Todaro G.J. (1979), *Cell*, **17**, 347–356.
33. Stube W., Jungwirth C., Ziemecki A., Jockush B. (1985), *Eur. J. Cell Biol.*, **38**, 226–233.
34. Maher P.A., Pasquale E.B., Wang J.Y.J. Singer S.J. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6576–6580.
35. Brugge J.S. (1986), *Cell*, **46**, 149–150.
36. Needleman P., Turk J., Jakseik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 69–102.
37. Sugimoto Y., Whitman M., Cantley L.C., Erikson R.L. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2117–2121.
38. MaCara I.G., Marinetti B.V., Balduzzi P.C. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2728–2732.
39. Walker D.H., Pike L.J. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7513–7517.
40. Ellis L., Morgan D.O., Clauser E., Ederly M., Joug S.-M., Wang L.-H., Roth R.A., Rutter W.J. (1986), Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, T. LI, 773–783.
41. Weinberg R.A. (1985), *Science*, **230**, 770–776.
42. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S.-I., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592–5595.

GRAŻYNA DOBROWOLSKA*

Struktura i właściwości kinaz kazeinowych

Structure and properties of casein kinases

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Podstawowe właściwości kinaz kazeinowych
- III. Kinazy kazeinowe typu-1 (CK-1)
- IV. Kinazy kazeinowe typu-2 (CK-2)
 - IV-1. Struktura podjednostkowa
 - IV-2. Regulacja aktywności
 - IV-3. Specyficzność miejsca fosforylacji
- V. Enzymy podobne do kinaz kazeinowych typu-2 (CK-2-like enzymes)
- VI. Rola fizjologiczna kinaz kazeinowych

Contents

- I. Introduction
- II. General properties of casein kinases
- III. Casein kinases type-1 (CK-1)
- IV. Casein kinases type-2 (CK-2)
 - IV-1. Subunit structure
 - IV-2. Regulation of activity
 - IV-3. Site specificity of phosphorylation
- V. Casein kinase-2-like enzymes
- VI. Physiological role of casein kinases

Wykaz stosowanych skrótów: PMSF-fenylometylosulfofluorek.

I. Wstęp

Kinazy kazeinowe stanowią niewielką część olbrzymiej, bardzo intensywnie w ostatnim dziesięcioleciu badanej grupy enzymów katalizujących fosforylację białek (prace przeglądowe 1 i 2). Pomimo, że kinazy kazeinowe są pierwszymi odkrytymi ponad trzydzieści lat temu kinazami białkowymi [3], wiedza na ich temat jest

* Mgr, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

bardzo fragmentaryczna. Po odkryciu kinaz zależnych od cAMP uwaga badaczy skoncentrowała się na fosforylacji zależnej od wtórnych przekaźników (cAMP, cGMP), a ostatnio w centrum zainteresowania są kinazy białkowe zależne od kalmoduliny, kinazy C oraz duża grupa kinaz fosforylujących tyrozynę w białku akceptowanym. Ciągłe natomiast mało wiadomo na temat kinaz kazeinowych.

Nazwa kinazy kazeinowe (CK) jest nazwą zwyczajowo przyjętą lecz nie w pełni uzasadnioną i przez to trochę mylącą. Nie należy utożsamiać kinaz kazeinowych z enzymami fosforylującymi *in vivo* kazeinę w gruczole mlecznym ssaków. Kazeina jest jedynie egzogennym substratem, rutynowo używanym przy oznaczaniu aktywności enzymatycznej. Obecność kinaz kazeinowych stwierdza się we wszystkich organizmach eukariotycznych [1, 4, 5], począwszy od ssaków [6, 7, 8, 9], poprzez owady [10], płazy [11], rośliny wyższe [12, 13, 14], aż do eukariotów niższych – drożdży [15] i pleśni [16]. Najlepiej poznane są kinazy zwierzęce. Wyizolowano je z grasicy, serca, mózgu, wątroby, śledziony, nerek, retikulocytów, erytrocytów, itd....

II. Podstawowe właściwości kinaz kazeinowych

1. Kinazy kazeinowe należą do grupy enzymów fosforylujących Ser/Thr w białku akceptorowym.

2. Są niezależne od żadnego z dotychczas znanych wtórnych przekaźników (cAMP, cGMP, Ca^{2+} , kalmoduliny czy fosfolipidów).

3. Fosforylują kwaśne białka. Najlepszymi egzogennymi substratami są kazeina i foswityna.

4. Cechuje je niespotykana wśród innych kinaz zdolność do wiązania się z fosfofelulozą. Chromatografia na tym złożu występuje w większości znanych procedur oczyszczania kinaz kazeinowych.

Są to podstawowe właściwości pozwalające na zaliczenie enzymu do grupy kinaz kazeinowych. Grupa ta nie jest jednorodna. Na podstawie analizy właściwości fizykochemicznych, zwierzęce kinazy kazeinowe podzielono na dwa typy; kinazy kazeinowe-1 (Ck-1) i kinazy kazeinowe-2 (CK-2) według kolejności elucji enzymów w trakcie chromatografii na DEAE-celulozie (jonowymieniaczu, który podobnie jak fosfofeluloza jest stosowany do oczyszczania enzymów) [7]. Kinaza kazeinowa-1 nie wiąże się lub wiąże się bardzo słabo z DEAE-celulozą i jest wymywana już 0.07 – 0.13M KCl/NaCl, natomiast kinaza kazeinowa-2 może być wyluowana dopiero 0.15 ÷ 0.3M KCl/NaCl.

Oprócz najczęściej stosowanego nazewnictwa CK-1 i CK-2, w literaturze można spotkać inne określenia. Kinaza kazeinowa-1 bywa nazywana kinazą kazeinową A, ze względu na to, iż donorem grupy fosforanowej może być jedynie ATP, lub też kinazą kazeinową S, gdyż w kazeinie aminokwasem fosforylowanym może być tylko seryna. Dla CK-2 używa się natomiast określenia kinaza kazeinowa G, co oznacza że zarówno ATP jak i GTP mogą być donorami fosforu lub kinaza

kazeinowa TS, gdyż owróć seryny fosforyluje ona treoninę. Obecnie uważa się, że istotną cechą kinaz kazeinowych jest nie specyficzność substratowa w stosunku do określonego aminokwasu, lecz specyficzność miejsca fosforylacji (otoczenia fosforylowanego aminokwasu), CK-1 i CK-2 zasadniczo różnią się wyborem miejsca fosforylacji.

Inne skróty, które pojawiają się w literaturze to kinazy NI i NII (odpowiednio CK-1 i CK-2) izolowane z jąder oraz MI i MII - kinazy izolowane z mitochondriów. Podstawowe dane dotyczące obu typów kinaz, CK-1 i CK-2 zebrane są w tabeli 1.

Tabela 1

Klasyfikacja i podstawowe właściwości zwierzęcych kinaz kazeinowych⁽¹⁾

Mr	CK-1 (A, S)	CK-2 (G, TS)
	25 000 – 50 000	120 000 – 180 000
budowa donor fosforu	monomeryczna ATP	oligomeryczna ATP i GTP
reszty aminokwasowe fosforylowane w kazeinie	Ser	Ser i Thr
(z ang. whole casein)		
reszty aminokwasowe fosforylowane w β kazeinie	Ser ₂₂	Thr ₄₁
wpływ 1 μ M heparyny na aktywność	brak wpływu	inhibicja
wpływ 1 mM sperminy na aktywność	brak wpływu	stymulacja

⁽¹⁾ Wg [5]

III. Kinazy kazeinowe typu-1 (CK-1)

Kinazy kazeinowe-1 to monomeryczne białka o Mr 25 000 ÷ 50 000 ulegające autofosforylacji. Autofosforylacja nie ma wpływu na aktywność enzymatyczną [18]. W reakcji fosforylacji wykorzystują ATP jako źródło grup fosforanowych ($K_{m_{ATP}} = 7 \div 22 \mu\text{M}$). GTP jest znacznie gorszym donorem fosforu ($K_{m_{GTP}} \geq 1 \text{mM}$). Fosforylują głównie reszty serynowe w białku akceptorowym (w β kazeinie jest to seryna 22 [19]).

Do niedawna uważano, że kinazy kazeinowe-1 są zdolne do przenoszenia grup fosforanowych tylko na serynę [20, 21], jednak obecnie wiadomo, że w szczególnych wypadkach np. w kazeinie α_{s1} i lekkim łańcuchu miozyny możliwa jest również fosforylacja treoniny. Fosforylacja treoniny w kazeinie α_{s1} katalizowana była przez kinazę izolowaną z *Saccharomyces cerevisiae* odpowiadającą swymi właściwościami kinazie kazeinowej-1 [23], natomiast w miozynie przez CK-1 izolowaną z mięśni szkieletowych królika [22]. Seryna jest aminokwasem preferowanym w reakcji katalizowanej przez CK-1, jednakże zasadniczą rolę odgrywa otoczenie aminokwasu ulegającego modyfikacji.

22

β -kazeina -Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Ser-Ile-Thr-

49

α_{S1} -kazeina -Ser(P)-Glu-Ser(P)-Thr-Glu-Asp-Gln-

13

α_{S2} -kazeina -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-

135

-Thr-Ser(P)-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-

Zawsze, jak widać na przykładzie fragmentów β , α_{S1} i α_{S2} – kazeiny (wyróżniono miejsca fosforylacji katalizowanej przez CK-1 [4, 5, 105], fosforylowana seryna lub treonina poprzedzona jest kilkoma kwaśnymi aminokwasami takimi) jak kwas asparaginowy czy glutaminowy. Podobną rolę może spełniać również uprzednio ufosforylowana seryna Ser(P). Jest to warunek konieczny, lecz jak stwierdzono nie wystarczający. Do tej pory nie udało się uzyskać krótkiego, syntetycznego peptydu, który byłby dobrym substratem kinazy kazeinowej-1. Istotną rolę odgrywa najprawdopodobniej także konformacja fosforylowanego białka oraz inne ugrupowania, które mimo, że często są odległe od miejsca fosforylacji, to mogą mieć wpływ na oddziaływanie cząsteczki enzymu z substratem. W procesie fosforylacji katalizowanej przez CK-1 konieczna jest obecność Mg^{2+} (optymalne stężenie $15 \pm 20mM$). Inne jony dwuwartościowe nie są w stanie zastąpić jonów magnezowych. Stwierdza się stymulację aktywności CK-1 przez jednowartościowe kationy ($100 \pm 300mM$), jednakże stopień stymulacji bardzo zależy od rodzaju substratu [24, 25].

Nieznane są żadne specyficzne regulatory aktywności kinaz kazeinowych-1, Heparyna, silny inhibitor CK-2, hamuje aktywność CK-1 dopiero w bardzo wysokich stężeniach ($I_{50} = 100 \pm 300nM$) [26]. Słabym, niespecyficznym inhibitorem jest także kwercetyna (flawonoid), inhibitor kompetycyjny w stosunku do ATP. Nieznaczną aktywację CK-1 przez insulinę i glukagon, stwierdzono w warunkach *in vivo* [27, 28], lecz związki te również trudno uważać za specyficzne regulatory aktywności CK-1.

Enzymy charakteryzujące się omówionymi w tym rozdziale właściwościami wyizolowano z tkanek zwierzęcych [6, 9, 17], drożdży [29] i roślin wyższych [12, 14, 30]. U drożdży stwierdzono ponadto obecność enzymów o właściwościach pośrednich między CK-1 i CK-2 [31]. Pomimo, że Sternbach i Küntzel [31] zaliczyli je do CK-1, w niniejszym artykule zostały opisane w rozdziale dotyczącym kinaz podobnych do CK-2.

IV. Kinazy kazeinowe typu-2 (CK-2)

Druga grupa kinaz kazeinowych to kinazy kazeinowe-2 (CK-2). Zasadnicze cechy odróżniające je od CK-1 zostały zebrane w tabeli 1.

IV-1. Struktura podjednostkowa

Kinazy kazeinowe-2 to białka o M_r 120 000 \div 140 000 i budowie podjednostkowej. Typowa struktura to: $\alpha_2\beta_2$, lub $\alpha\alpha'\beta_2$ gdzie $M_{r\alpha}$ 30 000 \div 40 000, $M_{\alpha'}$ jest o 1000 \div 5000 mniejszy, $M_{r\beta}$ 24 000 \div 26000. Peptydy α i α' to podjednostki katalityczne [32–35] i w nich mieszczą się domeny katalityczne [2, 36, 37] charakterystyczne dla wszystkich analizowanych do tej pory kinaz białkowych. Istniała hipoteza, że podjednostka α' powstaje w wyniku proteolizy podjednostki α [4, 35]. Jednak w 1984 r. Dahmus wykazał [38], że w przypadku kinaz izolowanych z grasicy cielęcej w warunkach wykluczających proteolizę, podjednostka α' jest obecna w preparacie a w trakcie preparatyki i przechowywania enzymu stosunek α do α' nie ulega zmianie. Sprzeczne jest to z hipotezą proteolitycznego pochodzenia podjednostki α' . Dahmus sugerował, że podjednostki α i α' są produktami dwóch różnych genów lub tego samego genu jako wynik odmiennego składania mRNA. Różnicowanie może zachodzić również w trakcie potranslacyjnej modyfikacji białka. Ostatnie badania wykazały, że podjednostki α i α' są produktami różnych genów [36, 39]. Rola podjednostki β nie jest w pełni wyjaśniona. Wiadomo jedynie, że podjednostka β ulega autofosforylacji oraz że ufosforylowana forma enzymu wykazuje niższą aktywność kinazową [35].

Wszystkie CK-2 wyizolowane do tej pory z cytosolu zwierząt posiadają strukturę $\alpha_2\beta_2$ lub $\alpha\alpha'\beta_2$. Opisywane są natomiast dwie różne struktury jądrowych kinaz kazeinowych-2 (NII). Jedna analogiczna do struktury kinaz cytosolowych t.j. $\alpha\alpha'\beta_2$, druga to homodimer zbudowany z dwóch identycznych podjednostek o M_r 70 000 \div 95 000. Kinazy o budowie homodimeru wyizolowano z jąder wątroby świni (dwie podjednostki o M_r 95 000 [40]) oraz z jąder wątroby szczura (dwie podjednostki o M_r 72 000 [41]). Przy izolowaniu tych ostatnich stosowano duże stężenie inhibitora proteaz (1 mM PMSF). Stwierdzono, że tak wyizolowany enzym podczas inkubacji bez inhibitorów proteaz przekształca się z dimeru w tetramer podobny do kinaz cytosolowych [4, 5]. Delpech i wsp. [41] uważają, że dimeryczna forma enzymu odnajdywana w jądrze może być formą natywną CK-2. Sugerują możliwość udziału enzymów proteolitycznych (np. związanych z nukleosomami [42]) w przekształceniu jądrowego dimeru w tetramer izolowany z cytosolu [8] i cząstek RNP [43] oraz rozważają rolę proteolizy w przemieszczaniu kinaz z jądra do cytoplazmy. Hipoteza ta, jak do tej pory nie zyskała eksperymentalnego potwierdzenia, co więcej wykazano m.in. poprzez analizę miejsca wiązania ATP/GTP, że jądrowa (dimeryczna) kinaza NII i tetrameryczna cytosolowa CK-2 z wątroby świni są różnymi enzymami [44]. Budowa niektórych CK-2 izolowanych z drożdży, pleśni i roślin wyższych jest inna niż kinaz zwierzęcych; dlatego kinazy te bywają nazywane „enzymami podobnymi do CK-2” (CK-2 – like enzymes). Kinazom tego typu poświęcony będzie osobny rozdział.

W drożdżach występują jednak kinazy, które pomimo niewielkich różnic w budowie, zaliczane są bez wątpliwości do CK-2. W *Saccharomyces cerevisiae* występuje kinaza o M_r 130 000 spełniająca wszystkie kryteria pozwalające na sklasyfikowanie jej w grupie CK-2 [15, 45]. Początkowo sądzono, że ma ona

budowę taką jak enzymy izolowane ze zwierząt $\alpha\alpha'\beta_2$ ($M_{r\alpha}$ 41 000, $M_{r\alpha'}$ 37 000, $M_{r\beta}$ 24 000). Jednak w 1984 r. udało się za pomocą sączenia na żelu Bio-Gel A – 0.5 m usunąć z enzymu podjednostkę β [15]. Aktywność enzymatyczna zachowana była mimo nieobecności peptydu β . Badania porównawcze CK-2 z *Saccharomyces cerevisiae* i *Drosophila* [39] przy użyciu przeciwciał przeciwko podjednostce α i podjednostce β CK-2 z *Drosophila* wykazały, że kinaza drożdżowa ma budowę $\alpha\alpha'\beta\beta'$, przy czym β i β' mają wyjątkowo duże ciężary cząsteczkowe: $M_{r\alpha}$ 42 000, $M_{r\alpha'}$ 35 000, $M_{r\beta}$ 41 000 oraz $M_{r\beta'}$ 32 000. Z całą pewnością nie stwierdza się obecności peptydu β o M_r 24 000. Ani w drożdżach, ani w pleśniach ani w roślinach wyższych nie znaleziono, jak do tej pory, kinazy kazeinowej, w skład której wchodziłaby podjednostka o M_r 24 000 + 26 000 ulegająca autofosforylacji.

Omawiając strukturę CK-2 należy wspomnieć o ich zdolności do tworzenia agregatów. Badania Glovera na CK-2 z *Drosophila* [47] wykazały, że obniżenie siły jonowej w roztworze powoduje agregację białka enzymatycznego, wyrażającą się tworzeniem filamentów. Im niższa siła jonowa, tym filamety są większe i bardziej usieciowane. Sądzi się, że może to być jedna z dróg regulacji aktywności CK-2 w żywym organizmie, ponieważ fizjologiczne stężenie soli daje możliwości odwracalnego tworzenia filamentów.

IV-2. Regulacja aktywności

Znanych jest wiele regulatorów aktywności CK-2, zarówno inhibitorów jak i stymulatorów. Najsilniejszym, specyficznym i najczęściej stosowanym inhibitorem jest heparyna. Właściwość tę wykorzystuje się do określania typu badanej kinazy [4, 5, 48]. Stała inhibitorowa $I_{50} \equiv 1nM$. Heparyna jest inhibitorem kompetycyjnym w stosunku do substratu białkowego. Innymi inhibitorami tego typu są polianiony takie jak; kwas poliglutaminowy i poliasparaginowy, 2,3 dwufosfoglicerynian (2,3 DPG), sześciosiarczan inositolu, fosforan pirydoksalu [4, 5, 49]. Znane są także inhibitory kompetycyjne w stosunku do donora fosforu. Do związków takich zaliczyć można DRB (z ang. 5, 6 dichloro-1D ribofuranosylbenzimidazole) [46] oraz kwercetynę [81]. Oprócz negatywnej regulacji aktywności, stwierdza się również regulację pozytywną [4, 5, 49, 50]. Aktywatorami CK-2 są polikationy takie, jak poliaminy (spermina, spermidyna, putrescyna) oraz zasadowe polipeptydy (poliarginina, polilizyna) [50, 51, 52]. Wszystkie te badania dotyczą efektu *in vitro*. W komórce sytuacja jest o wiele bardziej skomplikowana. Efektywność regulatorów zależy bowiem w dużym stopniu od rodzaju fosforylowanego substratu oraz od środowiska, w którym znajduje się enzym [50, 53, 54]. Mechanizmy regulacji aktywności CK-2 *in vivo* nie zostały jeszcze poznane. Jednak obecność w komórce związków o charakterze kwaśnym, wykazujących działanie hamujące aktywność CK-2 [55, 56, 57] oraz zasadowym (poliamin i polipeptydów) – aktywatorów CK-2, sugeruje możliwość istnienia takich dróg regulacji *in vivo* [58]. Należy wspomnieć, że do działania kinaz kazeinowych-2 podobnie jak dla CK-1 konieczne są jony magnezowe [1, 4]. Optimum aktywności uzyskuje się przy stężeniu Mg^{2+} ok. 10 mM. Pewien udział w regulacji aktywności

CK-2 wykazują kationy jednowartościowe (Na^+ i K^+). Stężenie 100 mM Na^+/K^+ powoduje podwyższenie aktywności CK-2 o ok. 30%–100%, wyższe stężenie natomiast, powyżej 200 mM Na^+/K^+ , działają hamująco na CK-2 [1, 4].

IV-3. Specyficzność miejsca fosforylacji

Badania pozwalające na określenie specyficzności miejsca fosforylacji prowadzone są przy użyciu syntetycznych, krótkich peptydów, potencjalnych substratów CK-2 [5, 59–62]. Budowa niektórych z nich została przedstawiona w tabeli 2. Peptydy różnią się między sobą aminokwasem zdolnym do przyłączenia grupy fosforanowej (Ser, Thr, Tyr) oraz otoczeniem tego aminokwasu.

Tabela 2

Syntetyczne peptydy — potencjalne substraty CK-2⁽¹⁾

Peptyd	V_{\max} ⁽²⁾	$K_m(\mu\text{M})$
1. <u>Glu</u> -Glu-Glu-Glu-Glu- <u>Ser</u>	< 1	—
2. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Glu-Glu	100	0.27
3. <u>Thr</u> -Glu-Glu-Glu-Glu-Glu	10	6.25
4. <u>Tyr</u> -Glu-Glu-Glu-Glu-Glu	< 1	—
5. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Glu-Ala	35	4.52
6. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Ala-Ala	27	5.90
7. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Ala-Ala-Ala	< 1	—
8. <u>Ser</u> -Ala-Ala-Glu-Glu-Glu	62	6.60
9. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Ala-Glu	100	1.52
10. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Ala-Glu-Glu	4	1.71
11. <u>Ser</u> -Glu-Ala-Glu-Glu-Glu	75	1.95
12. <u>Ser</u> -Ala-Glu-Glu-Glu-Glu	89	5.55

⁽¹⁾ Wg [5]

⁽²⁾ V_{\max} — wyrażona w %, w stosunku do V_{\max} (100%) dla peptydu Ser-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu
Podkreślono reszty aminokwasowe ulegające fosforylacji.

Na podstawie analizy wydajności fosforylacji stwierdzono, że:

- seryna łatwiej ulega fosforylacji niż treonina, natomiast tyrozyna nie jest wcale fosforylowana (Tab. 2 peptydy 2, 3, 4);
- konieczne jest sąsiedztwo co najmniej trzech aminokwasów o charakterze kwaśnym (Glu, Asp, Ser(P)) od strony C-końca fosforylowanego aminokwasu (Tab. 2, peptydy 1, 2, 5, 6, 7);
- im dłuższa sekwencja kwaśnych reszt aminokwasowych tym fosforylacja jest wydajniejsza (Tab. 2, peptydy 2, 5, 6);
- kwaśny aminokwas w pozycji +3 w stosunku do modyfikowanej Ser/Thr warunkuje fosforylację; obecność w pozycji +3 obojętnego aminokwasu (np. Ala) zamiast kwaśnego (Glu) powoduje, że reakcja fosforylacji nie przebiega; peptydy 9, 11, 12 są bardzo dobrymi substratami, podczas gdy peptyd 10 praktycznie nie ulega fosforylacji (Tab. 2);
- istotny, lecz nie zasadniczy wpływ na wydajność fosforylacji ma aminokwas

zajmujący pozycję + 5; zmiana Glu w tej pozycji na Ala powoduje obniżenie ilości włączonego do peptydu fosforu.

Analiza miejsc fosforylacji w substratach białkowych, zarówno egzo- jak i endogennych (Tab. 3) jest potwierdzeniem badań na syntetycznych peptydach.

Tabela 3

Miejsca fosforylacji dla CK-2 w substratach białkowych

Białko	Sekwencja aminokwasowa z wyróżnionym miejscem fosforylacji	Piśmiennictwo
β -kazeina	-Gln-Gln- ⁴¹ <u>Thr</u> -Glu-Asp-Glu-Leu-	[4,5]
α_{52} -kazeina	-Leu-Ser(P)-Thr-Ser(P)-Glu-Glu-Asn-	[4,5]
syntaza glikogenu	-Gln- <u>Ser</u> -Glu-Asp-Glu-Glu-Glu-Glu-	[63]
podjednostka regulatorowa R _{II} kinazy zależnej od cAMP	-Asp- <u>Ser</u> -Glu- <u>Ser</u> -Glu-Asp-Glu-Glu-	[64]
inhibitor-2 białkowej fosfatazy	-Glu- <u>Ser</u> - <u>Ser</u> -Gly-Glu-Glu-Glu-Asp-Ser-Asp-	[65]
kalmodulina	-Asp- <u>Thr</u> -Asp- <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Ile-	[66]
dekarboksylaza ornitynowa	-Gly- <u>Ser</u> -Asp-Asp-Glu-Asp-Glu-Ser-	[92]

Reszty aminokwasowe ulegające fosforylacji zostały podkreślone.

Ser(P) oznacza ufosforylowaną przed inkubacją z CK-2 resztę serynową w białku akceptorowym.

V. Enzymy podobne do kinaz kazeinowych typu-2 (CK-2-like enzymes)

Nazwą tą określa się wszystkie wyizolowane do tej pory roślinne enzymy, zbliżone właściwościami do właściwości kinaz kazeinowych-2 pochodzenia zwierzęcego. Ponadto, do grupy tej zaliczyć można kinazy kazeinowe eukariotów niższych (drożdży, pleśni), których właściwości są pośrednie między CK-1 i CK-2 [31, 16]. Zasadnicze różnice między CK-2, a „CK-2-podobnymi enzymami” widoczne są w ich budowie. W przypadku „kinaz podobnych do CK-2” nie stwierdza się budowy heterotetrameru $\alpha\alpha'\beta_2$. Z tkanek roślinnych wyizolowano co najmniej dwa różne typy enzymów przypominających kinazy kazeinowe-2: CK-IIA⁽¹⁾ i CK-IIB⁽¹⁾. CK-IIA to kinazy o Mr 120 000 + 140 000 i budowie podjednostkowej. Struktura jest jednak inna niż zwierzęcych CK-2. Na przykład kinaza izolowana z soi [12] składa się tylko z trzech podjednostek i ma budowę $\alpha\alpha'\beta$ (Mr _{α} 52 000, Mr _{α'} 37 000, Mr _{β} 35 000). Kinaza nazywana CK-2, izolowana z *Dictyostelium discoideum* jest homooligomerem o Mr podjednostki 40 000 [16]. Druga grupa enzymów – CK-IIB to monomeryczne białka najczęściej o Mr 30 000 ÷ 60 000 [13, 14, 30, 31]. Budową CK-IIB przypomina kinazy kazeinowe-1. Jednakże właściwości CK-IIB są całkiem odmienne od CK-1. CK-IIA i CK-IIB reagują podobnie do typowych CK-2 na działanie efektorów – inhibitorów i

⁽¹⁾ nazewnictwo wprowadzone przez autora

aktywatorów (jedyna różnica to brak stymulacji przez sperminę). W reakcji fosforylacji wykorzystują obok ATP także GTP. Również specyficzność miejsca fosforylacji pozwala na zaklasyfikowanie ich do grupy kinaz typu-2. Badania prowadzone na CK-IIA i CK-IIB obecnych w siewkach kukurydzy [68] przy użyciu modelowych peptydów wykazały, że substraty białkowe tej grupy kinaz muszą spełniać wszystkie wymagania stawiane substratom zwierzęcym CK-2. Jest to warunek konieczny ale nie wystarczający. Okazało się, że dla kinaz roślinnych (badania na CK-IIB z siewek kukurydzy), bardzo istotną rolę odgrywa charakter aminokwasu w pozycji +1 w stosunku do ulegającej modyfikacji seryny (Tab. 4). Peptydy 2, 3 (Tab. 4) są dobrymi substratami dla CK-2 izolowanej z wątroby szczura, natomiast nie są zupełnie fosforylowane przez CK-IIB z siewek kukurydzy. Podobnie podstawienie kwasu glutaminowego przez alaninę w pozycji +4 i +5 powoduje większy spadek fosforylacji katalizowanej przez CK-IIB w porównaniu z fosforylacją przy udziale CK-2 z wątroby szczura (Tab. 4). Wydaje się, że kinazy kazeinowe z siewek kukurydzy, a może wszystkie kinazy „podobne do CK-2”, są enzymami o większej specyficzności niż zwierzęce kinazy kazeinowe typu-2.

Tabela 4

Fosforylacja syntetycznych peptydów przez CK-IIB z siewek kukurydzy i CK-2 z wątroby szczura (dane kinetyczne)⁽¹⁾

Peptyd	CK-IIB z kukurydzy		CK-2 z wątroby szczura	
	V _{max} (%) ⁽²⁾	K _m (μM)	V _{max} (%) ⁽²⁾	K _m (μM)
1. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Glu-Glu	100	0.25	100	0.27
2. <u>Ser</u> -Ala-Glu-Glu-Glu-Glu	< 1	—	89	1.10
3. <u>Ser</u> -Ala-Ala-Glu-Glu-Glu-Glu	< 1	—	116	1.06
4. <u>Ser</u> -Glu-Ala-Glu-Glu-Glu	130	0.57	75	1.90
5. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Ala-Glu-Glu	< 1	—	4	1.79
6. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Ala-Glu	102	0.38	100	1.52
7. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Glu-Ala	68	0.41	35	2.15
8. <u>Ser</u> -Glu-Glu-Glu-Ala-Ala	< 1	—	27	5.30

Reszty aminokwasowe ulegające fosforylacji zaznaczono tłustym drukiem.

⁽¹⁾ Wg [68].

⁽²⁾ V_{max} wyrażona w %, w stosunku do V_{max} (100%) dla peptydu Ser-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu.

VI. Rola fizjologiczna kinaz kazeinowych

Pomimo, że kinazy kazeinowe znane są od bardzo dawna, o ich roli w komórce wiadomo ciągle niewiele, zdecydowanie mniej, niż o roli innych kinaz białkowych [prace przeglądowe 1, 2].

CK-1 może fosforylować wiele białek (część z nich przedstawiono w Tab. 5), jednak tylko w kilku przypadkach widoczne są funkcjonalne zmiany białka wywołane tą fosforylacją. Ufosforylowane formy; kinazy fosforylasy [69], poli(A)

Tabela 5

Substraty białkowe CK-1

Białko	Piśmiennictwo
RNA polimeraza II	72
poli(A) polimeraza	70, 71
syntaza glikogenu	18
aminoacyl tRNA syntaza	73
acetyl CoA karboksylaza	78
kinaza fosforylaza	69
tubulina	102
spektryna	104
eIF-4B, eIF-5	4

Tabela 6

Substraty białkowe CK-2

Białko	Piśmiennictwo
eIF-2, eIF-3, eIF-4B, eIF-5	[4]
RNA polimeraza I	[76]
RNA polimeraza II	[77]
DNA topoizomeraza I	[74]
DNA topoizomeraza II	[75]
białka związane z mRNP	[89, 103, 43]
jąderekowe białko B23	[97]
jąderekowe białko C23	[98]
HMG białko 17	[90]
HMG białko 14	[91]
syntaza glikogenu	[63, 88]
dekarboksylaza ornitynowa	[92]
troponina T	[94, 95]
acetyl CoA karboksylaza	[78]
miozyna	[100, 101]
spektryna	[79]
fibrynogen	[80]
kalmodulina	[66]
90 kDa białko szoku cieplnego	[93]
receptor androgenu	[99]
R _{II} podjednostka regulatorowa kinazy białkowej II zależnej od cAMP	[64]
inhibitor-2 fosfatazy białkowej	[65]

polimerazy [70, 71] i RNA polimerazy II [72] wykazują wyższą aktywność enzymatyczną, natomiast aktywność syntazy glikogenu [18] i aminoacyl tRNA syntazy [73], wręcz przeciwnie – jest hamowana przez działanie CK-1.

Więcej wiadomo na temat naturalnych substratów CK-2. Znanych jest ich obecnie ok. trzydziestu. Tabela 6 przedstawia niektóre z nich.

Kinazy kazeinowe-2 fosforylują białka biorące udział w ekspresji genów np.

topoizomerazę I i II [74, 75], polimerazy RNA I i II [76, 77], czynniki translacyjne [4], kluczowe białka wielu szlaków metabolicznych [63, 78], niektóre białka strukturalne [79, 80] oraz białka szoku cieplnego [93]. Fosforylacja zarówno topoizomerazy I i II jak i polimeraz RNA I i II zależnych od DNA powoduje kilkukrotny wzrost ich aktywności enzymatycznej. Również fosforylacja podjednostki β czynnika eIF-2 sprawia, że translacja zachodzi wydajniej [82, 83]. Fakty te, w pewnym stopniu, mogą tłumaczyć znaczny wzrost aktywności CK-2 w trakcie różnicowania się komórek (badania na komórkach 3T3-L1 [84]) oraz podczas embriogenezy myszy [85]. Zwiększoną aktywność CK-2 wykazują „ustalone linie” komórkowe, oraz komórki transformowane [86]. Udział kinaz kazeinowych-2 stwierdzono w procesie mejotycznego podziału komórkowego [87].

Nie zawsze efekt fosforylacji jest jednoznaczny. Podobnie jak dla CK-1, często nie jest widoczna żadna zmiana funkcjonalna fosforylowanego białka. Nie świadczy to jednak o tym, że zmiany takiej nie ma. Obecnie coraz więcej wiadomo na temat kaskadowych mechanizmów fosforylacji, stanowiących sieci ściśle ze sobą powiązanych reakcji fosforylacji i defosforylacji. Również kinazy kazeinowe mają w nich swój udział. CK-2 fosforyluje podjednostkę regulatorową R_{II} kinazy zależnej od cAMP [64], oraz inhibitor-2 białkowej fosfatazy [65]. Znany jest także fakt tworzenia przez CK-2 miejsc rozpoznawania dla innych kinaz. Fosforylacja syntazy glikogenu przez kinazę kazeinową-2 umożliwia dalszą fosforylację syntazy przez kinazę 3 syntazy glikogenu [88]. To, że często jedna fosforylacja warunkuje następną, widoczne jest także na układach modelowych. W przypadku substratów kinaz kazeinowych (patrz Tab. 3), obecność ufosforylowanej wcześniej przez inną kinazę seryny, umożliwia następnie fosforylację białka przez kinazę kazeinową.

Do tej pory wiadomości dotyczące roli fizjologicznej kinaz kazeinowych są bardzo fragmentaryczne. Jednak intensywnie prowadzone badania mające na celu wyjaśnienie regulacyjnej roli fosforylacji w komórce, przy wykorzystaniu coraz doskonalszych technik badawczych, niewątpliwie w niedalekiej przyszłości rozszerzą naszą wiedzę dotyczącą struktury i funkcji kinaz kazeinowych.

Dziękuję serdecznie Panu profesorowi Eugeniuszowi Gąsiorowi za zachęcenie mnie do napisania niniejszego artykułu oraz Pani docent Grażynie Muszyńskiej za krytyczne uwagi przy jego pisaniu.

Artykuł otrzymano 12 września 1988 r.

Zaakceptowano do druku 24 stycznia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Edelman A. M., Blumenthal D. K., Krebs E. G., (1987), *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 567–613.
2. Hunter T., (1987), *Cell*, **50**, 823–829.
3. Burnett G., Kennedy E. P., (1954), *J. Biol. Chem.*, **211**, 969–972.
4. Hathaway G. M., Traugh J. A., (1982), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **21**, 101–127.
5. Pinna L. A., Meggio F., Marchiori F., (1988), *CRC Crit. Rev. Biochem.*, w druku.
6. Dahmus M. E., (1981), *J. Biol. Chem.* **256**, 3319–3325.
7. Hathaway G. M., Traugh J. A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 762–768.

8. Meggio F., Pinna L. A., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **145**, 593–599.
9. Cochet C., Job D., Pirollet F., Chambaz E. M., (1980), *Endocrinology* **106**, 750–757.
10. Glover G. V. C., Shelton E. R., Brutlag D. L., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3258–3265.
11. Mulner-Lorillon O., Marot J., Cayla X., Pouhle R., Belle R., (1988), *Eur. J. Biochem.*, **171**, 107–117
12. Gowda S., Pillay D. T. N., (1982), *Plant Science Lett.*, **25**, 49–59
13. Yan T-F. J., Tao M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7037–7043.
14. Dobrowolska G., Meggio F., Pinna L. A., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **931**, 188–195.
15. Kudlicki W., Szyszka R., Gąsior E., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **784**, 102–107
16. Renart M. F., Sastre L., Sebastian J., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **140**, 47–54
17. Meggio F., Donella-Deana A., Pinna L. A., Moret V., (1977), *FEBS Lett.*, **75**, 192–196.
18. Ahmad Z., Camici M., De Paoli-Roach A. A., Roach P. J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3420–3428.
19. Meggio F., Donella-Deana A., Pinna L. A., (1979), *FEBS Lett.*, **106**, 76–80.
20. Takeda M., Youramura H., Ohga Y., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 103–110.
21. Clari G., Pinna L. A., Moret V., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **524**, 316–326.
22. Singh T. J., Akatsuka A., Huang K.-P., (1983), *FEBS Lett.*, **159**, 217–220.
23. Szyszka R., Kudlicki W., Grankowski N., Gąsior E., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, 171–174
24. Itarte E., Huang K. P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4052–4057.
25. Itarte E., Mor M. A., Salavert A., Pena J. M., Bertomeu J. F., Guinovart J. J., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **658**, 334–347.
26. Meggio F., Donella-Deana A., Brunati A. M., Pinna L. A., (1982), *FEBS Lett.*, **141**, 257–262.
27. Cobb M. H., Rosen O. M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12472–12481.
28. Akatsuka A., Singh T. J., Nakabayashi H., Lin M. C., Huang K. P., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 3239–3242.
29. Kudlicki W., Szyszka R., Paleń E., Gąsior E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **633**, 376–385.
30. Erdmann H., Böcher M., Wagner K. G., (1985), *Plant Science*, **41**, 81–89.
31. Sternbach H., Küntzel H., (1987), *Biochemistry*, **26**, 4207–4212.
32. Hathaway G. M., Zoller M. H., Traugh J. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11442–11446.
33. Feige J.-J., Cochet C., Pirollet F., Chambaz E. M., (1983), *Biochem.*, **22**, 1452–1459.
34. Cochet C., Chambaz E. M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 1403–1406.
35. Meggio F., Pinna L. A., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **145**, 593–599.
36. Takio K., Kuenzel E. A., Walsh K. A., Krebs E. G., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4851–4855.
37. Takio K., Blumenthal D. K., Edelman A. M., Walsh K. A., Krebs E. G., Titani K., (1985), *Biochem.*, **24**, 6028–6037.
38. Dahmus G. K., Glover C. V. C., Brutlag D. L., Dahmus M. E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9001–9006.
39. Padmanabha R., Glover G. V. C., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1829–1835.
40. Baydoun H., Hoppe J., Jacob J., Wagner K. G., (1980), *FEBS Lett.*, **122**, 231–233.
41. Delpech M., Levy-Favatier F., Moisand F., Kruh J., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **160**, 333–341.

42. Kim Y. J., Chae C. B., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **775**, 151–154.
43. Rittschof D., Traugh J. A., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 333–336.
44. Baydoun H., Feth F., Hoppe J., Erdman H., Wagner K. G., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 504–511.
45. Rigobello M. P., Jori E., Carignani G., Pinna L. A., (1982), *FEBS Lett.*, **144**, 354–358.
46. Zandomeni R., Zandomeni M. C., Shugar D., Weinmann R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 3414–3419.
47. Glover C. V. C., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 14349–14354.
48. Hathaway G. M., Lubben T. H., Traugh J. A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8038–8041.
49. Hathaway G. M., Traugh J. A., (1983), *Methods in Enzymol.*, **99**, 317–331.
50. Hathaway G. M., Traugh J. A., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**, 133–138.
51. Hathaway G. M., Traugh J. A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 7011–7015.
52. Meggio F., Grankowski N., Kudlicki A., Szyszka A., Gąsior E., Pinna L. A., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **159**, 31–36.
53. Hara T., Endo H., (1982), *Biochem.*, **21**, 2632–2637.
54. Ahmed K., Goueli S. A., Williams-Ashman H. G., (1985), *Biochem. J.*, **232**, 767–771.
55. Job D., Cochet C., Pirollet F., Chambaz E. M., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 303–308.
56. Pirollet F., Feige J.-J., Cochet C., Job D., Chambaz E. M., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 613–620.
57. Levy-Favatier F., Delpech M., Riffe A., Kruh J., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 149–154.
58. Job D., Pirollet F., Cochet C., Chambaz E. M., (1979), *FEBS Lett.*, **108**, 508–512.
59. Meggio F., Marchiori F., Borin G., Chessa G., Pinna L. A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14576–14579.
60. Pinna L. A., Meggio F., Marchiori F., Borin G., (1984), *FEBS Lett.*, **171**, 211–214.
61. Kuenzel E. A., Krebs E. G., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 737–741.
62. Marin O., Meggio F., Marchiori F., Borin G., Pinna L. A., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **160**, 239–244.
63. Cohen P., Yellowless D., Aiken A., Donella-Deana A., Hemmings B. A., Parker P. J., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 21–35.
64. Carmichael D. F., Geahlen R. L., Allen S. M., Krebs E. G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10440–10445.
65. Holmes G. F. B., Kuret J., Chisholm A. K., Cohen P., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **870**, 408–416.
66. Meggio F., Brunati A. M., Pinna L. A., (1987), *FEBS Lett.*, **215**, 241–246.
67. Pinna L. A., Donella-Deana A., Meggio F., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 114–120.
68. Dobrowolska G., Meggio F., Pinna L. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1010**, 274–277.
69. Singh T. J., Akatsuka A., Huang K. P., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12857–12864.
70. Stetler D. A., Jacob S. T., (1985), *Biochemistry*, **24**, 5163–5169.
71. Stetler D. A., Seidel B. L., Jacob S. T., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14481–14485.
72. Cadena D. L., Dahmus M. E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 12468–12474.
73. Pendergast A. M., Traugh J. A., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11769–11774.
74. Durban E., Goodenough M., Mills J., Busch H., (1985), *EMBO J.*, **4**, 2921–2926.
75. Ackerman P., Glover C. V. C., Osheroff N., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3164–3168.
76. Rose K. M., Stetler D. A., Jacob S. T., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2833–2837.

77. Dahmus M. E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3332–3339.
78. Tipper J. P., Bacon G. W., Witters L. A., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**, 386–396.
79. Clari G., Moret V., (1985), *Mol. Cell. Biochem.*, **68**, 181–191.
80. Guash M. D., Plana M., Pena J. M., Itarte E., (1986), *Biochem. J.*, **234**, 523–526.
81. Cochet C., Feige J. J., Pirollet F., Keramidas M., Chambaz E. M., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 1357–1361.
82. Kramer G., Hardesty B., (1981), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **20**, 185–203.
83. De Paoli-Roach A. A., Roach P. J., Pham K., Kramer G., Hardesty B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8871–8874.
84. Sommercorn J., Krebs E. G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3839–3843.
85. Schneider H. R., Reichert G. H., Issinger O.-G., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **161**, 733–738.
86. Prowald K., Fischer H., Issinger O.-G., (1984), *FEBS Lett.*, **176**, 479–483.
87. Mulner-Lorillon O., Maryot J., Cayla X., Pouhle R., Belle R., (1988), *Eur. J. Biochem.*, **171**, 107–117.
88. Fiol C. J., Mahrenholz A. M., Wang Y., Roeske R. W., Roach P. J., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 14042–14048.
89. Rittschof D., Traugh J. A., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 333–336.
90. Inoue A., Tei Y., Hasuma T., Yukioka M., Morisawa S., (1980), *FEBS Lett.*, **117**, 68–72.
91. Walton G. M., Gill G. N., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 4440–4446.
92. Meggio F., Flamigni F., Calderera C. M., Guarnieri C., Pinna L. A., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 997–1004.
93. Goueli S. A., Davis A. T., Hiipakka R. A., Liao S., Ahmed K., (1985), *Biochem. J.*, **230**, 293–302.
94. Pinna L. A., Meggio F., Dediukina M., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 449–454.
95. Villar-Palasi C., Kumon A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7409–7415.
96. Hosey M. M., Tao M., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4578–4583.
97. Chan P.-K., Aldrich M., Cook R. G., Busch H., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1868–1872.
98. Mamrach M. D., Olson M. O. J., Busch H., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3381–3386.
99. Goueli S. A., Holtzman J. L., Ahmed K., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 778–784.
100. Matsumura S., Mukarami N., Tashiro Y., Yasuda S., Kumon A., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**, 125–135.
101. Mukarami N., Matsumura S., Kumon A., (1984), *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**, 651–658.
102. Singh T. J., Akatsuka A., Huang K. P., Murthy A. S. N., Flavin M., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 19–26.
103. Thoen C., Van Hove L., Slegers H., (1986), *Molec. Biol. Rep.*, **11**, 69–75.
104. Erusalimsky J. D., Balas N., Milner Y., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **756**, 171–181.
105. Donnella-Deana A., Grankowski N., Kudlicki W., Szyszka R., Gąsior E., Pinna L. A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **829**, 180–187.

JÓZEF ZAJĄC*

Heterogenność kinazy białkowej C

The heterogeneity of the protein kinase C

Kinaza białkowa aktywowana przez fosfolipidy, zależna od Ca^{2+} i diacyloglicerolu (kinaza C) jest szeroko rozpowszechniona u Eukaryota [1,2], a jej udział w rozlicznych funkcjach komórek jest dobrze udokumentowany i powszechnie akceptowany [3,4]. Kinaza C wewnątrzkomórkowo występuje w frakcji rozpuszczalnej, a w większości komórek jest także związana z błonami. Ilościowe rozmieszczenie enzymu między błony i frakcję rozpuszczalną jest zmienne i zależy od stanu fizjologicznego komórek.

Kinaza C jest monomerem o masie cząsteczkowej 77 kDa i katalizuje fosforylację siarczanu protaminy, natomiast w obecności fosfolipidów, Ca^{2+} i diacyloglicerolu ujawnia się jej aktywność wobec innych substratów [5]. Diacyloglicerol może być zastąpiony przez niektóre estry forbolu [6], bądź antybiotyki jak mezereina, teleocydyna i aplysiatoksyna [6]. Nieodwracalna aktywacja kinazy C następuje również podczas ograniczonej proteolizy za pomocą trypsyny lub kalpajny [7], ponieważ powstały fragment o masie cząsteczkowej około 51 kDa jest aktywny w nieobecności wyżej wymienionych kofaktorów. Ponadto stwierdzono, że nienasycone kwasy tłuszczowe o konfiguracji cis również efektywnie stymulują aktywność kinazy C [8,9]. Z powyższego wynika, że różne sposoby aktywacji kinazy C przynajmniej w części mogą tłumaczyć różnorodność jej wpływu na procesy komórkowe [10].

Przez długi czas kinaza C uważana była za jednorodne białko. Jednakże niekiedy obserwowano, że homogenne preparaty enzymu podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym ulegały rozdzielaniu na blisko położone pasma. Bardziej przekonującym dowodem heterogenności kinazy C był rozdział homogenego preparatu z mózgu na kolumnie z hydroksyapatytu na trzy frakcje, które oznaczono jako typ I, II i III zgodnie z kolejnością elucji gradientem stężeń ortofosforanu [11, 12].

Jednocześnie w kilku ośrodkach metodami molekularnego klonowania z bibliotek DNA mózgu szczura [13–16], królika [17], wołu i człowieka [18, 19] wyizolowano komplementarne cDNA kodujące różne warianty kinazy C. Ze

* Dr. Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademii Medycznej w Lublinie, ul. Lubartowska 85, 20–123 Lublin

względem na rozmaite oznakowania tych samych wariantów enzymu przez różnych autorów zaproponowano [20] jednolity system zalecający używania kolejnych liter alfabetu greckiego według Coussens i wsp. [19]. Zgodnie z tą propozycją uporządkowano dotychczas poznane klony cDNA i kodowane przez nie warianty kinazy C (Tab. 1). W dotychczasowych publikacjach warianty kinazy C oznaczane są również literami alfabetu greckiego zgodnie z odpowiednimi klonami cDNA.

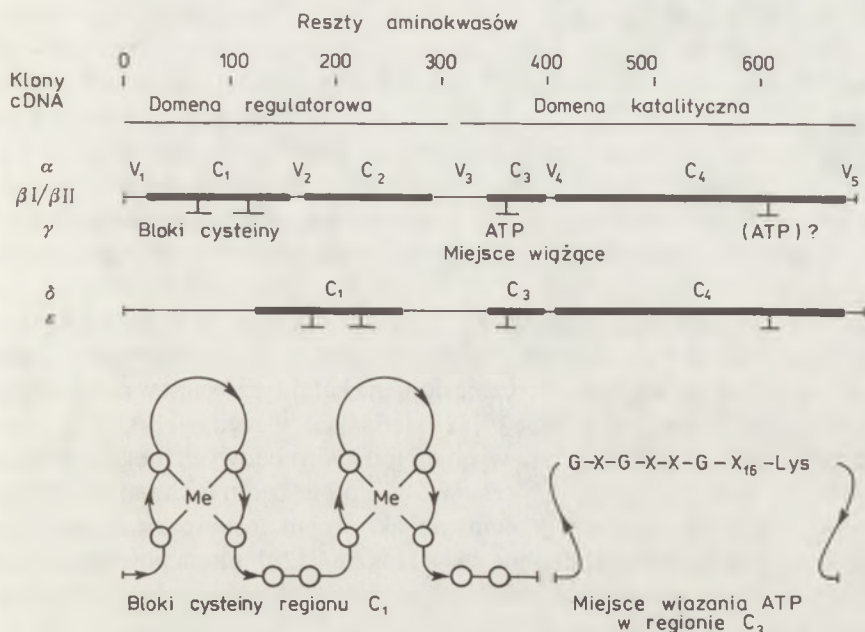
Tabela 1

Zestawienie poznanych klonów cDNA kinazy C i ich korelacja z typami enzymu wykrytymi w mózgu

Systematyka proponowana [20]	cDNA						
	α	β I	β II	γ	δ	ϵ	ζ
Przewidywana liczba aminokwasów	672	671	673	697	673	737	—
Subfrakcje enzymu z mózgu [11]	Typ III	Typ II		Typ I	—	—	—
Mózg człowieka i wotu [18, 19]	α	—	β	γ	—	—	—
Mózg królika [17]	γ	β	α	—	—	—	—
Mózg szczura [15]	—	PKC III	PKC II	PKC I	—	—	—
Mózg szczura [16]	—	RP41?	—	—	—	—	—
Mózg szczura [13, 14]	X?	Typ I	Typ II	—	—	—	—
Mózg szczura [23]	—	—	—	—	δ	ϵ	ζ

Warianty enzymu odpowiadające klonom α -, β - i γ -cDNA kodowane są przez geny znajdujące się na różnych chromosomach, ale charakteryzują się dużym podobieństwem budowy. Klon β -cDNA koduje dwa subwarianty kinazy C [21, 22] β I i β II powstające na skutek alternatywnego cięcia i składania premRNA, a różniące się jedynie na odcinku 50 aminokwasów od C-końca. Kolejne odkryte warianty δ -, ϵ - i ζ -cDNA kodujące kinazę C w mózgu szczura nie są jeszcze dostatecznie zbadane, ale wiadomo, że różnią się znacznie budową od poprzednio wymienionych [23].

Warianty kinazy C kodowane przez α -, β - i γ -cDNA są monomerami o dużej homologii sekwencji aminokwasowej. Część N-końcowa obejmująca około 300 aminokwasów stanowi domenę regulatorową, natomiast pozostała część C-końcowa stanowi domenę katalityczną (Ryc.). Ta ostatnia wykazuje duże podobieństwo budowy z regionami katalitycznymi innych kinaz białkowych, szczególnie zależnych od cAMP i cGMP oraz *src* [18]. W strukturze wariantów α , β I, β II i γ kinazy C występują cztery regiony stałe ($C_1 - C_4$) i pięć zmiennych ($V_1 - V_5$, Ryc. 1). Regiony stałe (ang. conserved) o niemal identycznej sekwencji aminokwasowej określają podstawowe własności i funkcje enzymu, natomiast regiony zmienne, jak sądzi się, w sposób bardziej precyzyjny modulują własności i funkcje enzymu w zróżnicowanych komórkach czy nawet strukturach subkomórkowych, a ich ekspresja uzależniona by była od potrzeb komórki.



Ryc. 1. Schematyczne porównanie struktur dwóch grup wariantów genetycznych kinazy białkowej C. C₁-C₄ – regiony stałe, V₁-V₅ – regiony zmienne. Me – jony metalu, G – glicyna, X – różne aminokwasy, kółka oznaczają cysteinę, a strzałki wskazują kierunek od N- do C-końca.

W pierwszym stałym regionie (C₁) na początku występuje sekwencja aminokwasów -Arg-Lys-Gly-Ala²⁵-Leu-Arg- o charakterze pseudosubstratu ze względu na typowe rozmieszczenie aminokwasów zasadowych i alaniny w pozycji 25 zamiast seryny, czy treoniny, które występują w miejscach fosforylacji białek przy udziale kinazy C [24]. Ta pseudosubstratowa sekwencja w domenie regulatorowej, jak sądzą H o u s e i K e m p [25], powoduje blokowanie domeny katalitycznej w nieobecności aktywujących kofaktorów. Na poparcie tej tezy autorzy wykazali, że syntetyczny polipeptyd o sekwencji enzymu od pozycji 19 do 36 jest efektywnym inhibitorem zarówno autofosforylacji kinazy C jak i fosforylacji substratów białkowych, a w przypadku zastąpienia alaniny w pozycji 25 seryną, polipeptyd ten jest dobrym substratem dla kinazy C. Ponadto interesującą osobliwością stałego regionu C₁ jest występowanie dwóch bloków bogatych w cysteinę o sekwencji -Cys-X₂-Cys-X₁₃₍₁₄₎-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X₇-Cys-, gdzie X oznacza różne aminokwasy. Podobna sekwencja bloków cysteinowych występuje w produktach ekspresji protoonkogenów c-raf i A-raf, które mają własności kinazy białkowej [26], a także w wielu metaloproteinach i białkach wiążących się z DNA i uczestniczących w regulacji transkrypcji [8]. Wskazywałoby to na udział kinazy C w regulacji ekspresji genów. Hipoteza ta wymaga doświadczalnej weryfikacji, a wykazanie występowania kinazy C w jądrach komórek mózgu i wątroby sugeruje możliwość jej udziału w regulacji procesów związanych bezpośrednio z DNA i stanowi kolejny krok w tym kierunku [27].

Niewątpliwie stałe regiony C_1 i C_2 stanowią główny trzon domeny regulatorowej kinazy C. Jednakże, jak to wynika z sekwencji aminokwasowej, brak jest w niej typowej struktury dla wiązania Ca^{2+} jak w kalmodulinie, czy innych białkach wiążących Ca^{2+} . W obrębie pozycji od 292 do 303 występują sekwencje kwasu asparaginowego i glutaminowego, które mogą stanowić miejsce wiążące Ca^{2+} , chociaż dotychczas nie ma na to dowodów. Z sekwencji aminokwasowej wynika, że także inne miejsca mogą wiązać Ca^{2+} , a nawet sugeruje się występowanie dwóch miejsc wiążących o różnym powinowactwie, ale dotychczas ich nie zlokalizowano.

Zgodnie z aktualnym poglądem fosfolipidy uczestniczące w aktywacji kinazy C wiążą się z domeną regulatorową. Przemawia za tym doświadczenie, w którym wykazano, że uwolniona proteolitycznie domena katalityczna jest w pełni aktywna w nieobecności fosfolipidów i Ca^{2+} [28]. Jednakże w regionach C_1 i C_2 części regulatorowej nie stwierdza się typowych miejsc hydrofobowych mogących wiązać fosfolipidy i diacyloglicerol, czy estry forbolu, a ogólny charakter domeny regulatorowej jest hydrofilny. W centrum aktywnym fosfolipazy A_2 występują bogate w cysteinę sekwencje podobne jak w kinazie C [29], zatem pośrednio można sądzić, że tego typu struktury w łańcuchu polipeptydowym są odpowiedzialne za oddziaływanie z fosfolipidami.

Znana jest aktywacja kinazy C na drodze ograniczonej proteolizy przy udziale trypsyny lub kalpainy [7]. Proteoliza ma miejsce na granicy regionów C_2 i V_3 , najprawdopodobniej między miejscem wiążącym Ca^{2+} i domeną katalityczną występuje pętla podatna na proteolizę w przedziale 292 – 317 sekwencji aminokwasów zawierającej argininę i lizynę. Rola fizjologiczna ograniczonej proteolizy kinazy C nie jest jeszcze wyjaśniona. Może ona mieć znaczenie w inicjacji procesów nieodwracalnych i zapoczątkowaniu degradacji enzymu [7].

Trzeci stały region C_3 , będący częścią domeny katalitycznej, zawiera miejsce wiązania ATP o charakterystycznej dla wielu kinaz białkowych sekwencji -Gly-X-Gly-X₂-Gly-X₁₆-Liz- (18, X oznacza różne aminokwasy). Ale kinaza C w przeciwieństwie do innych kinaz białkowych posiada dodatkowo podobnie zbudowane miejsce w stałym regionie C_4 . Jaka jest jego rola nie wiadomo. Natomiast stwierdzono, że kinaza C w przeciwieństwie do kinazy zależnej od cAMP może wykorzystać [³⁵S-γ]-tio-ATP w fosforylacji białek błonowych [30], co wskazywałoby na mniejszą specyficzność przynajmniej jednego z miejsc wiążących ATP. Ponadto obecność dwóch miejsc wiążących ATP może mieć znaczenie w specyficzności kinazy C wobec substratów białkowych, ponieważ katalizuje ona fosforylację seryny lub treoniny w pobliżu zasadowego aminokwasu położonego od N-końca, bądź C-końca, a także z obydwu stron. Pod tym względem kinaza C jest bardziej uniwersalna niż kinaza zależna od cAMP, która preferencyjnie katalizuje fosforylację seryny poprzedzonej aminokwasami zasadowymi tylko do N-końca [24].

Domena katalityczna zawiera również cysteinę, chociaż w mniejszej ilości niż domena regulatorowa. Znana jest wrażliwość kinazy C na aktywujące działanie związków sulfhydrylowych, a także na inhibitory blokujące grupy -SH [31] i

utlenianie [32], które powodują inaktywację enzymu. Chociaż domena regulatorowa zawiera znacznie więcej cysteiny niż domena katalityczna, to wiązanie estrów forbolu jest mniej wrażliwe na hamujące działanie N-etylomaleimidu niż fosforylacja histonu [31].

Warianty kinazy C kodowane przez δ -, ϵ - i ζ -cDNA, a zwłaszcza ten ostatni, są mniej poznane, ale wiadomo, że ich budowa znacznie różni się od omówionych wcześniej (Ryc. 1). Warianty δ i ϵ mają tylko trzy stałe regiony wspólne (C_1 , C_3 i C_4), a w związku z tym większe regiony zmienne. Zachowane zostały najbardziej charakterystyczne regiony dla tej rodziny kinaz białkowych, to znaczy domena katalityczna wspólna u wszystkich kinaz białkowych i region bogaty w cysteinę w domenie regulatorowej, który jak się wydaje wyróżnia je spośród innych typów kinaz białkowych, z wyjątkiem c-raf i A-raf.

Jak wcześniej wspomniano preparat kinazy C z mózgu ulega rozdzielaniu na kolumnie z hydroksypatytu na trzy frakcje, które oznaczono jako typ I, II i III [11, 12]. Porównanie każdego z powyższych typów kinazy C z wariantami, które ulegają ekspresji w komórkach COS7 po transfekcji odpowiednimi cDNA [20] wykazało, że typ I odpowiada enzymowi kodowanemu przez γ -cDNA, typ II – β -cDNA, a typ III – α -cDNA. Taką samą zbieżność typów kinazy C z poszczególnymi wariantami stwierdzono także za pomocą specyficznych przeciwciał dla poszczególnych typów enzymu [33]. Klon β -cDNA jest źródłem dwóch subwariantów (I i II), które z kolumny hydroksypatytowej eluowane są razem w postaci pojedynczego szczytu jako typ II kinazy C [21]. Obydwa subwarianty uległy ekspresji w komórkach COS7, a rozróznilo je za pomocą specyficznych przeciwciał [21, 22]. Obecnie problem czy pozostałe typy kinazy C składają się z subwariantów pozostaje otwarty.

Wielość funkcji przypisywanych kinazie C może być tłumaczona subtelnymi różnicami poszczególnych wariantów i subwariantów oraz zróżnicowaniem ich ekspresji uzależnionej od rodzaju sygnałów regulacyjnych. Poszczególne warianty enzymu mogą w tych samych komórkach spełniać podobne, ale różniące się tylko w szczegółach funkcje. Obecne badania zmierzają zatem zarówno do odkrycia dalszych wariantów i subwariantów tego enzymu, ponieważ dane doświadczalne wskazują na możliwość ich istnienia, jak i do poznania szczegółowych ich własności oraz ekspresji w zróżnicowanych funkcjonalnie komórkach.

Stwierdzono, że podczas autofosforylacji kinazy C przyłącza się 1–2 mole P/mol enzymu. Najszybciej autofosforylacji ulega typ I kinazy [34]. W typach I i III fosforylacji ulega seryna, a w II seryna i treonina. Mapy fosfopeptydów po trypsynolizie wskazują na różne miejsca fosforylacji zarówno w poszczególnych typach kinazy C, jak i w obrębie tych samych typów [34]. Autofosforylacja heterogennego preparatu kinazy C powoduje osłabienie oddziaływania jej z błonami poprzez zmniejszenie powinowactwa do Ca^{2+} [35]. Dotychczas brak jest danych odnośnie znaczenia autofosforylacji w przypadku indywidualnych wariantów enzymu.

Kinaza C pod wpływem stymulacji hormonalnej ulega translokacji do błon i degradacji proteolitycznej. Doświadczenia ze stymulacją za pomocą surowicy i

estrów forbolu wskazują, że w komórkach mięśni gładkich aorty królika występują frakcje kinazy C wrażliwa i niewrażliwa na wewnątrzkomórkową degradację [36]. Typ kinazy C wrażliwy na proteolizę wykazuje działanie proliferacyjne lub antyproliferacyjne w zależności od sposobu stymulacji komórek. Natomiast typ kinazy C nie ulegający proteolizie nie posiada powyższych funkcji [36]. Te tylko wstępnie rozpoznane różnice w wrażliwości na wewnątrzkomórkową proteolizę i udziale w proliferacji różnych frakcji kinazy C wymagają dalszych badań, które powiązałyby powyższe funkcje z poznanymi typami enzymu.

Poszczególne typy kinazy C są w wyraźnie zróżnicowany sposób aktywowane nienasyconymi kwasami tłuszczowymi i Ca^{2+} [9]. Typ I jest najmniej wrażliwy na powyższą aktywację, pośrednio zachowuje się typ II, natomiast stymulacja typu III w optymalnych warunkach jest porównywalna z podobnym działaniem fosfatydylloseryny i diacyloglicerolu. Jest wielce prawdopodobne, że ten alternatywny sposób aktywacji niektórych wariantów kinazy C może mieć znaczenie w określonych stanach fizjologicznych komórek [9].

Pelosin i wsp. [37] udało się rozdzielić kinazę C z mózgu szczura na kolumnie z hydroksyapatytu stosując krzywoliniowy gradient ortofosforanu na cztery frakcje, które różniły się powinowactwem do diacyloglicerolu, estrów forbolu i różnych substratów białkowych. Frakcje te nie były porównywane ze znanymi wariantami enzymu. Różnice w powinowactwie do Ca^{2+} i estrów forbolu poznanych trzech typów kinazy C stwierdzili również inni badacze [12].

Fosforylacja receptora EGF (ang. epidermal growth factor) przez kinazę C powoduje częściowe lub całkowite zniesienie jego funkcji. Wykazano, że w błonach komórkowych raka naskórka (A431) receptor EGF najefektywniej jest fosforylowany przez typ III kinazy C z mózgu, który jako jedyny ulega ekspresji w tych komórkach [11]. Pozostałe typy kinazy C z mózgu są mniej efektywne w fosforylacji receptora EGF [11]. W związku z powyższym wynika zagadnienie specyficzności substratowej różnych wariantów kinazy C będące jednym z przedmiotów dalszych badań.

Kolejnym zagadnieniem już częściowo rozpoznany jest zróżnicowana ekspresja wariantów kinazy C w rozmaitych tkankach i typach komórek. Zastosowanie kombinacji technik biochemicznych, cytochemicznych i immunologicznych z użyciem specyficznych przeciwciał pozwoliło na badanie rozmieszczenia poznanych wariantów kinazy C w różnych tkankach i indywidualnych komórkach, a szczególnie w wyodrębnionych strukturach mózgu, gdzie aktywność tego enzymu jest wyjątkowo duża [38, 39]. Typ I kinazy C ulega ekspresji po urodzeniu jedynie w mózgu i rdzeniu kręgowym. Największą jego aktywność stwierdzono w części korowej mózdzku i hipokampie, natomiast najmniejszą w rdzeniu kręgowym. Kinaza C II typu w dużych ilościach występuje jako przeważający wariant we wszystkich strukturach mózgu z wyjątkiem mózdzku. Subwarianty kinazy C typu II (βI i βII) ulegają ekspresji w mózgu i innych tkankach w różnych ilościach. Zwykle subwariant βII przeważa nad βI , a niemal całkowicie w korze mózgowej i hipokampie. Względnie duża aktywność subwariantu βI występuje w rdzeniu kręgowym. Typ III kinazy C występuje w wielu tkankach i rozmaitych komórkach.

W różnych strukturach mózgu występuje mniej więcej równomiernie, z przewagą jedynie w rdzeniu kręgowym [38] i opuszcze nerwu węchowego [39]. Wykazano również wzrost ekspresji trzech wariantów kinazy C w ludzkich promielocytach linii HL-60 podczas różnicowania wywołanego sulfotlenkiem dwumetylu i kwasem retinowym [40]. Należy zaznaczyć, że aktywność kinazy C typu I w tych komórkach jest niewielka.

Jakkolwiek lista wariantów i subwariantów kinazy C jest jeszcze otwarta, jak również ich ekspresja w różnych typach komórek jest w trakcie badań, to nie ulega wątpliwości, że te wielorakie formy enzymu uczestniczą w różnorodnych i specyficznych funkcjach komórkowych, będących przedmiotem bieżących i przyszłych badań.

*Artykuł otrzymano 15 sierpnia 1988 r.
Zaakceptowano do druku 12 stycznia 1989 r.*

PIŚMIENNICTWO

1. Kuo J. F., Andersson R. G. G., Wise B. C., Mackerlova L., Salomonson I., Brackett N. L., Katoh N., Shoji M., Wrenn R. W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7039–7043.
2. Minakuchi R., Takai Y., Yu B., Nishizuka Y., (1981), *J. Biochem.*, **89**, 1651–1654.
3. Nishizuka Y., (1986), *Science*, **233**, 305–312.
4. Kwiatkowska J., (1985), *Post. Biochem.*, **35**, 35–45.
5. Takai Y., Kishimoto A., Iwasa Y., Kawahara Y., Mori T., Nishizuka Y., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3692–3695.
6. Ashendel C. L., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **882**, 219–242.
7. Murray A. W., Fournier A., Hardy S. J., (1987), *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 53–54.
8. Murakami K., Witeley M. K., Routtenberg A., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 13 902–13 906.
9. Sekiguchi K., Taukuda M., Ogita K., Kikkawa U., Nishizuka Y., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 797–802.
10. Nishizuka Y., (1988), *BioFactors*, **1**, 17–20.
11. Ido M., Sekiguchi K., Kikkawa U., Nishizuka Y., (1987), *FEBS Lett.*, **219**, 215–218.
12. Jaken S., Kiley S. C., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4418–4422.
13. Ono Y., Kurokawa T., Kawahara K., Nishimura O., Marumoto R., Igarashi K., Sugino Y., Kikkawa U., Ogita K., Nishizuka Y., (1986), *FEBS Lett.*, **203**, 111–115.
14. Ono Y., Kurokawa T., Fujii T., Kawahara K., Igarashi K., Kikkawa U., Ogita K., Nishizuka Y., (1986), *FEBS Lett.*, **206**, 347–352.
15. Knopf J. L., Lee M.-H., Sultzman L. A., Kriz R. W., Loomis C. R., Hewick R. M., Bell R. M., (1986), *Cell*, **46**, 491–502.
16. Housey G. M., O'Brian C. A., Johnson M. D., Kirschmeier P., Weinstein I. B., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1065–1069.
17. Ohno S., Kawasaki H., Imajoh S., Inagaki M., Yokokura H., Sakoh T., Hidaka H., (1987), *Nature*, **325**, 161–166.
18. Parker P. J., Coussens L., Totty N., Rhee L., Young S., Chen E., Stabel S., Waterfield M. D., Ullrich A., (1986), *Science*, **233**, 853–859.

19. Coussens L., Parker P.J., Rhee L., Yang-Feng T.L., Chen E., Waterfield M.D., Francke U., Ullrich A., (1986), *Science*, **233**, 859–866.
20. Kikkawa U., Ono Y., Ogita K., Fujii T., Asaoka Y., Sekiguchi K., Kosaka Y., Igarashi K., Nishizuka Y., (1987), *FEBS Lett.*, **217**, 227–231.
21. Ono Y., Kikkawa U., Ogita K., Fujii T., Kurokawa T., Asaoka Y., Sekiguchi K., Ase K., Igarashi K., Nishizuka Y., (1987), *Science*, **236**, 1116–1120.
22. Coussens L., Rhee L., Parker P.J., Ullrich A., (1987), *DNA*, **7**, 389–394.
23. Ono Y., Fujii T., Ogita K., Kikkawa U., Igarashi K., Nishizuka Y., (1987), *FEBS Lett.*, **226**, 125–128.
24. Kondo H., Baba Y., Takaki K., Kondo K., Kagamiyama H., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 155–161.
25. House C., Kemp B.E., (1987), *Science*, **238**, 1726–1728.
26. Ishikawa F., Takaku F., Nagao M., Sugimura T., (1986), *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 1183–1187.
27. Misra U.K., Sahyoun N., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 760–768.
28. Kishimoto A., Kajikawa N., Shiota M., Nishizuka Y., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 1156–1164.
29. Maraganore J.M., (1987), *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 176–177.
30. Kerrick W.G.L., Hoar P.E., (1981), *Nature*, **292**, 253–254.
31. Kikkawa U., Ogita K., Ono Y., Asaoka Y., Shearman M.S., Fujii T., Ase K., Sekiguchi K., Igarashi K., Nishizuka Y., (1987), *FEBS Lett.*, **223**, 212–216.
32. Gopalakrishna R., Anderson W.B., (1987), *FEBS Lett.*, **225**, 233–237.
33. Huang F.L., Yoshida Y., Nakabayashi H., Knopf J.L., Young W.S., Huang K.-P., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 946–952.
34. Huang K.-P., Nakabayashi H., Huang F.L., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8535–8539.
35. Wolf M., Cuatrecasas P., Sahyoun N., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 15 718–15 722.
36. Kariya K., Takai Y., (1987), *FEBS Lett.*, **219**, 119–124.
37. Pelosin J.-M., Vilgrain I., Chambaz E.M., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 382–391.
38. Shearman M.S., Naor Z., Kikkawa U., Nishizuka Y., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 911–919.
39. Huang F.L., Yoshida Y., Nakabayashi H., Huang K.-P., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 15 714–15 720.
40. Makowske M., Ballester R., Cayre Y., Rosen O.M., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 3402–3410.

JANINA KWIATKOWSKA*

Kinaza białkowa C a transmisja sygnałów w komórce (minireview)

Protein kinase C and signal transmission in the cell (minireview)

Spis treści:

- I. Aktywacja kinazy białkowej C
- II. Fizjologiczna funkcja kinazy C
- III. Rola kinazy białkowej C w autoregulacji i modulacji innych układów regulatorowych

Contents:

- I. Activation of protein kinase C
- II. Physiological function of protein kinase C
- III. The role of protein kinase C in autoregulation and in the other regulatory system modulation

Wykaz stosowanych skrótów: ANF – przedsionkowy czynnik natriuretyczny; DG – diacyloglicerol; EGF – nabłonkowy czynnik wzrostowy; FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; II-2 – interleukina 2; PAF – czynnik aktywujący płytki; PDGF – czynnik wzrostowy pochodzący z płytek; PK-C – kinaza białkowa C; TPA – 12-tetradekanoiloforbolo-13-octan.

I. Aktywacja kinazy białkowej C

Kinaza białkowa C (PK-C) została odkryta w 1977 r w pracowni Y. Nishizuka, jako enzym o nieznannej funkcji fizjologicznej, powszechnie występujący w tkankach ssaków. Pierwszym wykrytym sposobem aktywacji enzymu była kontrolowana proteoliza, przy której uwalnia się C-końcowy fragment białka zawierający domenę katalityczną [1]. Późniejsze badania wykazały, że taki typ aktywacji PK-C ma miejsce w homogenatach tkankowych, a także izolowanych leukocytach i płytkach krwi pod wpływem kalpajny, proteazy aktywowanej przez wapń. Utrzymuje się do dziś hipoteza zakładająca, że pod wpływem sygnału aktywującego kalpajnę, katalityczny fragment kinazy C może być uwalniany do cytoplazmy lub błony, wciąż jednak brak dowodów na fizjologiczne znaczenie takiej aktywacji i jej istnienie *in vivo* [2, 3].

*Prof. dr hab. Zakład Biochemii AM, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

Wkrótce po odkryciu kinazy C okazało się, że natywny, nienaruszony enzym może być też aktywny, wymaga to jednak obecności fosfatydyloseryny i wysokich, niefizjologicznych stężeń wapnia. Domeny regulatorowe mieszczą się w N-końcowym fragmencie cząsteczki.

Właściwe zainteresowanie kinazą białkową C zaczęło się w latach 80-tych, wraz z odkryciem, że enzym ten może być odbiorcą sygnałów, przekazywanych przez hormony, neurotransmitery i czynniki wzrostowe. Efektorem w tym przekazywaniu sygnałów jest fosfolipaza C, hydrolizująca fosfatydyloinozytydy z uwolnieniem trisfosfoinozytolu mobilizującego wapń w komórkach, oraz diacyloglicerolu (DG). Minireview na ten temat ukazało się w „Postępkach Biochemii” w 1986 r [4]. Diacyloglicerol jest aktywatorem kinazy C, która w jego obecności nadal wymaga dla aktywności fosfatydyloseryny, ale działa w niskich stężeniach wapnia. Dodatkowym impulsem do badań PK-C stało się odkrycie, że składniki oleju krotonowego, estry forbolowe, znane jako promotory nowotworów, są analogami DG, trwale aktywującymi kinazę C [5].

Wyjaśnienie mechanizmów transmisji sygnałów z receptorów na efekторы pozwala zrozumieć powiązanie między układami aktywującymi kinazę C a innymi systemami regulatorowymi. Mechanizm ten jest zdumiewająco jednolity, bez względu na różnorodność substancji sygnałowych, receptorów, efektorów. Do efektorów zalicza się cyklazę adenylanową, cyklazę guanylanową, fosfolipazę C, fosfodiesterazę cGMP oraz kanały jonowe. W każdym przypadku transduktorem informacji są homologiczne białka G. Poznano i scharakteryzowano kilka typów białek G. W tabeli 1 przedstawiono w jakich układach regulacyjnych biorą one udział.

Tabela 1

Udział białek G w transmisji sygnałów

Efektor	Białko G	Działanie
cyklaza adenylanowa	G _s	aktywacja
cyklaza adenylanowa	G _i	hamowanie
fosfolipaza C	G ₁₂ , G ₁₃	aktywacja
fosfolipaza A ₂	G ₁₂ , G ₁₃	aktywacja
fosfodiesteraza cGMP	G ₁	aktywacja
kanały jonowe (K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻)	G _o , G _i	modulacja

Jak widać, układowi fosfolipazy C, generującej aktywator kinazy C przypisuje się dwa białka: G_o i G_i. G_i jest też transduktorem układu hamującego kinazę adenylanową, a G_o uczestniczy w przekazywaniu sygnałów na kanały jonowe. Występowanie tego samego białka G w różnych układach regulacji może tłumaczyć powiązanie wzajemne tych układów.

Wszystkie białka G są heterotrimerami złożonymi z podjednostek α , β i γ . Podjednostce α przypada główna rola w rozpoznawaniu receptora, wiązaniu nukleotydów guanylowych i ich hydrolizie. W stanie niepobudzonym podjednos-

tką α jest związana z GDP. Po pobudzeniu receptora przez odpowiedni sygnał, GDP zostaje wyparty przez GTP z domeny wiążącej w podjednostce α , co pociąga za sobą odłączenie tej podjednostki od kompleksu β/γ . W aktywacji efektora może brać udział zarówno podjednostka α , (jak w przypadku stymulacji cykazy adenylanowej i fosfodiesterazy cGMP), jak i kompleks β/γ (np przy otwieraniu kanałów potasowych serca pod wpływem acetylocholino). W każdym przypadku działanie na efektor jest krótkotrwałe, gdyż następuje hydroliza GTP z uwolnieniem P_i i reasocjacja podjednostek.

Coraz powszechniej mówi się o tym, że w aktywacji fosfolipazy C uczestniczący kompleks β/γ . Jeśli tak, to istnieje możliwość jednoczesnego działania podjednostki α w innym układzie.

Ostatnio pojawiły się informacje wskazujące, że rozkład inozytlofosfatydów nie jest jedynym źródłem DG. Powstawać one mogą też z fosfoinozytydoglikanów pod wpływem insuliny i insulinopodobnych białek. Powstały diacyloglicerydy zawiera reszty kwasu mirystynowego [6, 7].

Niezbędnym wymogiem, który musi spełniać digliceryd jako aktywator kinazy C jest konfiguracja 1, 2-*sn*, oraz wolna grupa hydroksylowa przy C 3. Długość łańcucha acyli nie jest warunkiem determinującym aktywację PK-C, ale wpływa na jej sprawność i siłę. Stosując diglicerydy o różnych podstawnikach da się zauważyć 10- i 100-krotne różnice w aktywności PK-C. Obecność nienasyconej reszty acylowej nie jest konieczna, ale wzmacnia stopień aktywacji. Przy hydrolizie inozytlofosfatydów powstają diglicerydy zawierające głównie kwas stearynowy i arachidonowy, silnie aktywujące PK-C. Słabszą aktywność wykazują mirystydyloglicerole, generowane przez insulinę. Mała swoistość PK-C względem reszt acylowych w DG pozwala stosować w badaniach syntetyczne diglicerydy, łatwo przenikające przez błony komórkowe, jak np *sn*-1, 2-dioktanoiloglicerol lub *sn*-1-palmitoilo-2-acetyloglicerol [8]. Aktywacja kinazy C przez DG jest krótkotrwała, zostają one następnie bądź użyte do resyntezy lipidów, bądź ulegają hydrolizie. Natomiast estry forbolowe wiążą się z PK-C nieodwracalnie, trwale ją aktywując.

Rolę naturalnych aktywatorów PK-C przypisuje się ostatnio także wolnym *cis*-nienasyconym kwasom tłuszczowym, np. oleinowemu, linolenowemu itp. W ich obecności enzym nie wymaga do swej aktywności nie tylko jonów Ca^{2+} , ale i fosfatydyloseryny [9]. Kwasy te są uwalniane z fosfolipidów pod wpływem fosfolipazy A_2 . Enzymowi temu przypisuje się obecnie rolę odrębnego efektor. Np. stymulacja adrenergicznego receptora α_1 przez wazopresynę i adrenalinę, lub rodopsyny przez światło, pobudza aktywność zarówno fosfolipazy C jak i A_2 . Niektórzy autorzy uważają, że są to działania niezależne [10], inni zaś są zdania, że aktywacja fosfolipazy A_2 jest następstwem fosforylacji i unieczynnienia lipokortyn, inhibitorów tej fosfolipazy, przez PK-C [11, 12].

Aktywacja PK-C może wiązać się z translokacją enzymu wewnątrz komórki. Aktywacja przez estry forbolowe idzie zazwyczaj w parze z translokacją kinazy z cytosolu do błony. Zjawisko to obserwowano w wielu tkankach, np. w fibroblastach, komórkach krwi, trzustce, przysadce [13 – 16]. Długotrwałe działanie TPA

(12-tetradekanoilforbolo-13-octanu) i innych estrów forbolowych prowadzi z czasem do zmniejszenia liczby miejsc wiążących aktywatory w kinazie C, następnie do zanikania jej aktywności na skutek proteolizy [17, 18]. Traktowanie komórek estrami forbolowymi przed zadziałaniem odpowiedniego sygnału usuwa kinazę C z układu. Trzeba jednak mieć na uwadze, że trwała aktywacja PK-C i jej silna asocjacja z błonami pod wpływem TPA nie jest zjawiskiem fizjologicznym i nie zawsze można oceniać zjawiska indukowane przez estry forbolowe jako naturalne. Istotnie, w limfocytach i fibroblastach, w których obserwowano silną translokację PK-C do błony po zadziałaniu TPA, dodanie diglicerydów powoduje jedynie słabą i krótkotrwałą asocjację enzymu z błoną, zaś naturalne sygnały stymulujące aktywację PK-C (bombezyna, FGF, PDGF) w ogóle nie zmieniają lokalizacji PK-C [13, 19]. W innych tkankach obserwowano jednak przemieszczenie PK-C do błony pod wpływem naturalnych stymulatorów PK-C, takich jak TSH w tarczycy [20], peptydu chemotaktycznego w neutrofilach [14], interleukiny-2 w limfocytach [21], angiotensyny II w nadnerczu [22] itp. Mechanizm takiej translokacji nie jest w pełni wyjaśniony. Może mieć w nim udział peroksydacja lipidów, sprzężanie PK-C z białkami błon, a w przypadku TPA – silne hydrofobowe wiązanie w kompleksie enzym-fosfolipid-TPA [19].

Przemieszczanie PK-C do błon nie jest regułą. Translokacja z błon do cytosolu zachodzi np. w nadnerczu pod wpływem ACTH, w adipocytach pod wpływem insuliny, w limfocytach pod wpływem konkanawaliny oraz przy elektrostymulacji nerwów w mięśniach (23 – 25).

II. Fizjologiczna funkcja kinazy C

Do czynników pobudzających syntezę DG i aktywację PK-C zaliczamy wiele hormonów (adrenalina, angiotensyna, bradykinina, hormony przysadki, insulina, pankreozymina i in.), neurotransmiterów (acetylocholina, serotonina, histamina), czynników wzrostowych i mitogennych (EGF, PDGF, bombezyna, trombina itp), a także antygeny i interleukiny. Nienasycone kwasy tłuszczowe powstają przy stymulacji rodopsyny, receptorów adrenergicznych α i β .

Już samo wyliczenie stymulatorów PK-C wskazuje na udział tego enzymu w wielu różnorodnych funkcjach organizmu. Potwierdzają to dane na temat naturalnych substratów kinazy C, fosforylowanych przez nią *in vivo* i *in vitro*. Przykłady tych substratów przedstawiamy poniżej:

Kinaza fosforylaza glikogenu,	Receptor insuliny,
Syntaza glikogenu,	somatomedyny, C
Karboksylaza acetylo-CoA,	transferyny,
Oksydoreduktaza NADP,	acetylocholiny,
Hydroksylaza tyrozyny,	adrenergiczny,
	antygenów,
Białko tau,	EGF,
Miozyna,	komplementu,

Aktyna G,	Polimeraza DNA (α),
Troponina C i T,	Rybosomalne białko S6,
Kaldesmon,	Czynniki inicjacji IF-e2,
ATPaza transportująca Ca^{2+}	
ATPaza transportująca Na^+/K^+ ,	Białko podstawowe mieliny,
Białko transportujące Na^+/H^+ ,	Białko błon neuronów,
Białko transportujące glukozę,	Białko błon miocytów,
Kanały wapniowe,	Białka płytek krwi.

Kinazy C, podobnie jak A i C fosforylują reszty serynowe i treoninowe w substratach białkowych. O ile jednak wiadomo, że kinazy A są swoiste względem reszt serynowych, w których sąsiedztwie znajdują się conajmniej dwie reszty aminokwasów zasadowych, to dotychczas nie ustalono, co determinuje wybór reszty fosforylowanej przez kinazy C. W niektórych białkach mogą to być te same reszty, które są fosforylowane przez kinazy A, w innych zaś każda z kinaz działa na odmienne reszty. Np. w histonie H1 substratem kinazy A jest seryna 38 N-końcowego fragmentu polipeptydu, a substratami kinazy C – reszty serynowe i treoninowe w odcinkach C-terminalnych (26).

Nie tylko ustalenie swoistości substratowej PK-C nastęrcza wiele trudności, ale także trudno jest precyzyjnie ustalić konkretne reakcje, które ona reguluje. Procesy fizjologiczne, w których enzym uczestniczy są przeważnie bardzo złożone i składają się na nie zarówno mechanizmy zależne, jak i nie zależne od PK-C. Często obserwuje się też dodatnią lub ujemną korelację z innymi układami regulacyjnymi, które mogą modulować kinazę C i być wzajemnie przez nią modulowane. Oprócz szybkich, krótkotrwałych efektów działania kinazy C obserwuje się też działania długoterminowe, polegające na modulacji ekspresji genów i syntezy białek.

Kinaza białkowa C wpływa na metabolizm tłuszczów, cukrów i aminokwasów, szczególnie zaś na lipogenezę i przemianę glikogenu, jako mediator insuliny i hormonu wzrostu [27, 28].

Wiele doświadczeń, przeprowadzonych *in vitro* i *in vivo* wskazuje na udział PK-C w tworzeniu cytoszkieletu i w funkcji białek kurczliwych. Między innymi kinaza C katalizuje fosforylację sprzężonych z tubuliną białek *tau*, odpowiedzialnych za jej łączenie się z aktyną [29]. PK-C fosforyluje też aktynę G, przyspieszając jej polimeryzację, inaczej niż kinaza A, która utrudnia powstawanie aktyny F [30]. Substratami PK-C jest też miozyna, a także troponiny C oraz T i kaldesmon [31, 32].

W tkankach endo- i egzokrynych PK-C jest jednym z mediatorów procesów sekrecji i egzocytozy. Uczestniczy ona w wydzielaniu hormonów przysadki (LSH, FSH, TSH, ACTH i i.), a także pośredniczy w ich działaniu na docelowe gruczoły dokrewne, m.innymi pobudzając sterydogenezę i syntezę tyroksyny [5, 32 – 34]. W procesach tych PK-C zazwyczaj współdziała z trisfosfoinozytalem i innymi przekąźnikami wtórnymi. Kinaza C pobudza sekrecję katecholoamin, kalcytoniny i parathormonu, a także i degradację tego ostatniego [35]. Sekrecja insuliny i jej

modulacja przez glukozę jest regulowana przez PK-C [36]. Kinaza C kontroluje wydzielanie enzymów i innych białek w układzie trawiennym, np. mucyny i amylazy w śliniankach, pepsyny i HCL w żołądku, amylazy i innych enzymów trzustki [37]. Enzym uczestniczy też w złożonym mechanizmie aktywacji leukocytów obojętnochłonnych w procesach zapalnych. Wykazano, że estry forbolowe pobudzają agregację, degranulację i cytotoksyczność leukocytów [38]. Procesy oksydacyjne, tak ważne w fagocytozie są ściśle zależne od stymulacji PK-C. Jej aktywatory stymulują, a inhibitory hamują produkcję jonu ponadtlenkowego oraz aktywność oksydoreduktazy NADPH i jej translokację w komórkach [26, 39].

Jednym z pierwszych poznanych efektów fizjologicznych, mediowanych przez kinazę C jest aktywacja płytek krwi, stymulowana przez trombinę, czynnik aktywujący płytki (PAF), kolagen i i. Estry forbolowe i inne aktywatory PK-C stymulują agregację płytek, sekrecję serotoniny oraz fosforylację lekkiego łańcucha miozyny i białka 40 kDa [40]. Acz niezbędna, PK-C nie jest jedynym regulatorem funkcji płytek. I tak, wpływa ona na II, ale nie wpływa na I fazę agregacji, a do pełnej aktywności konieczne są jony Ca^{2+} [5, 41]. W centralnym i obwodowym układzie nerwowym PK-C bierze udział w wydzielaniu neurotransmiterów (np. acetylocholiny, dopaminy itp), oraz pełni funkcję ich mediatorów. Przypada jej też niemała rola w modulacji stężenia jonów oraz ich transportu przez błony, tak w neuronach jak i innych komórkach. Wyniki wielu badań wskazują na to, że PK-C wpływa na stężenie wapnia za pomocą różnorodnych mechanizmów: modulacji aktywności ATPaz transportujących wapń, kanałów wapniowych sprzężonych z receptorami oraz kanałów potencjało-zależnych. PK-C wpływa też na hydrolizę fosfatydyloinozytydów a więc i na uwalnianie trisfosfoinozytolu. Działanie PK-C wiąże się zarówno z mobilizacją wapnia w komórkach, jak i z jej hamowaniem, zależnie od rodzaju pierwotnego sygnału i tkanki. W fibroblastach obserwowano blokowanie kanałów wapniowych pobudzanych przez prostaglandyny, a w hodowli neuronów PC-12 i w ganglionach – hamowanie kanałów potencjało-zależnych [42]. Sugeruje się, że mogą istnieć subpopulacje kanałów wapniowych (potencjało-zależnych) nie zależnych i zależnych od kinaz C [43]. W neuronach *Aplysia*, oraz w osteoblastach i komórkach osteosarcoma, a także w miocytach obserwowano wzmożenie dopływu wapnia pod wpływem estrów forbolowych [44].

Substratami kinaz C są białka błon uczestniczące w transporcie sodu: ATPaza transportująca Na^+ i K^+ , kanały sodowe oraz białko transportujące Na^+/H^+ . Udowodniono też modulację przepływu potasu i chlorków przez potencjało-zależne kanały w neuronach i mięśniach pod wpływem PK-C [5, 45].

Ogromne zainteresowanie budzi udział PK-C w procesach podziału i proliferacji komórek. Jednym z mechanizmów jej działania jest wspomniana już stymulacja wymiany Na^+/H^+ przez błony, prowadząca do alkalizacji cytoplazmy, poprzedzającej jak wiadomo inicjację replikacji DNA [46]. PK-C wpływa też bezpośrednio na polimerazę DNA α , aktywując ją i zwiększając wierność odczytu z matrycy [47]. Diglicerydy i estry forbolowe stymulują ekspresję genów takich

białek jak interferon, aktyna, prolaktyna, aktywator plazminogenu, dekarboksylaza histydyny i inne. Szczególne znaczenie przypisuje się modulacji ekspresji genów *c-fos* i *c-myc* przez kinazę C, gdyż wiąże się to z procesami różnicowania [5, 48]. Estry forbolowe wywołują znaczny przyrost mRNA kodowanego przez gen *c-fos* w promielocytach i przyspieszają ich różnicowanie. Działanie PK-C na ekspresję genów jest zróżnicowane dodatkowo wpływa ona na indukcję transkrypcji *c-fos* i *c-myc* przez PDGF i FGF, hamuje jednak transkrypcję indukowaną przez prostaglandyny E [42].

PK-C bierze aktywny udział w procesach proliferacji limfocytów pobudzanej przez antygeny i interleukiny: pobudza syntezę receptora II-2, przyspiesza jej uwalnianie i jest mediatorem jej działania [5, 49, 50].

Kinaza C wpływa na syntezę białek nie tylko przez regulację transkrypcji, ale i translacji: uczestniczy w fosforylacji białka rybosomalnego S6, pobudzanej przez wazopresynę i prostaglandyny F, a także w fosforylacji czynnika inicjacji IF-e2 [51, 52].

III. Rola kinazy białkowej C w autoregulacji i modulacji innych układów

Nie można rozpatrywać fizjologicznego działania kinazy C bez uwzględnienia jej modulującego wpływu na wszystkie układy regulacyjne, włącznie z tym, którego jest mediatorem. W tym ostatnim układzie działa ona jako bezpośredni autoregulator, oraz jako modulator innych składników układu (receptorów, białek G, fosfolipazy C). Diglicerydy i estry forbolowe pobudzają autofosforylację reszt serynowych domen katalitycznych i regulatorowych kinazy C, w wyniku czego wzrasta aktywność, powinowactwo do substratu i szybkość maksymalna enzymu. [53]. Aktywacja enzymu drogą autofosforylacji zachodzi sprawniej w dimerach PK-C oraz w enzymie związanym z błoną [54].

Samoregulacja układu przez PK-C może zachodzić też drogą fosforylacji receptora sygnałów pierwotnych. Kinaza C, aktywowana drogą stymulacji adrenergicznego receptora α_1 katalizuje fosforylację peptydu 40 kDa tego receptora, czego wynikiem jest zmniejszenie liczby miejsc wiążących hormony i zahamowanie stymulacji receptora [55]. PK-C hamuje też receptor EGF, fosforylując jego C-końcowe domeny [56]. W tym przypadku jest to jednak działanie krótkotrwałe, gdyż PK-C wywołuje też wzmożoną ekspresję genu, co prowadzi do zwiększenia liczby receptorów EGF w błonach [57]. W niektórych układach wykluczono możliwość działania PK-C na receptory, i przypuszcza się, że autoregulacyjne blokowanie układu zachodzi drogą fosforylacji białek G oraz hamowania ich interakcji z fosfolipazą C. Taki mechanizm postuluje się w przypadku pobudzania aktywności PK-C przez trombinę w fibroblastach oraz receptorów muskarynowego, cholinergicznego i α -adrenergicznego w astrocytach [58, 59].

Kinaza białkowa C jest też modulatorem innych układów regulacyjnych. Wzajemna modyfikacja działania kinaz białkowych A i C może zachodzić na

poziomie substratu. Jak już wspomniano, w niektórych białkach reszty seryn i treonin mogą być fosforylowane przez obydwie kinazy, można więc mówić o ich konkurencji o substrat. Tam gdzie fosforylacji ulegają inne reszty, można sądzić, że efekt jednej z kinaz może być osłabiany lub wzmacniany przez dodatkową fosforylację substratu. Wzajemne oddziaływanie układów regulacyjnych może być też daleko bardziej skomplikowane i zachodzić na poziomie receptorów, białek G i efektorów. Oddziaływanie to może być synergiczne (jednokierunkowe) lub antagonistyczne (dwukierunkowe) [5, 60]. Działanie synergiczne, przy którym kinaza C wzmagala syntezę cAMP i/lub aktywność kinaz A obserwowano w wielu tkankach: szyszynce, przysadce, limfocytach, mięśniach gładkich, korze mózgu itp. Np. noradrenalina związana z receptorem α_1 pobudzając PK-C wielokrotnie zwiększała produkcję cAMP, stymulowaną przez receptor β -adrenergiczny [11]. Podobnie wazopresyna i angiotensyna II stymulują aktywację cykazy adenylanowej pośrednio, przez kinazę C [61]. Antagonistyczne działanie PK-C na układ kinaz A obserwowano w neutrofilach, limfocytach T, płytkach krwi i jajnikach [60].

Początkowo typ wzajemnego oddziaływania kinaz białkowych A i C wiązano głównie z rodzajem tkanki, obecnie jednak coraz więcej danych wskazuje na związek z rodzajem sygnału pierwotnego. W leukemicznej linii komórek T aktywacja kinazy C potęguje syntezę cAMP indukowaną przez adenozyne, hamuje zaś syntezę indukowaną przez prostaglandyny [62]. W płytkach krwi estry forbolowe hamują produkcję cAMP indukowaną przez prostaglandynę D_2 , nie okazując wpływu na syntezę stymulowaną przez prostaglandyny I_2 i F_2 , adenozyne i adrenalinę [63]. Nie wyklucza się bezpośredniego wpływu PK-C na cyklazę adenylanową, coraz więcej autorów skłania się jednak ku myśli, że w wielu przypadkach wzajemnych oddziaływań przyczyn szukać należy w modulacji białek G. Skoro w aktywacji fosfolipazy C, indukującej aktywację kinaz C uczestniczą podjednostki β/γ białek G, to jednocześnie może zachodzić oddziaływanie podjednostki α (dodatnie lub ujemne) z cyklazą adenylanową. Możliwa jest też fosforylacja białek G_s i G_i przez PK-C.

Ze swej strony kinazy A wpływają też na kinazę C. W wysepkach Langerhansa i w przysadce obserwowano działanie synergiczne, w płytkach, neutrofilach i limfocytach – antagonistyczne. Działanie to może mieć charakter zróżnicowany: w mieloblastach wzrost ilości cAMP i aktywności kinaz A idzie w parze z hamowaniem cytoplazmatycznej formy kinazy C, pozostając bez wpływu na formę związaną z błoną [60].

Kinaza C jest modulatorem układu cykazy guanylanowej. Uważa się, że czynniki aktywujące PK-C są ujemnymi regulatorami cykazy, indukowanej przez ANF. Wiadomo też, że ANF wpływa hamująco na fosforylację kinazy C, przy czym jest to droga nie zależna od cGMP [64, 65].

Kinaza białkowa C katalizuje fosforylację różnorodnych receptorów błonowych, np. receptora transferyny, somatomedyny C, komplementu i antygenów, receptorów alfa- i beta-adrenergicznych i innych. Przyczynia się to do internalizacji ufosforylowanych receptorów do wnętrza komórki [66]. Przypisuje się temu procesowi szczególne znaczenie, gdyż internalizacja stymulowana z udziałem

PK-C nie prowadzi do rozkładu hydrolitycznego receptorów, ale do ich recykliczacji i ponownego osadzania w błonach. Kinaza C może być głównym modulatorem recykliczacji [67].

Jak widać z przytoczonych przykładów kinaza białkowa C jest składnikiem wzajemnie powiązanych układów regulacyjnych. Badania zależności wzajemnych różnych układów transmisji sygnałów są dopiero w załączku, ale można oczekiwać ich pomyślnego rozwoju i pełnego wyjaśnienia skomplikowanych mechanizmów regulacji w ustroju.

Artykuł otrzymano 15 sierpnia 1988 r.

Zaakceptowano do druku 28 grudnia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Nishizuka Y., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 163–166.
2. Savart M., Belamri M., Pallet V., Ducastaing A., (1987), *FEBS Lett.*, **216**, 22–26.
3. Buday L., Seprödi J., Farkas G., Mècháros G., Romhanyi T., Banhegyi G., Mandl J., Antoni F., Faragó A., (1987), *FEBS Lett.*, **223**, 15–19.
4. Kwiatkowska J., (1986), *Post.Biochem.*, **32**, 329–334.
5. Nishizuka Y., (1986), *Science*, **233**, 305–311.
6. Villalba M., Kelly K. L., Mato J. M., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **968**, 69–76.
7. Saltiel A. R., Sherlines P., Fox J. A., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1116–1121.
8. Kerr D. E., Kissinger L. F., Gentry L. E., Purchio A. F., Shoyab M., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 776–782.
9. Murakami K., Whiteley M. K., Routtenberg A., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 13902–13906.
10. Slivka S. R., Insel P. A., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 4200–4207.
11. Ho A. K., Klein D. C., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 11764–11770.
12. Parker J., Daniel L. W., Waite M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 5385–5393.
13. Halsey D. L., Girard P. R., Kuo J. F., Blackshear P. J., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2234–2243.
14. Deli E., Kiss Z., Wilson E., Lambeth J. D., Kuo J. F., (1987), *FEBS Lett.*, **221**, 365–369.
15. Walaas S. I., Horn R. S., Adler A., Albert K. A., Walaas O., (1987), *FEBS Lett.*, **220**, 311–318.
16. Ishizuka T., Ito Y., Kajita K., Miura K., Nagao S., Nagata K., Nozawa Y., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 551–559.
17. Darbon J. M., Oury F., Clamens S., Bayard F., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 537–546.
18. Fabbro D., Regazzi R., Costa S. D., Borner Ch., Eppenberger U., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 65–73.
19. Gopalakrishna R., Barsky S. H., Thomas T. P., Anderson W. B., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 16438–16445.
20. Ginsberg J., Murray P. G., Parente J. F., Wong K., (1988), *FEBS Lett.*, **226**, 223–226.
21. Bonvini E., Ruscetti F. W., Ponzoni M., Hoffman T., Farrar W. L., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 4160–4164.
22. Lang U., Valloton M. B., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 8047–8050.

23. Cooper D. R., Konda T. S., Standaert M. L., Davis J. S., Pollet R. J., Farese R. V., (1987), **262**, 3633–3639.
24. Pershadsingh H. A., Shade D. L., McDonald J. M., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 1384–1389.
25. Richter E. A., Cleland P. J. F., Rattigan S., Clark M. G., (1987), *FEBS Lett.*, **217**, 232–236.
26. Tauber A. I., (1987), *Blood.*, **69**, 711–720.
27. Smal J., De Meyts P., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1232–1240.
28. Vaartjes W. J., de Haas C. G. M., Geelen M. J. H., Bijleveld C., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 135–140.
29. Hoshi M., Nishida E., Miyata Y., Sakai H., Miyoshi T., Ogawara H., Akiyama T., (1987), *FEBS Lett.*, **217**, 237–241.
30. Ohta Y., Akiyama T., Nishida E., Sakai H., (1987) *FEBS Lett.*, **222**, 305–310.
31. Worotnikow A. B., Rysnik B. B., Gusiew N. B., (1988), *Biochimia*, **53**, 31–40.
32. Liechtfield D. W., Ball E. H., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 8054–8060.
33. Wang J., Leung P. C. K., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 939–944.
34. McArdle C. A., Huckle W. R., Conn P. M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 5028–5035.
35. Yamaguchi T., Baba H., Fukase M., Kinoshita Y., Fujimi T., Fujita T., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 539–544.
36. Stutchfield J., Jones P. M., Howell S. L., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 1001–1006.
37. Hermelin B., Cherqui G., Bertrand F., Wicek D., Paul A., Garcia I., Picard J., (1988), *FEBS Lett.*, **229**, 161–166.
38. Gavioli R., Spisani S., Giuliani A., Traniello S., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 1290–1294.
39. Salzer W., Gerard C., McCall Ch., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 747–754.
40. Naka M., Nishikawa M., Adelstein R. S., Hidaka H., (1983), *Nature*, **306**, 490–492.
41. Hannun Y. A., Greenberg Ch. S., Bell R. M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 13620–13626.
42. Yamashita T., Takai Y., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 5536–5539.
43. Messing R. O., Carpenter C. L., Greenberg D. A., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 1049–1056.
44. Yamaguchi D. T., Kleeman Ch. R., Muallem S., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 14967–14973.
45. Brinkmeier H., Jockusch H., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 1383–1389.
46. Paris S., Pouysségur J., (1986), *EMBO J.*, **5**, 55–60.
47. Krauss S. W., Mochly-Rosen D., Koshland D. E. Jr., Linn S., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3432–3435.
48. Kaibushi K., Tsuda T., Kikuchi A., Tanimoto T., Yamashita T., Takai Y., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1187–1192.
49. Clark R. B., Love J. T., Sgroi D. S., Lingenheld E. G., Sha'afi R. I., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 666–672.
50. Beckner S. K., Farrar W. L., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 176–182.
51. Pelech S. L., Krebs E. G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 11598–11606.
52. Clark S. J., Colthurst D. R., Proud Ch. G., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **968**, 211–219.
53. Mochly-Rosen D., Koshland D. E. Jr., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2291–2297.
54. Huang K. P., Chan K. F. J., Singh T. J., Nakabayashi H., Huang F. L., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 12134–12140.

55. Leeb-Lundberg L. M. F., Cotecchia S., DeBlasi A., Caron M. G., Lefkowitz R. J., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3098–3105.
56. Pandiella A., Vicentini L. M., Meldolesi J., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 145–151.
57. Bjorge J. D., Kudlow J. E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 6615–6622.
58. Paris S., Pouysségur J., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1970–1976.
59. Orellana S., Solski P. A., Brown J. H., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1638–1643.
60. Narindrasorasak S., Brickenden A., Ball E., Sanval B. D., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 10497–10501.
61. Abou-Samra A. B., Harwood J. P., Manganiello V. C., Catt K. J., Aguilera G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1129–1136.
62. Nordstedt C., Jondal M., Fredholm B. B., (1987), *FEBS Lett.*, **220**, 57–60.
63. Bushfield M., Hopple S. L., Gibson J. F., Murdoch F. A., MacIntyre D. E., (1987), *FEEBS Lett.*, **222**, 299–304.
64. Pandey K. N., Ingami T., Girard P. R., Kuo J. F., Misono K. S., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 589–595.
65. Jaiswal R. K., Jaiswal N., Sharma R. K., (1988), *FEBS Lett.*, **227**, 47–50.
66. Minami Y., Samelson L. E., Klausner R. D. (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 13342–13347.
67. Nachiya H. L., Takayama S., White M. F., King G. L., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 6417–6424.

521. ...
 R. I. ...
 522. ...
 523. ...
 524. ...
 525. ...
 526. ...
 527. ...
 528. ...
 529. ...
 530. ...
 531. ...
 532. ...
 533. ...
 534. ...
 535. ...
 536. ...
 537. ...
 538. ...
 539. ...
 540. ...
 541. ...
 542. ...
 543. ...
 544. ...
 545. ...
 546. ...
 547. ...
 548. ...
 549. ...
 550. ...
 551. ...
 552. ...
 553. ...
 554. ...
 555. ...
 556. ...
 557. ...
 558. ...
 559. ...
 560. ...
 561. ...
 562. ...
 563. ...
 564. ...
 565. ...
 566. ...
 567. ...
 568. ...
 569. ...
 570. ...
 571. ...
 572. ...
 573. ...
 574. ...
 575. ...
 576. ...
 577. ...
 578. ...
 579. ...
 580. ...
 581. ...
 582. ...
 583. ...
 584. ...
 585. ...
 586. ...
 587. ...
 588. ...
 589. ...
 590. ...
 591. ...
 592. ...
 593. ...
 594. ...
 595. ...
 596. ...
 597. ...
 598. ...
 599. ...
 600. ...

JERZY KAWIAK*

Wpływy estrów forbolu na funkcje komórek

Influence of phorbol esters on cell functions

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Jak bada się wpływ estrów forbolu na funkcje komórek
- III. Czas od zadziałania estrem forbolu do odpowiedzi komórki zależy od długości szlaków metabolicznych
- IV. Estry forbolu mogą wpływać na błonowe układy transdukcji sygnałów i endocytozę
- V. Estry forbolu zmieniające transporty przez błony
- VI. Wpływ estrów forbolu na różnicowanie komórek
- VII. Przenoszenie sygnałów z plazmolemy do jądra komórkowego; podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. How to test influence of phorbol esters on cell functions
- III. Time from phorbol ester treatment to cellular response depends on length of metabolic pathways
- IV. Phorbol esters may influence membrane signal transduction systems and endocytosis
- V. Phorbol esters change membrane transports
- VI. Influence of phorbol esters on cell differentiation
- VII. Transduction of signals from plasmolemma to cell nucleus; summary

Wykaz stosowanych skrótów: TPA – 12-0-tetradekanoylo 13-acetylo forbol, PDBu – 12, 13-dibutyrylo forbol, 4 PDD – 12, 13-didekanoylo 4 forbol, IL-2 – interleukina-2, IL-2R – receptor interleukiny-2, EGF – naskórkowy czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor), EGF-R – receptor naskórkowego czynnika wzrostu

I. Wprowadzenie

Estry forbolu są wykorzystywane jako narzędzie dla poznania biologicznych funkcji kinazy C. Działanie estrów forbolu polega na aktywacji kinaz białkowych C zarówno *in vitro*, w oczyszczonych preparatach tego enzymu [1, 2, 3], jak również *in vivo*, w komórkach [4, 5]. Estry forbolu wnikają do komórki i aktywują kinazy C

* Prof. dr hab., Zakład Cytofizjologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

omijając drogę fizjologicznej aktywacji tego enzymu. Zwykle aktywacja ta następuje poprzez ligand, jego receptor błonowy, białka G, fosfolipazę C i produkty jej aktywności diacyloglicerole. Inny produkt aktywności fosfolipazy C, 1, 4, 5-trisfosfoinozytol, przenika do cytoplazmy i oddziałuje z siateczką śródplazmatyczną uwalniając z niej Ca^{2+} [6, 7]. Diacyloglicerole aktywują kinazy C, ale ich działanie jest krótkotrwałe, bo podlegają szybkim przemianom. Ester forbolu wiążący się z kinazą C w tym samym miejscu co diacyloglicerol jest metabolizowany stosunkowo wolno [5]. Dlatego stan aktywności kinazy C wywołany przez estry forbolu trwa długo. Warto pamiętać, że w krótkim doniesieniu [8] opisano działanie estru forbolu na komórki nie związane z aktywacją kinazy C.

Większe zainteresowanie estrami forbolu zaczęło się w latach pięćdziesiątych od prac Berenbluma [9], który zajmował się etapowym rozwojem nowotworów. Opisał on doświadczenia, w których podawał na skórę myszy 3-metylocholanantren w dawkach nie wywołujących nowotworu ale powodujących transformację nowotworową komórek naskórka. Po tym pierwszym etapie, jeszcze bez objawów wzrostu nowotworowego, podawał wielokrotnie olejek krotonowy na to samo miejsce skóry. To dopiero z dużą regularnością prowadziło do wzrostu nowotworu. Olejek krotonowy nie zawiera karcynogenów, a jego działanie określano jako promocyjne. Substancjami czynnymi w olejku krotonowym okazały się estry forbolu, o których dzisiaj wiemy, że są aktywatorami kinazy białkowej C. Najlepiej poznane ze względu na silne działanie promocyjne są 12-0-tetradekanoylo 13-acetylo forbol (TPA albo PMA) oraz 12, 13-dibutyrylo forbol (PDBu). Znane są także nieaktywne estry forbolu jak np. 12, 13-didekanoylo 4- α forbol (4 α PDD), nie powodujące promocji nowotworów w stężeniach zwykle stosowanych u myszy. Ponadto jest znana grupa związków naśladujących działanie estrów forbolu. Są one również promotorami nowotworów i konkurują o te same miejsca wiążące w komórce, ale mają zupełnie różną budowę. Przykładem mogą być teleocidyna B, alkaloid izolowany ze *Streptomyces* [10, 11] i mezereina [4].

Skóra myszy okazała się wyjątkowo dobrym materiałem dla tego rodzaju badań ze względu na brak w niej hydrolaz estrów forbolu [12]. W skórze chomika, szczura, świnki morskiej, królika obecność tych hydrolaz skutecznie zmniejsza promocyjne działanie estrów forbolu mimo podobnego poziomu kinazy C w skórze tych zwierząt. Wiadomo obecnie, że działanie promocyjne estrów forbolu nie zależy od zdolności wywoływania przez nie odczynów zapalnych. Okazało się bowiem, że czynnik wywołujący zapalenie w 100 razy niższym stężeniu niż TPA jak resiniferotoksyna nie jest promotorem nowotworów [13]. Wobec tego te dwie aktywności biologiczne można rozdzielić.

II. Jak bada się wpływ estrów forbolu na funkcje komórek

W tym przeglądzie chciałbym ograniczyć się do opisu odpowiedzi całych komórek na działanie estrów forbolu. Zwykle takie doświadczenia prowadzi się z komórkami hodowanymi *in vitro*. Pozwala to bliżej określić rodzaj komórek, ich

stan przed i po doświadczeniu, stężenie estru forbolu i czas jego działania, stężenie równocześnie działających innych czynników, jak również umożliwia bardziej precyzyjny pomiar odpowiedzi komórek. Wykorzystuje się pierwotne i wtórne hodowle komórek, bądź linie komórkowe. Interpretacja otrzymanych wyników polega zwykle na porównaniu obserwowanych odpowiedzi komórek na ester forbolu o działaniu promocyjnym z reakcją na ester nie mający takiego działania, który nie aktywuje kinaz C. Na przykład w doświadczeniu na wtórnych osteoblastach mysich hodowanych *in vitro* próbowano ustalić, jakie białka są fosforylowane w wyniku aktywacji kinazy C estrem forbolu (nie publikowane). Ester forbolu dodawano do hodowli, których komórki zawierały zsyntetyzowany ^{32}P -ATP. Komórki homogenizowano i wykonywano autoradiogramy fosforylowanych ^{32}P -białek komórkowych rozdzielonych elektroforetycznie i pochodzących z komórek traktowanych TPA oraz z innych hodowli traktowanych 12, 13-didekanoylo 4 α -forbolem (4 α PDD), a więc nieaktywnym promotorem estrem. W obu rozdziałach było ponad 30 ufosforylowanych białek. Tylko te ufosforylowane białka, które znaleziono w preparacie traktowanym TPA, a których nie było w preparacie traktowanym 4 α PDD uznano za wynik działania kinazy C aktywowanej w komórce. Białka te miały Mr 100, 80, 70, 64, 56 kD.

Stężenie i czas działania estru forbolu ma zasadnicze znaczenie dla odpowiedzi komórki. Najczęściej stosuje się stężenia TPA i PDBu od 1 do 100 nM [5, 6, 16] oraz krótki, trwający minuty czas działania. Wyższe stężenie estru forbolu bądź przedłużenie czasu jego działania do godzin powoduje spadek ilości cząsteczek kinaz C w komórce [17] mierzony zdolnością wiązania ^3H -PDBu przez komórki [5]. Działanie długotrwałe i dużymi stężeniami estru forbolu powoduje rozpad i wyczerpanie w komórce zapasów kinaz C (18). Bowiern aktywowane cząsteczki kinazy C podlegają proteolizie przy udziale proteinaz zależnych od Ca^{2+} , kalpain [19].

Poziom kinazy C w komórce, aktualne jej rozmieszczenie oraz obecne wewnątrzkomórkowe substraty warunkują odpowiedź komórki na aktywację enzymu estrem forbolu. Tak określony stan komórki może podlegać zmianom. Na przykład komórki ludzkiej białaczki mieloidalnej HL-60 pod wpływem dodania do środowiska hodowlanego 1,25-dihydroksy witaminy D $_3$ zwiększają poziom kinaz C [20]. Towarzyszy temu również rozplaszczanie się komórek. Insulina powoduje zwiększone powstanie diacyloglicerolu w plazmolemie miocytów hodowanych *in vitro* i w ten sposób aktywuje kinazy C (23). Traktowanie adiopocytów insuliną zwiększa poziom kinazy C we frakcji cytozolowej homogenatu komórek [21]. Podobny jest wpływ konkanawaliny A na monocyty człowieka, w których ponadto rośnie ogólny poziom enzymu (22). Różne linie komórek 3T3 transformowane onkogenem *ras* dają zmniejszoną odpowiedź na TPA mierzoną fosforylacją białka 80kD w porównaniu z komórkami nietransformowanymi (24). Zwykle tłumaczy się to tym, że białka kodowane przez onkogen *ras* są podobne do aktywnej części białek G. Stąd utrzymują one stałą aktywację fosfolipazy C i uwalnianie przez nią diacylogliceroli. To z kolei prowadzi do ciągłej aktywacji kinaz C i wyczerpania ich zapasów w komórce.

Keratynocyty skóry myszy zależnie od stanu ich zróżnicowania różnie wiążą $^3\text{H-PDBu}$, co dowodzi różnic poziomu kinazy C w komórkach [25]. Niewątpliwie stan komórek określany poziomem, uprzednią aktywacją i rozmieszczeniem kinaz C może być zmieniony przez wpływy obecnych w środowisku czynników i może modyfikować odpowiedź na działanie estrów forbolu.

Obserwowane odpowiedzi całych komórek są wypadkową działania estru forbolu, hamowania aktywności kinaz C przez ich inhibitory komórkowe np. kalmodulinę- Ca^{2+} , białko S-100 [14], jak również wpływu fosfataz fosfoprotein zmieniających ufosforylowane produkty [15]. Należy stale pamiętać o dużej złożoności zdarzeń biegnących w komórce często równocześnie, co utrudnia precyzyjną interpretację wyników.

III. Czas od zadziałania estrem forbolu do odpowiedzi komórki zależy od długości szlaków metabolicznych

Odpowiedzi komórki dobrze jest rozpatrywać w czasie upływającym od chwili dodania do środowiska estru forbolu. Pozwala to uporządkować w pewien sposób różne opisywane odpowiedzi komórek [26].

Limfocyty

Limfocyty T krwi obwodowej człowieka pozostające w fazie G_0 cyklu mitotycznego mogą zostać pobudzone mitotycznie antygenem. Podobną odpowiedź można otrzymać równoczesnym działaniem estru forbolu i jonoforu wapniowego na te komórki [27, 28]. Badano odpowiedzi limfocytów T polegające na ekspresji różnych genów, których produkty mają związek z proliferacją tych komórek. Ekspresja c-fos mRNA w komórkach była maksymalna już po 0.5 godzinie od dodania do środowiska estru forbolu i jonomycyny, natomiast c-myc mRNA po 1 godzinie. Dopiero po 3 godzinach obserwowano maksymalną ekspresję mRNA interleukiny-2 (IL-2 mRNA), czynnika wzrostu limfocytów T, a mRNA receptora IL-2 (IL-2R mRNA) dopiero po okresie dłuższym niż 24 godziny. Komórki mysiej linii tymoma EL4 po 12 godzinach od zadziałania PDBu maksymalnie syntetyzują IL-2 mRNA [29], a więc nieco później. Stwierdzono, że chodzi o syntezę nowego IL-2 mRNA, a nie o większą stabilność tych cząsteczek. Takiej odpowiedzi nie obserwuje się bowiem w komórkach traktowanych nieaktywnym analogiem użytego forbolu. Ekspresję IL-2 mRNA można zahamować inhibitorami syntezy białek, cykloheksimidem bądź puromycyną w okresie do 1 godziny od zadziałania estrem forbolu. W tym okresie zachodzą więc zjawiska poprzedzające transkrypcję odpowiedniego genu zależne od biosyntezy białek. Opisano także wariant komórek EL4 niewrażliwy na działanie estrów forbolu. Nie stwierdzono różnic wiązania estrów forbolu, aktywności kinazy C ani utraty aktywności kinazy C we frakcji cytosolu homogenatu komórek wariantu wrażliwego i niewrażliwego. Mimo to brak jest syntezy IL-2 mRNA po działaniu estrem forbolu na komórki wariantu

EL4 niewrażliwego, co może świadczyć o braku przekazywania sygnału z kinaz C do układu transkrypcji bądź translacji. Ogólnie można więc powiedzieć, że ekspresja poszczególnych genów mających związek z proliferacją limfocytów T zachodzi w różnej sekwencji czasowej w komórkach dwóch różnych rodzajów oraz, że dość późno po zadziałaniu estrów forbolu zachodzi synteza IL-2, która prawdopodobnie zależy od przekazania sygnału z kinaz C do jądra komórkowego. Sygnał ten jest przenoszony przez cząsteczki białka syntetyzowane w pierwszej godzinie po zadziałaniu PDBu.

Komórki z receptorami naskórkowego czynnika wzrostu

Wczesną odpowiedzią komórek na TPA, obserwowaną już po kilku minutach, jest fosforylacja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGF-R) na Thr 654 [31]. Powoduje to zahamowanie aktywności kinazy tyrozynowej EGF-R oraz zmniejszenie jego powinowactwa do EGF [31, 32, 33]. Natomiast, podobnie jak w przypadku receptora interleukiny 2, również ekspresja genu receptorów EGF w komórkach linii MDA 468 (ludzkiego raka sutka) zachodzi po długim okresie od zadziałania estrem forbolu [30]. Maksymalną syntezę prekursora EGF-R w tych komórkach obserwuje się po 8 godzinach. Tak więc również w przypadku naskórkowego czynnika wzrostu obserwuje się sekwencję czasową różnych odpowiedzi.

IV. Estry forbolu mogą wpływać na błonowe układy transdukcji sygnałów i endocytozę

Estry forbolu poprzez aktywację kinaz C mogą zmieniać działanie błonowych układów transdukcji sygnałów [34]. Wpływ ten między innymi zależy od fosforylacji receptorów błonowych cząsteczek sygnałowych.

Receptory związane z aktywnością kinaz białkowych

Oprócz wspomnianego już wpływu na EGF-R, estry forbolu zwiększają fosforylację receptorów insuliny i somatomedyny C [35]. Fosforylacja receptora insuliny powoduje mniejsze wiązanie insuliny przez komórki [36] i zmniejszoną aktywność kinazy tyrozynowej receptora insuliny. Również receptor limfocytów T (komórek linii LSTRA) będący kinazą białkową tyrozynową (pp56^{Tcell}) jest fosforylowany pod wpływem estrów forbolu na reszcie Ser i ma zahamowaną aktywność kinazy tyrozynowej [37].

Receptory sprzęgane przez białka G

Podobnie pod wpływem estru forbolu, a więc poprzez aktywację kinaz C, są fosforylowane receptory sprzęgane przez białka G [34]. Na przykład komórki mięśniowe gładkie traktowane estrem forbolu w hodowli mają ufosforylowane i

„odczulone” receptory $\alpha 1$ -adrenergiczne; to samo dotyczy receptorów cholinergicznego muskarynowego i β -adrenergicznego w innych komórkach.

Regulacja metabolizmu fosforanów inozytoli

TPA blokuje stymulowane karbacholem tworzenie fosforanów inozytoli w komórkach [59], co mogło by świadczyć, że kinaza C przez sprzężenie zwrotne reguluje metabolizm fosfoinozytoli.

Endocytoza

Estry forbolu regulują też endocytozę receptorów i ich krążenie. Duże stężenia TPA powodują w komórkach linii ludzkiej białaczki K562 zmniejszenie biosyntezy receptorów transferyny do 10–20% wartości w kontroli [38]. Receptory transferyny [38, 39] oraz asjaloglikoprotein w komórkach hepatoma [39] przemieszczają się do cytoplazmy pod wpływem estrów forbolu będących promotoraми. Odpowiedź ta zależy od temperatury i dawki estru forbolu, ale nie wywołuje jej 4-PDD. W ciągu 10 minut zmniejsza się wiązanie obu rodzajów ligandów do receptorów. W przypadku receptorów transferyny jest to spowodowane przesuwaniami ich do wnętrza komórki, a w przypadku receptorów asjaloglikoprotein – zmniejszonym powinowactwem do ligandu. W makrofagach natomiast pod wpływem estru forbolu obserwowano wzrost liczby receptorów różnych ligandów np. diFe-transferyny, kompleksu $\alpha 2$ -makroglobuliny – trypsyny bądź mannozylowanej albuminy surowicy bydłowej [40]. Jest to spowodowane zahamowaniem przesuwania receptorów do wnętrza komórki i równoczesnym przyspieszeniem krążenia receptorów między plazmolemą, a przedziałem rozprężania receptorów i ligandów (CURL).

V. Wpływ estrów forbolu na transporty przez błony

Estry forbolu zmieniają transport glukozy, aminokwasów i różne transporty jonowe.

Transport glukozy

Trzeba około 5 godzin preinkubacji z estrem forbolu dla zaobserwowania maksymalnego wzrostu pobierania 2-deoksyglukozy przez komórki glejowe [41]. Podobny wzrost transportu glukozy pod wpływem PDBu obserwowano w komórkach linii 3T3 Swiss [42], ale brak jest tego wpływu na hodowane *in vitro* neurony (41). Ponieważ aktywacja kinaz C estrem forbolu zachodzi szybko, a wzrost transportu glukozy jest wolny, można domyślać się, że część tej odpowiedzi zależy od syntezy białka transportującego cukier. Rzeczywiście w komórkach linii 3T3 Swiss stwierdzono zahamowanie tej odpowiedzi cykloheksimidem.

Transport aminokwasów

W nie dzielących się komórkach nabłonkowych nerki LCC-PK1 hodowanych *in vitro* szybkość działania układu transportu aminokwasów zależnego od Na^+ (układ A) jest mała [42A]. Mierzy się tę szybkość pobieraniem przez komórki kwasu ^{14}C -metyloaminoizomasłowego w jednostce czasu. Po okresie preinkubacji w środowisku bez surowicy i aminokwasów, ale w obecności glukozy, komórki odpowiadają na TPA krótkotrwałym wzrostem aktywności układu A. Transport powraca do poziomu kontroli po 10–20 minutach. Po 30 minutach rozpoczyna się jednak wtórny duży i trwający długo zwiększony transport. Wstępna odpowiedź prawdopodobnie bezpośrednio zależy od fosforylacji regulatora bądź transportera aminokwasów przez kinazę C, natomiast odpowiedź późna zależy od syntezy nowego białka. Ten wtórny, zwiększony transport aminokwasów również we wczesnym etapie prawdopodobnie jest związany z fosforylacją jakiegoś bliżej nie określonego czynnika.

Wymiana Na^-/H^+

Transporty jonowe często są ze sobą sprzężone. TPA zwiększa napływ jonów Na^+ do komórek linii 3T3 (Swiss) mierzony w obecności ouabainy, inhibitora pompy Na^+/K^+ , dla zapobieżenia wtórnemu wyrzucaniu tych jonów [42, 43]. Odpowiedź ta jest maksymalnie nasiloną po 1–1.5 godzinach od zadziałania TPA i jest ona widoczna również bez ouabainy. Zwiększony napływ jonów Na^+ do komórki wtórnie zwiększa aktywność pompy Na^+/K^+ , co prowadzi do usuwania z cytoplazmy Na^+ i zastąpienia ich przez K^+ . Ten wtórny efekt można stosunkowo łatwo mierzyć zwiększeniem transportu $^{86}\text{Rb}^+$ do komórki. Można też jonoforem – monenzyną, która ma 10-krotnie większe powinowactwo do Na^+ niż do K^+ zwiększyć napływ do komórki Na^+ . W tych warunkach TPA nie zwiększa już transportu $^{86}\text{Rb}^+$. Na tej podstawie wnioskowano, że w warunkach pełnej aktywacji pompy Na^+/K^+ ester forbolu nie może już dodatkowo zwiększyć działania pompy.

Stosunkowo szybką odpowiedzią na działanie estru forbolu jest chwilowa zmiana objętości komórki, co jest spowodowane wzmożonym pobieraniem Na^+ do komórki układem wymiany Na^+/H^+ [44, 45, 45A]. Podobną odpowiedź wywołują niektóre czynniki wzrostu np. PDGF [45]. Układ wymiany jonów Na^+/H^+ jest wbudowany w plazmolemę [46]. Wzmożona wymiana Na^+/H^+ pod wpływem czynników wzrostu może powodować podwyższenie pH cytoplazmy komórki co najmniej o około 0.15 jednostki. Maksimum tego podwyższenia obserwuje się już po 10 minutach i trwa ono 1 godzinę bądź dłużej od dodania mitogenu. Podobnie zwiększoną już po 10 minutach aktywność wymiennika Na^+/H^+ pod wpływem estru forbolu obserwowano w różnych komórkach, między innymi w komórkach neuroblastoma myszy [48, 49] i również powodowało to zmiany pH w komórce oraz czasem prowadziło do mitoz. Sugerowano, że pobudzenie wymiany Na^+/H^+ jest konieczne dla stymulacji proliferacji komórek [50], ale wydaje się, że nie wystarcza do rozpoczęcia mitozy.

Kotransport $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Cl}^-$

W komórkach linii BALB/c 3T3 określonych jako preadipocyty, bardzo wczesnie po zadziałaniu TPA następuje zahamowanie pobierania $^{86}\text{Rb}^+$ [51]. Jest to więc odpowiedź przeciwna tej, jaką obserwuje się w komórkach 3T3 Swiss wykazujących wzrost szybkości transportu $^{86}\text{Rb}^+$ do cytoplazmy wywołany przez TPA [42, 43]. Układ transportu hamowany przez TPA w komórkach linii BALB/c 3T3 nie jest wrażliwy na ouabainę, ale jest hamowany furosemidem. Jest to układ kotransportu $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Cl}^-$. Badano też linię mutanta komórek BALB/c 3T3, w której TPA nie hamuje wrażliwego na furosemid transportu $^{86}\text{Rb}^+$ do komórek [52]. W tych komórkach TPA nie indukuje wzrostu aktywności dekarboksylazy ornitynowej obserwowanego w linii rodzicielskiej odpowiadającej na ester forbolu. Sugerowano, że szybkie zmiany przepływu jonów przy udziale układu kotransportu $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Cl}^-$ są konieczne dla występowania zmian ekspresji genów w komórkach odpowiadających na TPA. Ten układ kotransportu $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Cl}^-$ ma również wtórny związek z odpowiedzią mitotyczną wspomnianych komórek [53]. Linie komórek z zaburzonym układem kotransportu nie odpowiadają bądź słabo odpowiadają wzrostem liczby komórek lub włączaniem ^3H -tymidyny do jąder komórkowych w porównaniu z komórkami rodzicielskimi ze sprawnym układem.

Transport Mg^{2+}

W komórkach chłoniaka S49 myszy ester forbolu stymuluje bardzo silnie napływ jonów Mg^{2+} bez zmiany wypływu Mg^{2+} i transportu jonów Ca^{2+} (54). Stężenie równe połowie maksymalnego dla tej odpowiedzi wynosi 10 nM TPA. Nie wywołuje tej odpowiedzi 4 PDD, ani też nie jest to zjawisko związane z wymianą Na^+/H^+ . Hamuje ten transport izoproterenol.

Mobilizacja Ca^{2+} wewnątrz komórki

Jednym ze skutków aktywacji kinaz C estrem forbolu jest hamowanie mobilizacji wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Obserwowano to w izolowanych hepatocytach [55], neutrofilach [56] i izolowanych komórkach gruczołów przytarczowych bydłących [57]. Te ostatnie komórki w środowisku o wysokim stężeniu Ca^{2+} (2 mM) miały zahamowany wzrost wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} pod wpływem TPA. Nie obserwowano takiej zmiany oraz zmiany wydzielania parathormonu gdy komórki umieszczono w środowisku o niskim, 0.5 mM stężeniu Ca^{2+} . Podobne obserwacje hamowania wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie pod wpływem TPA obserwowano w hodowanych liniach komórkowych [58, 59, 70].

VI. Wpływ estrów forbolu na różnicowanie komórek

Wiele przykładów omówionych w poprzednich odcinkach można przyjąć za przejawy różnicowania się komórek. Zwykle różnicowaniem nazywamy przyjmowanie pewnych specjalistycznych funkcji przez komórkę lub grupę komórek w organizmie wielokomórkowym. Te funkcje w zróżnicowanej komórce wynikają z ekspresji genów, które najczęściej są obecne również w komórkach niezróżnicowanych, bądź zróżnicowanych w innym kierunku, ale są tam nieaktywne. Do tego repertuaru specjalistycznych genów nie wlicza się genów, które zapewniają komórce podstawowe, niezbędne dla niej funkcje jak oddychanie, transport, podział komórki. Przy takich założeniach zatrzymanie podziałów przez komórkę bądź ich wznowienie nie jest przejawem różnicowania się komórki ani braku jej zróżnicowania. Artykuł przeglądowy na temat zagadnień związanych ze znaczeniem kinaz C w różnicowaniu komórek przedstawił Schwanke i wsp. [60].

Komórki ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60 rosnące *in vitro* wykorzystywano do obserwacji ich różnicowania się [10, 61, 62]. Komórki te można skłonić do dojrzewania w komórki podobne do makrofagów używając estrów forbolu [10, 61]. Sprzyja temu obecność kwasu retinowego w środowisku [63]. Dojrzewanie jest spowodowane aktywacją kinaz C. Sfinganina hamująca aktywację kinaz C w komórkach hamuje bowiem różnicowanie linii HL-60 [64]. Można też wywołać dojrzewanie tych komórek w granulocyty działaniem dimetylo sulfotlenku (DMSO) i w takich komórkach obserwowano, że TPA powoduje produkcję anionów nadtlenkowych [65]. Wzrostowi tworzenia nadtlenków i dojrzewaniu komórek HL-60 towarzyszy pojawienie się ufosforylowanych białek pp212, pp134 i pp76. Stąd przypuszcza się, że te białka biorą udział w powstawaniu anionów nadtlenkowych pod wpływem estrów forbolu podczas dojrzewania w komórki podobne do granulocytów.

Keratynocyty myszy w różnym stadium dojrzewania różnie wiążą ^3H -PDBu [5]. Mają więc różny poziom kinazy C.

VII. Przenoszenie sygnałów z plazmolemy do jądra komórkowego; podsumowanie

Skutki wywołane przez estry forbolu w komórkach nie tylko bezpośrednio zależą od aktywacji kinaz C i fosforylowania przez nie substratów, co powoduje zmianę funkcji komórki w ciągu minut, lecz także od aktywacji genów kontrolujących zjawiska odległe w czasie. Próbowano bliżej określić wspólne okolice promotorów różnych genów indukowanych estrami forbolu np. kolagenazy, stromelizyny, SV 40 [66, 67]. Okolice te mają zachowawczy element z 8 do 9 par zasad. Syntetyczne kopie tych bardzo podobnych sekwencji nukleotydowych mogą przenosić zdolności do indukcji przez TPA promotorów heterologicznych. Kopie elementów odpowiadające na TPA są rozpoznawane przez wspólne białko

komórkowe, czynnik translacji AP-1 (Activator Protein-1). Traktowanie estrem forbolu hodowanych komórek prowadzi do szybkiego 3-4-krotnego wzrostu zdolności wiązania AP-1 wywołanego mechanizmem potranslacyjnym. Sugerowano, że aktywne kinazy C związane z plazmolemą prawdopodobnie biorą udział w fosforylacji AP-1. To ufosforylowane białko tworzy z innymi białkami kompleksy [68] i pośredniczy w przenoszeniu sygnału między kinazami C związanymi z plazmolemą, a układem transkrypcji w jądrze komórkowym. Jest interesujące, że znaleziono eo najmniej 4–5 takich czynników białkowych o różnej budowie i aktywowanych przez TPA (transacting factors), ale wiążących się z podobnymi miejscami (elementami) na DNA. Taka różnorodność czynników uczestniczących w odpowiedzi na TPA stanowi zasadniczą różnicę w porównaniu z indukcją genów przez jony metali ciężkich i glikokortykoidy [69], gdzie znajdowano jedno białko pośredniczące. Różnica ta może, jak się zdaje, tłumaczyć zmienne odpowiedzi komórek na działanie estrami forbolu.

W podsumowaniu można stwierdzić, że pod wpływem estrów forbolu w komórkach są aktywowane kinazy C. Poziom i rozmieszczenie kinaz C oraz ilość i jakość dostępnych dla nich substratów zależy od rodzaju i aktualnego stanu komórki. Wcześniej działające na komórkę czynniki mogą modulować ten stan. Fosforylacja określonych białek przez kinazy C wywołuje różne odpowiedzi komórki. Odpowiedzi te obserwuje się w określonej sekwencji czasowej co pozwala domyślać się, że oprócz bezpośrednich, szybkich skutków fosforylacji białek, niektóre ufosforylowane kinazą C białka uruchamiają dłuższe szlaki metaboliczne, które w komórce są od siebie izolowane w pewien sposób. Przenoszenie sygnałów ze związanej z plazmolemą kinazy C na geny indukowane przez TPA odbywa się przy udziale kilku różnych czynników białkowych wiążących się z podobnymi elementami promotorów.

Serdecznie dziękuję dr hab. Andrzejowi Beręsewiczowi za krytyczne przeczytanie maszynopisu.

Artykuł otrzymano 15 sierpnia 1988 r.
Zaakceptowano do druku 15 grudnia 1988 r.

PIŚMIENICTWO

1. Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7847–7851.
2. Niedel J.E., Kuhn L., Vanderbark G.R., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 36–40.
3. Leach K.L., James M.L., Blumberg P.M., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4208–4212.
4. Solanki V., Slaga T.J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2549–2553.
5. Ebeling J.G., Vanderbark G.R., Kuhn L., Ganong B.R., Bell R.M., Niedel J.E., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 815–819.
6. Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J., Schulz I., (1983), *Nature*, **306**, 67–69.
7. Meyer T., Holowka D., Stryer L., (1988), *Science*, **240**, 653–656.
8. Jung L.K.L., Fu S.M., (1987), *Fed. Proc.*, **46**, 459.

9. Berenblum I., (1954), *Cancer Res.*, **14**, 471–477.
10. Fujiki H., Mori M., Nakayasu M., Terado M., Sugimura T., Moore R. E., (1981), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **78**, 3872–3876.
11. Collins M., Rosengurt E., (1982), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **104**, 1159–1166.
12. Shoyab M., Warren T. C., Todaro G. J., (1982), *Nature*, **295**, 152–154.
13. Schmidt R. J., Evans F. J., (1979), *Inflammation*, **3**, 373–380.
14. Albert K. A., (1984), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **81**, 3622–3625.
15. Shayoun N., LeVine III H., McConnell R., Bronson D., Cuatrecasas P., (1983), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **80**, 6760–6764.
16. Sando J. J., Hilfiker M. L., Salomon D. S., Farrar J. J., (1981), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **78**, 1189–1193.
17. Shenolikar S., Karbon E. W., Enna S. J., (1986), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **139**, 251–258.
18. Young S., Parker P. J., Ullrich A., Stabel S., (1987), *Biochem. J.*, **244**, 775–779.
19. Murachi T., (1983), *Trends in Biochem.Sci.*, **8**, 167–169.
20. Martell R. E., Simpson R. U., Taylor J. M., (1987), *J.Biol.Chem.*, **262**, 5570–5575.
21. Pershadsingh H. A., Shade D. L., McDonald J. M., (1987), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **145**, 1384–1389.
22. Costa-Casnellie M. R., Segel G. B., Lichtman M. A., (1985), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **133**, 1139–1144.
23. Farese R. V., Barnes D. E., Davis J. S., Standaert M. L., Pollet R. J., (1984), *J.Biol.Chem.*, **259**, 7094–7098.
24. Wolfman A., Alacara I. G., (1987), *Nature*, **325**, 359–361.
25. Dunn J. A., Jeng A. Y., Yuspa S. H., Blumberg P. M., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 5540–5546.
26. Nishizuka Y., (1986), *Science*, **233**, 305–312.
27. Kumagai N., Benedict S. H., Milles G. B., Gelfand E. W., (1987), *J. Immunol.* **139**, 1393–1399.
28. Isakov N., Altman A., (1985), *J. Immunol.*, **135**, 3674–3680.
29. Harrison J. R., Lynch K. R., Sando J. J., (1987), *J.Biol.Chem.*, **262**, 234–238.
30. Bjorge J. D., Kudlow J. E., (1987), *J.Biol.Chem.*, **262**, 6615–6622.
31. Davis R. J., Czech M. P., (1986), *Biochem.J.*, **233**, 435–441.
32. Cochet C., Gill G. N., Meisenhelder J., Cooper J. A., Hunter T., (1984), *J.Biol.Chem.*, **259**, 2553–2558.
33. Downward J., Waterfield M. D., Parker P. J., (1985), *J.Biol.Chem.*, **260**, 14538–14546.
34. Sibley D. R., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J., (1987), *Cell*, **48**, 913–922.
35. Jacobs S., Sahyoun N. E., Saltiel A. R., Cuatrecasas P., (1983), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **80**, 6211–6213.
36. Obermaier B., Ermel B., Kirsch D., Mushack J., Rattehuber E., Biemer E., Machicao F., Haring H. U., (1987), *Diabetologia*, **30**, 93–99.
37. Casnellie J. E., (1987), *J.Biol.Chem.*, **262**, 9859–9864.
38. Kohno H., Taketani S., Tokunaga R., (1986), *Cell Struct.Function*, **11**, 181–190.
39. Fallon R. J., Schwartz A. L., (1986), *J.Biol.Chem.*, **261**, 15081–15089.
40. Buys S. S., Gren L. H., Kaplan J., (1987), *J.Biol.Chem.*, **262**, 12970–12976.
41. Clarke D., Ramaswamy A., Holmes L., Mudd L., Poulakos J., Raizada M. K., (1987), *Brain Res.*, **421**, 358–362.
42. Collins M., Rosengurt E., (1982), *J.Cell.Physiol.*, **112**, 42–50.
- 42A. Dawson W. D., Cook J. S., (1988), *Membrane Biophysics III: Biological Transport*, str. 121–133. Alan R. Liss, Inc., N. York.
43. Dicker P., Rosengurt E., (1981), *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **100**, 433–441.
44. Earm Y. E., Irisawa H., (1986), *Japanese Heart J.*, **27**, 153–158.

45. Cassel D., Rothernberg P., Zhuang Y.-X., Deuel T.F., Glaser L., (1983), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **80**, 6224–6228.
- 45A. Mahnensmith R.L., Aronson P.S., (1985), *Circul.Res.*, **56**, 773–788.
46. Longoni S., Carafoli E., (1987), *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **145**, 1059–1063.
47. Debetto P., Floreani M., Carpenedo F., Luciani S., (1987), *Life Sci.*, **40**, 1523–1530.
48. Moolenaar W.H., Tertoolen L.G.J., DeLaat S.W., (1984), *Nature*, **312**, 371–374.
49. Burns C.P., Rosengurt E., (1983), *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **116**, 931–938.
50. L'Allemain G., Paris S., Pouyssegur J., (1984), *J.Biol.Chem.*, **259**, 5809–5815.
51. O'Brien T.G., Krzeminski K., (1983), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **80**, 4334–4338.
52. Sussman I., Prettyman R., O'Brien T.G., (1985), *J.Cell.Biol.*, **101**, 2316–2323.
53. O'Brien T.G., Prettyman R., (1987), *J.Cell.Physiol.*, **130**, 377–381.
54. Grubbs R.D., Maguire M.E., (1986), *J.Biol.Chem.*, **261**, 12550–12554.
55. Lynch C.J., Charest R., Bocckino S.B., Exton J.H., Blackmore P.F., (1985), *J.Biol.Chem.*, **260**, 2844–2851.
56. Nacchache P.H., Molski T.F.P., Borgeat P., White J.R., Shaafi R.I., (1985), *J.Biol.Chem.*, **260**, 2125–2131.
57. Nemeth E.F., Wallace J., Scarpa A., (1986), *J.Biol.Chem.* **261**, 2668–2674.
58. DiVirgilio F., Pozzan T., Wollheim C.B., Vicentini L.M., Meldolesi J., (1986), *J.Biol.Chem.*, **261**, 32–35.
59. Orellana S.A., Solski P.A., Brown J.H., (1985), *J.Biol.Chem.*, **260**, 5236–5239.
60. Schwanke N., LeBouffant F., Doree M., LePeuch C.J., (1985), *Biochemie*, **67**, 1103–1110.
61. Vanderbark G.R., Kuhn L., Niedel J.E., (1984), *J. Clin. Incest.*, **73**, 448–457.
62. Kikuchi A., Kozawa O., Hamamori Y., Kaibuchi K., Takai Y., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 3401–3406.
63. Zyber-Katz E., Knode M.C., Glaser R.I., (1987), *Leukemia Res.*, **10**, 1425–1432.
64. Merrill A.H., Jr., Sereni A.M., Stevens V.L., Hannun Y.A., Bell R.M., Kinkade J.M., (1986), *J.Biol.Chem.*, **261**, 12610–12615.
65. Gaut J.R., Carchman R.A., (1987), *J.Bioch.Chem.*, **262**, 826–834.
66. Jonat C., Herrlich P., Karin M., (1987), *Cell*, **49**, 729–739.
67. Chiu R., Immagawa M., Imbra R.J., Bockoven J.R., Karin M., (1987), *Nature*, **329**, 648–651.
68. Franza B.R., Jr., Rauscher III F.J., Josephs S.F., Curran T., (1988), *Science*, **239**, 1150–1153.
69. Karin M., Haslinger A., Holtgrave H., Richards R.I., Krauter P., Westphal H.M., Beato M., (1984), *Nature*, **308**, 513–519.
70. Thompson M., Hughes L., Hickman J., (1988), *Cancer Res.*, **48**, 2707–2710.

Addendum

Notatka dopisana w styczniu 1989.

Do transkrypcji łańcucha kappa (κ) w limfocytach B konieczna jest obecność aktywnego czynnika transkrypcyjnego, NF- κ B, który wiąże się z enhancerem (wzmacniaczem) transkrypcji. W komórkach nie wykazujących ekspresji łańcucha κ immunoglobulin, czynnik transkrypcyjny występuje w cytoplazmie w formie nieaktywnej, związanej z hamującym białkiem (I κ B) o Mr 60 000 – 70 000. Kinaza

C aktywowana estrem forbolu powoduje w komórce (*in vivo*) przekształcenie nieaktywnej formy NF- κ B w aktywną, prawdopodobnie przez fosforylację inhibitora, oraz translokację już aktywnej formy NF- κ B z cytoplazmy do jądra. W jądrze czynnik transkrypcyjny wiąże się z docelowym enhancerem transkrypcji. (Baeuerle P. A., Baltimore D., (1988), *Science*, **242**, 540–546.)

BARBARA BARYŁKO*

Rola fosforylacji białek w organizacji cytoszkieletu komórki nerwowej

Role of protein phosphorylation in organization of the neuronal cytoskeleton

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Organizacja cytoszkieletu w komórce nerwowej
 - II-1. Mikrofilamenty
 - II-2. Mikrotubule
 - II-3. Neurofilamenty
 - II-4. Cytoszkielet błonowy
- III. Fosforylacja białek cytoszkieletowych
 - III-1. Fosforylacja tubuliny
 - III-2. Fosforylacja białka *tau*
 - III-3. Fosforylacja MAP 2
 - III-4. Fosforylacja neurofilamentów
 - III-5. Fosforylacja fodryny
 - III-6. Fosforylacja ankiryiny
 - III-7. Fosforylacja synapsyny
- IV. Rola fosforylacji białek cytoszkieletu w regulacji procesów komórkowych.

Contents:

- I. Introduction
- II. Organization of neuronal cytoskeleton
 - II-1 Microfilaments
 - II-2. Microtubules
 - II-3. Neurofilaments
 - II-4. Membrane cytoskeleton
- III. Phosphorylation of cytoskeletal proteins
 - III-1. Phosphorylation of tubulin
 - III-2. Phosphorylation of *tau* protein
 - III-3. Phosphorylation of MAP 2
 - III-4. Phosphorylation of neurofilaments
 - III-5. Phosphorylation of fodrin
 - III-6. Phosphorylation of ankiryin
 - III-7. Phosphorylation of synapsin
- IV. Role of cytoskeletal protein phosphorylation in the regulation of cellular processes

* Dr, Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa, 02-093, ul. Pasteura 3

I. Wprowadzenie

Badania struktury i funkcji cytoszkieletu mają dość krótką historię. Do połowy lat siedemdziesiątych większość biologów nie uświadamiała sobie faktu istnienia, a tym bardziej znaczenia cytoszkieletu w żywej komórce. Jednak już w kilka lat później, dzięki intensywnym badaniom z zastosowaniem nowych technik biochemicznych, immunologicznych i mikroskopowych, powszechnie zaakceptowano fundamentalną rolę cytoszkieletu w najrozmaitszych zjawiskach związanych z ruchliwością komórkową.

Podstawowymi elementami cytoszkieletu komórki eukariotycznej, w tym także cytoszkieletu komórki nerwowej, są trzy typy struktur filamentowych: mikrotubule, mikrofilamenty i tzw. filamenty pośrednie, w przypadku komórki nerwowej zwane neurofilamentami [1, 2, 3]. Wymienione filamenty połączone są ze sobą przy udziale białek tworzących tzw. mostki poprzeczne. Dzięki temu powstaje gęsta sieć struktur białkowych wypełniająca wnętrze komórki. Zarazem, filamenty te, za pośrednictwem szeregu innych białek, połączone są z błoną komórkową, zapewniając w ten sposób integralność komórki. Stwarza to możliwość utrzymania odpowiedniego kształtu komórki, stabilizacji błony komórkowej, a także przekazywania sygnałów z zewnątrz komórki przez błonę do cytoplazmy [1, 2].

Cytoszkielet jest strukturą bardzo dynamiczną, ulegającą ciągłej reorganizacji w zależności od stanu fizjologicznego komórki. Reorganizacja ta polega na nieustannym łączeniu się bądź dysocjacji struktur filamentowych między sobą, wzmacnianiu lub rozluźnianiu ich połączeń z błoną komórkową, oraz na powstawaniu bądź rozpadaniu się samych filamentów. Zdolność cytoszkieletu do szybkiej reorganizacji umożliwia i determinuje wiele zachodzących w komórce nerwowej procesów związanych z ruchliwością komórkową, takich jak podział komórki i jej wzrost, powstawanie różnych wypustek komórkowych, transport aksoplazmatyczny, czy też wydzielanie neurotransmiterów bądź hormonów [2]. Zmiany struktury cytoszkieletu mają zazwyczaj jedynie lokalny charakter i jest zrozumiałe, że muszą być precyzyjnie regulowane. Jednym z czynników determinujących stan organizacji cytoszkieletu jest modulacja jego białkowych składników poprzez procesy ich odwracalnej fosforylacji/defosforylacji [4].

II. Organizacja cytoszkieletu w komórce nerwowej

Charakterystyczny wysoce polarny kształt komórki nerwowej znajduje odzwierciedlenie w zróżnicowanym ułożeniu poszczególnych elementów cytoszkieletu w różnych jej regionach, co związane jest ze specyficzną funkcją pełnioną przez dany region komórki.

Najlepiej poznana jest budowa cytoszkieletu aksonu, którego dominującą rolę jest transport różnych organeli i struktur komórkowych [5]. Wewnętrzny region aksonu wypełniony jest równolegle ułożonymi neurofilamentami i mikrotubulami, pomiędzy którymi występują liczne połączenia [6, 7, 8]. W centrum akso-

plazmy mikrotubule tworzą duże wiązki i stanowią jakby tory, po których przesuwać się mogą różne organelle. Wśród mikrotubul obecnych w tym regionie obserwowano niekiedy nieliczne, krótkie mikrofilamenty [9].

Bardziej skomplikowana jest budowa cytoszkieletu w regionie podbłonowym zarówno aksonu, dendrytów, jak i licznych wypustek nerwowych. Szybkie procesy związane z transmisją sygnałów przez błonę komórkową powodują dynamiczną reorganizację w tym regionie komórki. Wyróżnić tu można gęstą sieć krótkich mikrofilamentów [6, 8 – 11], które są połączone z błoną komórkową przy udziale fodryny, analogu spektryny erytrocytów, głównego składnika cytoszkieletu błonowego [12]. W przeciwieństwie do mikrofilamentów, mikrotubule w tym regionie są nieliczne [8, 11], a obecności neurofilamentów nie stwierdzono, aczkolwiek nie można jej wykluczyć [13, 14].

II-1. Mikrofilamenty

Mikrofilamenty, o średnicy około 8 nm, zbudowane są ze spolimeryzowanych liniowo globularnych monomerów aktynowych [15]. Taką formę aktyny nazwano F-aktyną, w odróżnieniu od formy monomerycznej – G-aktyny. Obie te formy pozostają ze sobą w równowadze kontrolowanej przez szereg białek, które zmieniają także stan organizacji filamentów aktynowych tworząc siatkę lub wiązki filamentów [16, 17]. Filamenty te zawierają także inne białka, przede wszystkim tropomiozynę. Aktyna jest jednym z podstawowych białek aparatu kurczliwego mięśni i wraz z tropomiozyną tworzy tzw. cienkie filamente, będące odpowiednikiem mikrofilamentów w komórkach niemięśniowych.

II-2. Mikrotubule

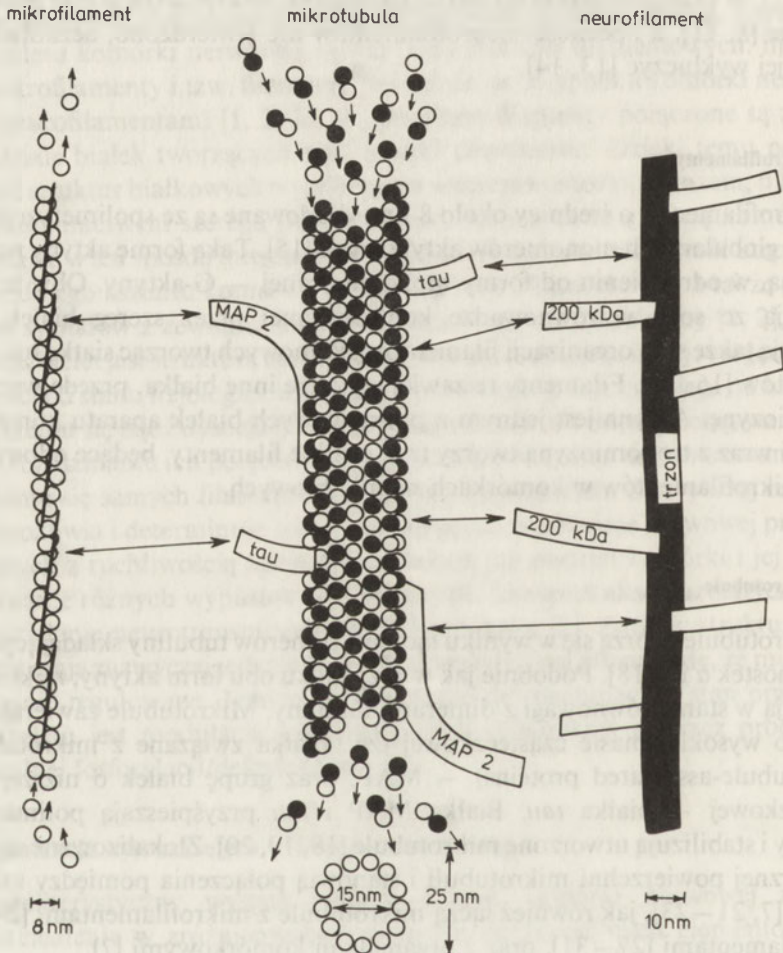
Mikrotubule tworzą się w wyniku łączenia dimerów tubuliny składających się z podjednostek α i β [18]. Podobnie jak w przypadku obu form aktyny, mikrotubule pozostają w stanie równowagi z dimerami tubuliny. Mikrotubule zawierają także białka o wysokiej masie cząsteczkowej tzw. białka związane z mikrotubulami (microtubule-associated proteins) – MAP, oraz grupę białek o niższej masie cząsteczkowej – białka *tau*. Białka MAP i *tau* przyspieszają polimeryzację tubuliny i stabilizują utworzone mikrotubule [18, 19, 20]. Zlokalizowane są one na zewnętrznej powierzchni mikrotubuli i stanowią połączenia pomiędzy mikrotubulami [7, 21 – 23], jak również łączą mikrotubule z mikrofilamentami [24 – 26], neurofilamentami [27 – 31], oraz z organellami komórkowymi [7].

II-3. Neurofilamenty

Neurofilamenty są najbardziej stabilnymi strukturami cytoszkieletu. W ich skład wchodzi trzy rodzaje podjednostek o masach cząsteczkowych 200 kDa, 150

kDa i 68 kDa [3]. Podjednostki o m.c.z. 68 kDa tworzą trzon filamentu o średnicy około 10 nm, z którym połączone są fragmentami swych cząsteczek dwie pozostałe podjednostki. Pozostałe fragmenty tych dwu podjednostek wystają na zewnątrz filamentu [28, 32, 33] i tworzą liczne poprzeczne połączenia z innymi neurofilamentami [34]. Zarówno podjednostka 68 kDa jak i podjednostka 200 kDa są zaangażowane w oddziaływanie neurofilamentów z mikrotubulami [27–31].

Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie budowę i wzajemne połączenia pomiędzy mikrotubulami, mikrofilamentami i neurofilamentami

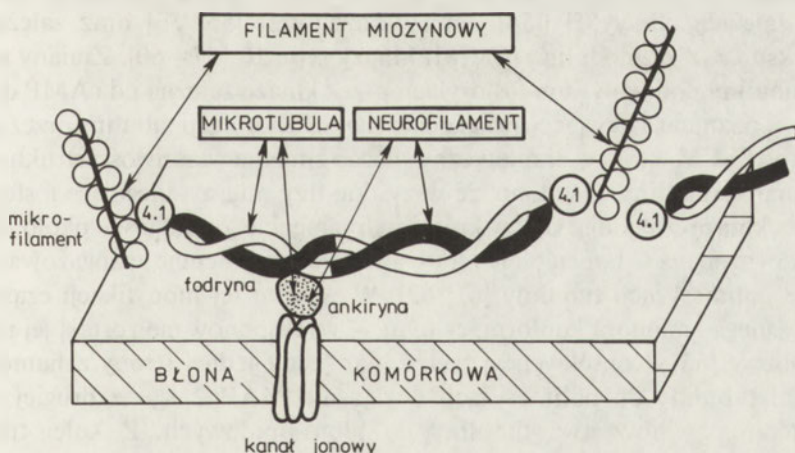


Ryc. 1. Schemat możliwych połączeń mikrotubuli z mikrofilamentami i neurofilamentami. W mikrofilamencie kółka oznaczają monomer aktyny, a pałeczki tropomiozynę. W mikrotubulach – sprzężone białe i czarne kółka oznaczają dimery tubuliny. Mikrofilamenty i neurofilamenty mogą łączyć się z mikrotubulami za pomocą białka MAP2 i białka tau. Dodatkowo neurofilament łączyć się może z mikrotubulami poprzez białka 200 kDa. Średnice mikrofilamentu, mikrotubuli i neurofilamentu podano w dolnej frakcji ryciny.

II-4. Cytoszkieleł błonowy

Plan budowy cytoszkieletu błonowego wydaje się być wspólny dla wszystkich komórek eukariotycznych. Zatem, cytoszkieleł błonowy neuronu zapewne nie różni się zasadniczo od cytoszkieletu błonowego erytrocytów – komórek najlepiej pod tym względem poznanych [35]. Do wysunięcia takiego wniosku upoważnia fakt, że z tkanki mózgowej wyizolowano białka analogiczne pod względem struktury, aktywności i lokalizacji komórkowej z białkami erytrocytów. Podstawowym białkiem cytoszkieletu błonowego jest fodryna [36]. Częsteczka tego białka, podobnie jak spektryny erytrocytów, złożona jest z dwóch heterodimerów, które są połączone ze sobą głowa-głowa, tworząc długą, cienką pałeczkę. Każdy tetramer może oddziaływać z szeregiem białek, z których najistotniejszym wydają się być kalmodulina, aktyna, białko 4.1 oraz ankiryna. Ankiryna i białko 4.1 – powierzchniowe białka błonowe – łączą fodrynę z błoną plazmatyczną [37, 38]. Zarazem białko 4.1, oddziaływując z końcową częścią tetrameru fodryny łączy poszczególne tetramery ze sobą. W wyniku tych połączeń tworzy się gęsta sieć fodrynowa, przylegająca do cytoplazmatycznej powierzchni błony. Ponadto białko 4.1 łączy tetramery fodryny z krótkimi filamentami aktynowymi, zawierającymi tropomiozynę [39].

Neuronalne białko 4.1 do tej pory budzi liczne kontrowersje. Istnieją dane wskazujące na identyczność tego białka z białkiem 4.1 erytrocytów (38), ale także prezentowane są wyniki świadczące o obecności w tym regionie komórki kilku innych białek o właściwościach strukturalnych i funkcjonalnych podobnych do właściwości białka 4.1. Należy do nich synapsyna [40, 41], znane od dawna białko lokalizowane w zakończeniach synaptycznych [42, 43, 44], jak również niedawno wyizolowane białko, nazwane ameliną [45].



Ryc. 2. Schemat budowy cytoszkieletu błonowego (na pdst. 35).

Strzałkami zaznaczono oddziaływania zachodzące pomiędzy elementami cytoszkieletu błonowego a mikrotubulami, neurofilamentami i filamentami miozynowymi.

Intensywne badania prowadzone na wyizolowanych i oczyszczonych białkach sugerują, że organizacja regionu podbłonowego komórki nerwowej jest bardziej złożona niż przedstawia to powyższy opis. Stwierdzono, że fodryna wykazuje duże powinowactwo nie tylko do mikrofilamentów, ale także do mikrotubuli [46, 47] i neurofilamentów [14]. Ankiryna również może wiązać się z mikrotubulami [37], a jej wiązanie z neurofilamentami wydaje się być bardzo prawdopodobne, gdyż wykazuje ona wysokie powinowactwo do innych filamentów pośrednich [13]. Ostatnio wyizolowano z erytrocytów i z tkanki mózgowej jeszcze jedno białko, które ma zdolność wiązania fodryny z aktyną – adducynę [48, 49].

Omawiając cytoszkielet komórkowy nie można pominąć miozyny. Białko to we współdziałaniu z aktyną jest generatorem skurczu mięśnia [50], a w komórkach niemięśniowych bierze udział w procesach związanych z ruchliwością komórkową [51, 52]. W komórce nerwowej największą koncentrację miozyny wykryto w zakończeniach nerwowych oraz, w regionie podbłonowym aksonu [53].

Ułożenie wymienionych białek cytoszkieletu błonowego przedstawiono schematycznie na rycinie 2.

III. Fosforylacja białek cytoszkieletowych

Szereg białek cytoszkieletowych ulega fosforylacji katalizowanej przez kinazy białkowe. Modyfikacje te w istotny sposób wpływają na ich wzajemne połączenia.

III-1. Fosforylacja tubuliny

Tubulina ulega fosforylacji w wyniku działania szeregu różnych kinaz, tj. kinazy zależnej od cAMP [54], kinazy kazeiny II [55, 56] oraz zależnej od kompleksu Ca z kalmoduliną (CaCM) kinazy typu II, [57–60]. Zmiany właściwości tubuliny pod wpływem fosforylacji przez kinazę zależną od cAMP dotychczas nie są poznane. Najwięcej uwagi poświęcono fosforylacji tubuliny przez kinazę zależną od CaCM, która w dramatyczny sposób zmienia właściwości strukturalne i funkcjonalne tubuliny. Ustalono, że wszystkie trzy miejsca ulegające fosforylacji przez tę kinazę znajdują się w krótkim fragmencie o długości około 4 kDa znajdującym się na C końcu białka [60], a więc we fragmencie zaangażowanym w procesie polimeryzacji tubuliny [61, 62]. W wyniku tej modyfikacji cząsteczka tubuliny ulega zmianom konformacyjnym – wyeksponowane zostają jej regiony hydrofobowe [63]. Konsekwencją tych zmian jest z jednej strony zahamowanie zdolności tubuliny do polimeryzacji i wiązania MAP 2, zaś z drugiej strony zwiększenie powinowactwa tubuliny do błon lipidowych. Z kolei tubulina ufosforylowana przez kinazę kazeiny II nie traci zdolności do polimeryzacji, a mikrotubule zawierające tubulinę ufosforylowaną przez tę kinazę wykazują zwiększoną stabilność [55, 56].

Przedstawione obserwacje sugerują, że fosforylacja tubuliny jest czynnikiem regulującym stan organizacji tego białka i jego przemieszczanie pomiędzy mikrotubulami i błoną plazmatyczną.

III- 2. Fosforylacja białka *tau*

Białko *tau* składa się z czterech izomerycznych polipeptydów o masie cząsteczkowej od 50 do 70 kDa [64]. Każdy polipeptyd posiada dwa miejsca ulegające fosforylacji: jedno z nich fosforylowane jest przez kinazę zależną od CaCM, drugie zaś w wyniku działania kinazy C [65–67]. Znaczenie tej drugiej fosforylacji pozostaje nadal niewyjaśnione. Obserwacje wskazują, że fosforylacja białka *tau* jedynie przez kinazę zależną od CaCM prowadzi do zmian konformacyjnych, które wywołują z kolei zmiany jego aktywności. Mianowicie, białko *tau* ufosforylowane przez tę kinazę znacznie hamuje proces polimeryzacji tubuliny, podczas gdy *tau* zdefosforylowane indukuje polimeryzację tubuliny [67] i stabilizuje utworzone mikrotubule [20].

Fosforylacja białka *tau* reguluje również jego oddziaływanie z aktyną; zdefosforylowane białko *tau* posiada zdolność sieciowania filamentów aktynowych w przeciwieństwie do jego formy ufosforylowanej, która nie wykazuje tej aktywności [68].

III-3. Fosforylacja MAP 2

Drugim białkiem, którego wpływ na dynamikę tworzenia się mikrotubul regulowany jest przez fosforylację, jest MAP 2. W cząsteczce MAP 2 można wyróżnić dwie, funkcjonalnie różne, domeny [22]. Jedną z nich stanowi krótki fragment (25–35 kDa), zlokalizowany na końcu cząsteczki, który wykazuje wysokie powinowactwo do tubuliny i jest odpowiedzialny za przyspieszenie jej polimeryzacji. Przylega on do zewnętrznej powierzchni mikrotubuli. Drugi, znacznie dłuższy fragment (około 250 kDa) wystaje na zewnątrz mikrotubuli i tworzy tzw. mostki poprzeczne. Obie wymienione domeny MAP 2 ulegają fosforylacji [21]. Cała cząsteczka tego białka posiada aż około 50 miejsc ulegających fosforylacji przez różne kinazy, w tym przez kinazę zależną od cAMP [69–74], kinazę zależną od CaCM [74–78], oraz kinazę C [75, 79]. Zarówno tak duża liczba miejsc fosforylacji, jak i różnorodność modyfikujących je kinaz nastrożają wiele trudności metodycznych w ustaleniu dokładnej liczby miejsc fosforylacji, ich lokalizacji, specyficzności dla danej kinazy, a także wpływu ich fosforylacji na właściwości cząsteczki. Uzyskanie odpowiedzi na powyższe pytania utrudnia ponadto fakt, że wyizolowane i oczyszczone białko MAP 2 zawiera około 10 reszt fosforanowych, bardzo odpornych na działanie fosfataz [70, 73, 75]. Uzyskane dotychczas wyniki dotyczące fosforylacji MAP 2 można podsumować następująco:

1. kinaza zależna od CaCM rozpoznaje około 12 miejsc, a kinaza zależna od

cAMP – około 10 miejsc. Większość miejsc fosforylowanych przez te dwie kinazy znajduje się w domenie wiążącej tubulinę [73, 75].

2. fosforylacja miejsc w domenie wiążącej tubulinę wydaje się być głównym czynnikiem zmniejszającym powinowactwo MAP 2 do tubuliny [72, 80] oraz jego zdolność do indukowania tworzenia mikrotubul [69, 70, 74, 80]. Analiza kinetyczna dynamiki mikrotubul w obecności MAP 2 ufosforylowanego wskazuje, że malejąca wraz ze wzrostem ufosforylowania tego białka szybkość polimeryzacji tubuliny jest wynikiem zwiększonej stałej dysocjacji dimerów tubuliny na końcach mikrotubul [69, 70].

3. miejsca fosforylacji trudno dostępne dla fosfataz są zlokalizowane w domenie wystającej na zewnątrz mikrotubuli [73, 75]. Prawdopodobnie miejsca te są fosforylowane przez kinazę C [75].

4. kinaza C może dodatkowo ufosforylować około 15 miejsc, z których większość znajduje się w domenie „wystającej” [75].

Fosforylacja białka MAP 2 modyfikuje również jego współdziałanie z filamentami aktynowymi [23, 68, 79]. Zdolność MAP 2 do sieciowania filamentów aktynowych jest obniżona po ufosforylowaniu tego białka. Wydaje się, że za obserwowane zjawisko odpowiedzialna jest fosforylacja w domenie „wystającej” [79].

III-4. Fosforylacja neurofilamentów

Wszystkie trzy podjednostki neurofilamentów są fosfoproteinami. Szczególnie dużą liczbę reszt fosforanowych zawierają podjednostki 150 kDa i 200 kDa [81–84]; większość z nich zlokalizowana jest w rejonach cząsteczek wystających na zewnątrz filamentu [85–87]. Defosforylacja tych podjednostek prowadzi do zmian ich konformacji. Świadczy o tym m.in. różnica w oddziaływaniu form ufosforylowanej i nieufosforylowanej obu podjednostek ze specyficznymi przeciwciałami [84, 88]. Jednakże, pomimo dość intensywnych badań, nie uzyskano jednoznacznych wyników zarówno odnośnie liczby miejsc fosforylacji, jak i nie wyjaśniono jaka kinaza lub kinazy je fosforylują. Trudności te wynikają głównie z faktu, że białka neurofilamentów są bardzo trudno rozpuszczalne i badania fosforylacji i defosforylacji muszą być prowadzone w warunkach, gdy podjednostki te są zagregowane. Także znaczenie fosforylacji składników neurofilamentów pozostaje niejasne. Jedne obserwacje świadczą o tym, że stopień ufosforylowania podjednostek neurofilamentów nie ma wpływu na ich rozpuszczalność [89], ale inne wyniki wskazują na zwiększenie rozpuszczalności podjednostki 150 kDa po jej zdefosforylowaniu [83]. Badania subkomórkowej lokalizacji neurofilamentów wykazywały, że długie filamety obecne w aksonie, zawierają głównie podjednostki w formie ufosforylowanej, natomiast w perikarionie, dendrytach i ich wypustkach, a więc w regionach, w których zachodzą dynamiczne procesy związane z reorganizacją cytoszkieletu, podjednostki 150 kDa i 200 kDa neurofilamentów występują zwykle w formie nieufosforylowanej [88]. Przedstawione wyniki zdają

się sugerować, że fosforylacja tych podjednostek ma stabilizujący wpływ na neurofilamenty, a zwłaszcza na ich wzajemne połączenia.

III-5. Fosforylacja fodryny

Fosforylacji ulegają oba rodzaje podjednostek fodryny (α i β) wyizolowanej z tkanki mózgowej [90, 91]. Kinaza zależna od cAMP fosforyluje jedno miejsce zlokalizowane w podjednostce β . Fodryna ulega również fosforylacji w wyniku działania kinazy tyrozynowej. W dimerze fodryny zidentyfikowano cztery miejsca rozpoznawane przez tę kinazę, z których jedno znajduje się w podjednostce β , a trzy w podjednostce α [91]. Przez analogię ze spektryną erytrocytów [92] można przypuszczać, że wszystkie miejsca fosforylacji fodryny znajdują się w krótkim fragmencie na C-końcu cząsteczki. Interesujący wydaje się wpływ fosforylacji fodryny na jej oddziaływanie z aktyną. Wprawdzie w wyniku fosforylacji zdolność fodryny do sieciowania filamentów aktynowych pozostaje nie zmieniona [91, 93], jednakże w wyraźny sposób zmienia się jej oddziaływanie z aktyną, o czym świadczą zmiany aktywności ATPazy miozynowej aktywowanej aktyną. Stymulujący wpływ fodryny na aktywność ATPazy aktomiozynowej [94, 95] ulega obniżeniu po jej ufosforylowaniu przez kinazę zależną od cAMP [90], podczas gdy fosforylacja przez kinazę tyrozynową w znaczący sposób zwiększa tę stymulację [91].

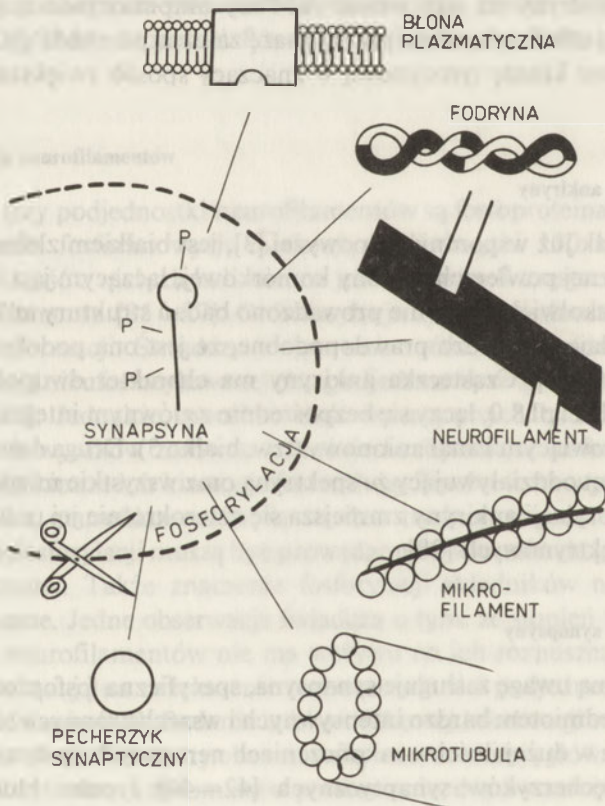
III-6. Fosforylacja ankiryiny

Ankiryna, jak już wspomniano powyżej [3], jest białkiem zlokalizowanym na cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej, łączącym ją z cytoszkieletem błonowym. Aczkolwiek dotąd nie prowadzono badań struktury ankiryiny z tkanki mózgowej, wydaje się bardzo prawdopodobne, że jest ona podobna do ankiryiny erytrocytów [96, 97]. Cząsteczka ankiryiny ma charakter dwupolarny; domena zasadowa, 83 kDa i pI 8.0, łączy się bezpośrednio z głównym integralnym białkiem błonowym stanowiącym kanał anionowy (tzw. białko 3). Druga domena, obojętna, zawiera fragment oddziałujący ze spektryną oraz wszystkie miejsca fosforylacji. W wyniku fosforylacji ankiryiny zmniejsza się czterokrotnie jej powinowactwo do tetramerów spektrynowych [98].

III-7. Fosforylacja synapsyny

Na szczególną uwagę zasługuje synapsyna, specyficzna fosfoproteina neuronowa, będąca przedmiotem bardzo intensywnych i wszechstronnych badań [99, 100]. Jest ona obecna w dużej ilości w zakończeniach nerwowych na cytoplazmatycznej powierzchni pęcherzyków synaptycznych [42–44] i pełni kluczową rolę w procesach neurosekrecji [101]. Synapsyna wykazuje duże powinowactwo zarówno do błon komórkowych [41, 102, 103], jak i wszystkich znanych struktur cytoszkieletowych, a więc mikrofilamentów [104, 105], mikrotubuli [41, 106], neurofila-

mentów [102] oraz fodryny [36, 40, 102]. Jest ona wysoce zasadowym białkiem, składającym się z dwóch łańcuchów polipeptydowych o podobnej masie cząsteczkowej [99]. W cząsteczce synapsyny można wyróżnić część globularną, bezpośrednio związaną z błoną oraz fragment pałeczkowaty, przypuszczalnie wiążący inne elementy cytoszkieletu. W cząsteczce synapsyny znajdują się trzy miejsca fosforylacji; jedno, w części globularnej, fosforylowane jest przez kinazę zależną od cAMP, a dwa pozostałe, fosforylowane przez kinazę zależną od Ca²⁺, znajdują się w części pałeczkowatej. Oddziaływania synapsyny ze strukturami cytoszkieletu są regulowane przez jej fosforylację. Fosforylacja synapsyny w znacznym stopniu redukuje jej powinowactwo do błon plazmatycznych i do białkowych składników cytoszkieletu (Ryc. 3). Jako przykłady mogą posłużyć następujące obserwacje: fosforylacja synapsyny pięciokrotnie zwiększa stałą dysocjacji synapsyny od pęcherzyków synaptycznych [103], obniża zdolność synapsyny do tworzenia wiązek filamentów aktynowych [104, 105] oraz zmniejsza wiązanie synapsyny do podjednostki 68 kDa neurofilamentu [102]. Obserwacje wskazują, że wszystkie trzy miejsca fosforylacji są odpowiedzialne za zmiany właściwości synapsyny, jednak



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie interakcji synapsyny i różnych subkomórkowych elementów neuronu. P – przy synapsynie oznacza miejsca możliwych fosforylacji; nożyczki oznaczają obniżenie powinowactwa synapsyny po jej ufosforylowaniu wobec wskazanych elementów subkomórkowych.

fosforylacja w części pałeczkowatej wydaje się mieć znacznie większe znaczenie niż fosforylacja w części globularnej.

Informacje dotyczące fosforylacji białek cytoszkieletowych podsumowano w tabeli 1. Przedstawione wyniki, uzyskane z badań *in vitro*, wskazują, że fosforylacja danego białka z reguły zmniejsza jego powinowactwo do pozostałych białek cytoszkieletu.

Tabela 1

Fosforylacja białek cytoszkieletowych

Substrat białkowy m. cz. (kDa)	Rodzaj kinazy	Miejsca fosforylacji	
		Liczba	Lokalizacja
Tubulina (55)	zależna od Ca ²⁺ kazeiny II	3 ?	C-koniec, 4 kDa ?
Białko <i>tau</i> (50–70)	zależna od Ca ²⁺ kinaza C	1 1	dwa różne miejsca
MAP 2 (280)	zależna od Ca ²⁺ zależna od cAMP kinaza C	≈ 12 10–14 10* + 15	w domenie wiążącej tubulinę większość w domenie „wystającej”
Neurofilamenty 200 150 68	endogenna ?	19–100 9–25 1–3	domeny „wystające” 60% od końca C
Fodryna (α-240, β-235)	zależna od cAMP tyrozynowa	1 4	podjednostka β 1 — podjednostka β 3 — podjednostka α
Ankiryna (210, 220)	?	7	domena wiążąca fodrynę
Synapsyna (76, 80)	zależna od cAMP zależna od Ca ²⁺	1 2	domena globularna domena pałeczkowata

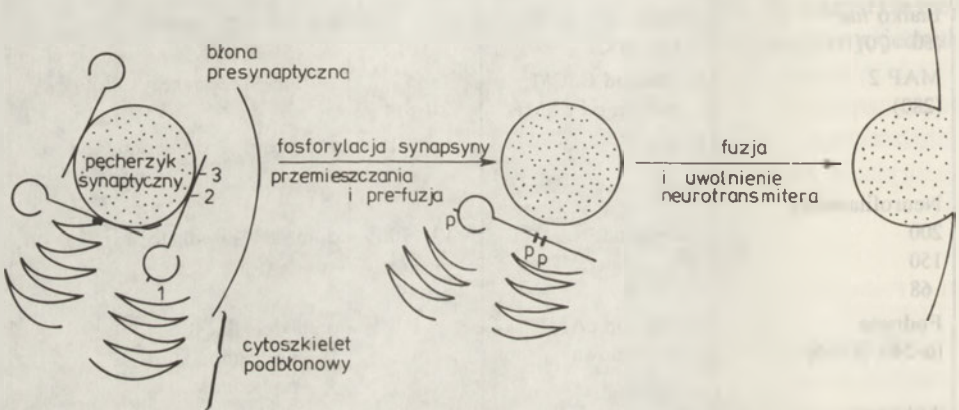
* reszty fosforanowe trudno usuwane przez fosfatazy

IV. Rola fosforylacji białek cytoszkieletu w regulacji procesów komórkowych

Większość posiadanych przez nas informacji dotyczących fosforylacji białek cytoszkieletowych pochodzi z badań *in vitro*. Pozostaje problem odniesienia tej wiedzy do procesów zachodzących w żywych komórkach. Szereg przesłanek pozwala przypuszczać, że fosforylacja białek cytoszkieletu rzeczywiście odgrywa poważną rolę regulacyjną *in vivo*. W kilku przypadkach wykazano w komórce nerwowej obecność obu form białek – ufosforylowanej i nieufosforylowanej, np. białka *tau* [107], synapsyny [108], podjednostek 150 kDa i 200 kDa neurofilamentów [88]. W wielu przypadkach obserwowano także ścisłą korelację subkomórkowej lokalizacji kinazy i jej cytoszkieletowego substratu, np. integralnym składni-

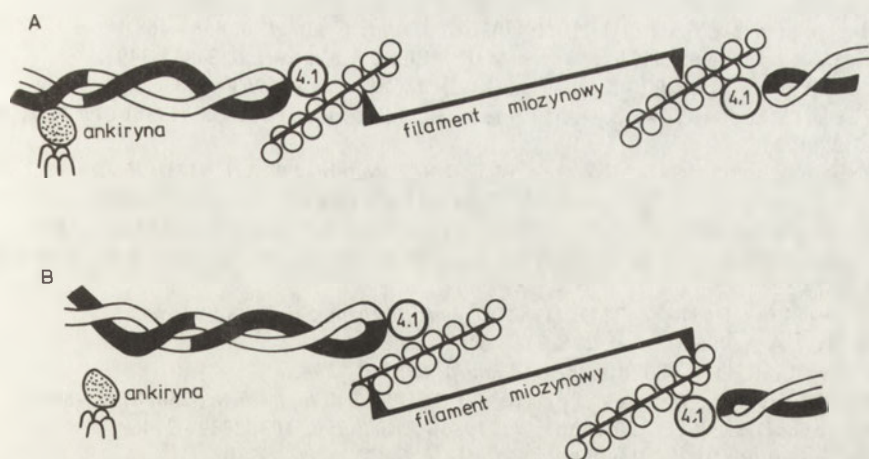
kiem mikrotubul jest kinaza zależna od cAMP fosforylująca MAP 2 (109). Poza tym, przynajmniej niektóre z białek cytoszkieletowych, np. MAP 2, mogą być defosforylowane przez specyficzne fosfatazy [110].

Najlepiej udokumentowana jest regulująca rola fosforylacji synapsyny w procesie neurosekcji [99], (Ryc. 4). Synapsyna nieufosforylowana jest silnie związana z błoną pęcherzyków synaptycznych zawierających neurotransmitter, a zarazem połączona jest ze strukturami cytoszkieletowymi. Połączenia te powodują, że pęcherzyk jest unieruchomiony. Sygnał zewnętrzny, aktywując daną kinazę, będzie impulsem do ufosforylowania synapsyny. W rezultacie przerwane zostaje połączenie pęcherzyka z filamentami cytoszkieletu, co umożliwi jego przemieszczenie się, a z drugiej strony rozluźnione zostaje połączenie synapsyny z pęcherzykiem, co umożliwi jego fuzję z błoną, a w dalszym etapie uwolnienie neurotransmitera.



Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie wpływu fosforylacji synapsyny na proces uwalniania neurotransmitera. Kropki oznaczają cząsteczki neurotransmitera.

Wydaje się także wysoce prawdopodobne, że fosforylacja białek cytoszkieletowych może regulować ich połączenie z błoną komórkową. Na przykład w wyniku fosforylacji ankiryny czy też białka 4. I lub jego analogu (synapsyny lub ameliny) połączenie cytoszkieletu fodrynowego z aksolemmą może ulec rozluźnieniu. Bardzo interesująca jest koncepcja mechanizmu transportu zachodzącego w regionie podbłonowym opartego na współdziałaniu filamentów aktynowych z miozynomymi [111], (Ryc. 5). Zgodnie z powszechnie przyjętą teorią ślizgową, oddziaływanie filamentów aktynowych z miozynomymi prowadzi do ich przesuwania się względem siebie [50]. W rezultacie białko związane z filamentem aktynowym, np. fodryna, może również ulec przesunięciu. Sądzić można, że przesuwanie się fodryny wzdłuż aksonu jest regulowane przez fosforylację białek łączących ją z aksolemmą. Należy jednak podkreślić, że zarówno mechanizm tego transportu, jak i udział w nim modulowanych przez fosforylację białek pozostaje dotąd w sferze hipotez.



Ryc. 5. Hipotetyczny mechanizm transportu podbłonowego fodryny. A. Filament miozynowy, oddziałuje z dwoma mikrofilamentami połączonymi z kompleksem fodryna-ankiryna. B. W wyniku oddysocjowania fodryny od ankiryiny po fosforylacji tej ostatniej oraz przesuwania się filamentu miozynowego i mikrofilamentów wobec siebie następuje ruch fodryny względem powierzchni błony komórkowej.

Przedstawione powyżej wyniki i hipotezy nie wyczerpują naszej i tak w dużym stopniu fragmentarycznej wiedzy o roli fosforylacji w reorganizacji cytoszkieletu w różnych stanach fizjologicznych komórki. Niemniej jednak, pozwalają na wysunięcie sugestii, że w rejonie aktywacji kinaz gęsta sieć struktur cytoszkieletowych może ulec rozluźnieniu, bądź nawet rozerwaniu. A zatem, cykliczna fosforylacja i defosforylacja białek cytoszkieletu wydaje się być jednym z istotnych czynników regulujących unieruchomienie i przemieszczanie się różnych organelli i struktur w cytoplazmie, co ma zapewne olbrzymie znaczenie w szeregu procesów komórkowych.

Serdecznie dziękuję pani Teresie Kośmickiej i memu synowi, Bohdanowi, za projekty rysunków. Praca finansowana przez PAN w ramach tematu CPBP 04.01.

Artykuł otrzymano 6 września 1988 r.
Zaakceptowano do druku 28 grudnia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Birchmeier W., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 192–195.
2. Bray D., Gilbert D., (1982), *Ann. Rev. Neurosci.*, **4**, 505–523.
3. Weber K., Shaw G., Osborn M., Debus E., Geisler N., (1983), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **48**, 717–729.
4. Nestler E., Greengard P., (1984), *Protein Phosphorylation in the Nervous System*. str. 263–266. Wiley J., New York.
5. Lasek R. J., (1986), *J. Cell Sci. Suppl.*, **5**, 161–179.
6. Hirokawa N., Bloom G. S., Vallee R. B., (1985), *J. Cell Biol.* **101**, 227–239.
7. Hirokawa N., (1986), *Trends in Neurosci.*, **9**, 67–71.

8. Hirokawa N., Yorifuji H., (1986), *Cell Motility Cytoskel.*, **6**, 458–468.
9. Papasozomenos S. Ch., Payne M. R., (1986), *J. Neurosci.* **6**, 3483–3491.
10. Letouneau R. C., Ressler A. H., (1983), *J. Cell Biol.*, **97**, 963–973.
11. Tsukita S., Tsukita S., Kobayashi T., Matsumoto G., J. (1986) *Cell Biol.*, **102**, 1710–1725.
12. Bennett V., Davis J., Fowler W. E., (1982) *Nature*, **299**, 126–131.
13. Greorgatos S. D., Marchesi V. T., (1985), *J. Cell Biol.*, **100**, (1955–1961).
14. Frappier T., Regnouf F., Pradel L. A., (1987), *Eur. J. Biochem.* **169**, 651–657.
15. Neuhaus J.-M., Wanger M., Keiser T., Wagner A., (1983), *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **4**, 507–527.
16. Craig S. W., Pollard T. D., (1982), *Trends Biochem. Sci.* **7**, 88–92.
17. Weeds A., (1982), *Nature*, **296**, 811–816.
18. Sloboda R. D., (1980), *American Scientist.* **68**, 290–298.
19. Sandoval J. B., Vandekerckhove J. S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8795–8900.
20. Drubin D. G., Kirschner M. W., (1986), *J. Cell Biol.*, **103**, 2739–2746.
21. Vallee R. B., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3206–3210.
22. de la Torre J., Carrascosa J. L., Avila J., (1986), *Eur. J. Cell Biol.* **40**, 233–237.
23. Vallee R. B., Bloom G. S., Theurkauf W. E., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 38s–44s.
24. Nishida E., Kuwaki T., Sakai H., (1981), *J. Biochem.* **90**, 575–578.
25. Pollard T. D., Selden S. C., Maupin P., (1984), *J. Cell Biol.* **99**, 33s–37s.
26. Arakawa T., Frieden C., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 11730–11734.
27. Aamodt E. J., Williams R. C., Jr., (1984), *Biochemistry*, **25**, 6023–6031.
28. Minami Y., Endo S., Sakai H., (1984), *J. Biochem.*, **96**, 1481–1490.
29. Heimann R., Shelanski M. L., Liem R. K. H., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12160–12166.
30. Miyata Y., Hoshi M., Nishida E., Minami Y., Sakai H., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 13026–13030.
31. Flynn G., Joly J. C., Purich D. L., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 1453–1459.
32. Liem R. K. H., Hutchison S. B., (1982), *Biochemistry*, **21**, 3221–3226.
33. Scott D., Smith K. E., O'Brien B. J., Angelides K. J., (1985), *J. Biol. Chem.* **260**, 10736–10747.
34. Leterrier J.-F., Eyer J., (1987), *Biochem J.*, **245**, 93–101.
35. Bennett V., (1985), *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 273–304.
36. Goodman S. R., Zagon I. S., (1986), *Am. J. Physiol.* **250**, C347–C360.
37. Davis J. Q., Bennett V., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13550–13559.
38. Goodmann S. R., Casoria L. A., Coleman D. B., Zagon I. S., (1984), *Science*, **224**, 1433–1436.
39. Fowler V. F., Bennett V., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5978–5989.
40. Baines A. J., Bennett V., (1985), *Nature*, **315**, 410–413.
41. Goldering J. R., Lasher R. S., Vallano M. L., Ueda T., Naito S., Sternberger N. H., Sternberger L. A., DeLorenzo R. J., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 8495–8504.
42. De Camilli P., Cameron R., Greengard P., (1983), *J. Cell Biol.* **96**, 1337–1354.
43. De Camilli P., Harris S. M., Hutter W. B., Greengard P., (1983), *J. Cell Biol.* **96**, 1355–1373.
44. Hutter W. B., Schiebler W., Greengard P., De Camilli P., (1983), *J. Cell Biol.* **86**, 1374–1388.
45. Krebs K. E., Zagon I. S., Goodman S. R., (1987), *J. Neurosci.*, **7**, 3907–3914.
46. Ishikawa M., Murofushi H., Sakai H., (1983) *J. Biochem.* **94**, 1209–1217.
47. Fach B. L., Graham S. F., Keates R. A. B., (1984), *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **63**, 372–381.
48. Bennett V., Garden K., Steiner J. P., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 5860–5869.

49. Gardner K., Bennett V., (1987), *Nature*, **328**, 359–362.
50. Dąbrowska R., (1987) w „Komórka – Jej Budowa i Ruch”. red. L. Kuźnicki, Ossolineum, Wrocław, Warszawa, Kraków, str. 93–132
51. Warrick H. M., Spudich J. A., (1987), *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 35–73.
52. Kuźnicki J., Baryłko B., (1988), *Int. J. Biochem.*, **20**, 559–568.
53. Drenckhahn D., Kaiser H., (1983), *Eur. J. Cell Biol.*, **31**, 235–240.
54. Goldenring J. R., Gonzales B., DeLorenzo R. J., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 421–428.
55. Gard D. L., Kirchner M. W., (1985), *J. Cell Biol.*, **100**, 764–774.
56. Serrano L., Diaz-Nido J., Wandosell F., Avila J., (1987), *J. Cell Biol.*, **105**, 1731–1739.
57. Burke E., DeLorenzo R. J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 991–995.
58. Goldenring J. R., Gonzalez B., McGuire J. S., Jr., DeLorenzo R. J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12632–12640.
59. Goldenring J. R., Casanova J. E., DeLorenzo R. J., (1984), *J. Neurochem.*, **43**, 1669–1679.
60. Wandosell F., Serrano L., Hernandez A., Avila J., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 10332–10339.
61. Serrano L., de la Torre J., Maccioni R. B., Avila J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5989–5993.
62. Sackett D. L., Bhattacharyya B., Wolff J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 43–45.
63. Hargreaves A. J., Wandosell F., Avila J., (1986) *Nature*, **323**, 827–828.
64. Cleveland D. W., Hwos Y., Kirschner M. W., (1977), *J. Mol. Biol.*, **116**, 227–247.
65. Lindwall G., Cole R. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5301–5305.
66. Baudier J., Cole R. D., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 17577–17583.
67. Baudier J., Lee S.-H., Cole R. D., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 17840–17590.
68. Selden S. C., Pollard T. D., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7064–7071
69. Jameson L., Caplow M., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 3413–3417.
70. Murthy A. S. N., Flavin M., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **137**, 37–46.
71. Theurkauf W. E., Vallee R. B., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7883–7886.
72. Burns R. G., Islam K., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **141**, 599–608.
73. Murthy A. S. N., Bramblett G. T., Flavin M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 4364–4370.
74. Goldenring J. R., Vallano M. L., DeLorenzo R. J., (1985), *J. Neurochem.*, **45**, 900–905.
75. Tsuyama S., Bramblett G. T., Huang K.-P., Flavin M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **262**, 4110–4116.
76. Yamauchi T., Fujisawa H., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 284–291.
77. Yamamoto H., Fukunaga K., Tanaka E., Miyamoto E., (1983), *J. Neurochem.*, **41**, 1119–1125.
78. Schulman H., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 11–19.
79. Akiyama T., Nishida E., Ishida J., Saji N., Ogawara H., Hoshi M., Yiyata Y., Sakai H., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 15648–15651.
80. Tsuyama S., Terayama Y., Matsuyama S., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 10886–10892.
81. Jones S. M., Williams R. C. Jr. (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9902–9905.
82. Julien S.-P., Mushynski W. E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10467–10470.
83. Wong J., Hutchison S. B., Liem K. H., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 10867–10874.
84. Carden M. J., Schlaepfer W. W., Lee V. M.-y., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9805–9817.
85. Julien J.-P., Mushynski W. E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 4019–4025.
86. Geisler N., Fischer S., Vandekerckhove J., Plessmann V., Weber K., (1984), *EMBO J.*, **3**, 2701–2706.

87. Geisler N., Fischer S., Vandekerckhove J., Van Damme J., Plessmann V., Weber K., (1985), *EMBO J.*, **4**, 57–63.
88. Sternberger L. A., Sternberger N. H., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**, 6126–6130.
89. Georges E., Lefebvre S., Mushynski W. E., (1986), *J. Neurochem.*, **47**, 477–483.
90. Wang C., Walsh M. P., Wang J. H., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 14716–14722.
91. Wang C., Kong S.-K., Wang J. H., (1988), *Biochemistry*, **27**, 1254–1260.
92. Harris H. W., Jr., Lux S. E., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11512–11520.
93. Brenner S. L., Korn E. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8620–8627.
94. Wagner P. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6306–6310.
95. Wang C., Ngai P. K., Walsh M. P., Wang J. H., (1987), *Biochemistry*, **26**, 1111–1117.
96. Weaver D. C., Marchesi V. T., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6170–6175.
97. Weaver D. C., Pasternack G. R., Marchesi V. T., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6170–6175.
98. Lu P.-W., Soong C.-J., Tao M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 14958–14964.
99. Nestler E. J., Greengard P., (1986), *Progr. Brain Res.*, **69**, 323–339.
100. Steiner J. P., Gardner K., Baines A., Bennett V., (1987), *Brain Res. Bull.*, **18**, 777–785.
101. Llinas R. L., Mc Guinness T. L., Leonard C. S., Sugimori M., Greengard P., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 3035–3039.
102. Steiner J. P., Ling E., Bennett V., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 905–914.
103. Schiebler W., Jahn R., Doucet J.-P., Rothlein J., Greengard P. (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 8383–8390.
104. Petrucci, T. C., Morrow J. S., (1987), *J. Cell Biol.*, **105**, 1355–1363.
105. Bahler M., Greengard P., (1987), *Nature*, **326**, 704–707
106. Baines A. J., Bennett V., (1986), *Nature*, **319**, 145–147.
107. Grundke – Iqbal L., Iqbal K., Tung Y.-C., Quinlan M., Wisniewski H. M., Binder L. I., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 4913–4917.
108. Nestler E., Greengard P., (1982), *Nature*, **296**, 452–454.
109. Theurkauf W. E., Vallee R. B., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3284–3290.
110. Yamamoto H., Saitoh Y., Fukunaga K., Nishimura H., Miyamoto E., (1988), *J. Neurochem.*, **50**, 1614–1623.
111. Willard M., Baitinger C., Cheney R., (1987), *Brain Res. Bull.*, **18**, 817–824.

W siedemdziesięciolecie Instytutu
Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
pamięci profesora Witolda Drabikowskiego
pracę swoją dedykuje autor

JACEK KUŹNICKI*

Fosforylacja miozyny – fakty i hipotezy

Phosphorylation of myosin – facts and hypotheses

Wykaz stosowanych skrótów: LMM – lekka meromiozyna, S₁ – główka miozyny, S₂ – fragment ogona miozyny, MLCK – kinaza lekkiego łańcucha miozyny, NEM – imid kwasu N-etylomaleinowego.

Cząsteczka miozyny jest heksamerem złożonym z dwóch ciężkich łańcuchów i dwóch par lekkich łańcuchów. Jedna para z nich to tzw. łańcuchy regulatorowe, które mogą ulegać fosforylacji i wiązać kationy dwuwartościowe, lekkie łańcuchy drugiej pary nie mają tych właściwości. Natywna cząsteczka miozyny ma masę około 500 000 oraz kształt asymetryczny. Strukturalnie można wyróżnić w niej: dwie główki o budowie globularnej i część pałeczkowatą zwaną ogonkiem.

Główka miozyny zbudowana jest z N-końcowego odcinka ciężkiego łańcucha i dwóch lekkich łańcuchów: regulatorowego i nieregulatorowego. W główkach znajdują się miejsca wiązania aktyny oraz miejsce enzymatyczne zdolne do hydrolizy ATP do ADP i P_i. Szybkość hydrolizy ATP przez miozynę jest mała, ale znacznie wzrasta po jej interakcji z aktyną. Mówi się wtedy o stymulacji ATPazy miozynowej przez aktynę lub o aktywności ATPazy aktomiozynowej. Aktywność ta wyznacza poziom interakcji miozyny z aktyną *in vitro* i odzwierciedla proces zachodzący *in vivo* w czasie aktywności skurczowej.

Ogonek miozyny zbudowany jest z C-końcowych odcinków obu ciężkich łańcuchów, znajdujących się w konformacji alfa-heliksu i skrzyżowanych wokół siebie. W roztworach zawierających niskie stężenie soli ogonki miozyny reagują ze sobą tworząc wielocząsteczkowe, uporządkowane strukturalnie polimery, zwane filamentami. *In vitro* i *in vivo* miozyna może występować w postaci dwupolarnych filamentów, o różnej liczbie cząsteczek, a także w postaci monomerów i dimerów.

Miozyna występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych. Szczególnie dużo jest jej w mięśniach, gdzie razem z aktyną bierze udział w skurczu. Zgodnie z powszechnie uznawaną teorią skracanie mięśnia polega na ślizganiu się filamentów aktyny i filamentów miozyny względem siebie. Uważa się, że podobnie jest w

* Dr hab. Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

komórkach mięśniowych, których niektóre przejawy ruchliwości komórkowej takie jak: ruch względem podłoża, ruch organelli wewnątrz komórki oraz zmiany kształtu – polegają na podobnej interakcji aktyny z miozyną. Miozyna pełni funkcje lokomotoryczne tylko w połączeniu z aktyną.

Istnieją dwa główne układy regulujące interakcję aktyny z miozyną: układ troponiny z tropomiozyną oraz układ białek odwracalnie fosforylujących miozynę. Pierwszy (troponina-tropiomiozyna) występuje wyłącznie w mięśniach szkieletowych i sercowych i jest odpowiedzialny za regulację cyklu skurczowo-rozkurczowego. Drugi układ (odwracalnie fosforylujący miozynę) – występuje praktycznie we wszystkich komórkach eukariotycznych, również w mięśniach szkieletowych i sercowych. W artykule opiszę fosforylację miozyny w mięśniach gładkich i w komórkach mięśniowych, tj. w tych komórkach, w których proces ten jest pierwszorzędowym czynnikiem regulującym zjawiska ruchowe.

Pod względem rodzaju podjednostek ulegających fosforylacji można wyróżnić trzy grupy białek: do pierwszej grupy zalicza się miozyny z mięśni szkieletowych i sercowych oraz miozyny z niektórych komórek mięśniowych kręgowców, których tylko lekkie łańcuchy są fosforylowane. Do drugiej grupy zalicza się miozyny, których lekkie i ciężkie łańcuchy ulegają fosforylacji. Jest to grupa, w której umieszcza się obecnie niektóre miozyny z grupy pierwszej, np. miozynę z mięśni gładkich aorty. Zmiana klasyfikacji wiąże się ze stwierdzeniem, iż niektóre miozyny mogą być fosforylowane na ciężkich łańcuchach jeśli zahamuje się endogenne proteazy, które odcinają końce ciężkich łańcuchów z resztami ulegającymi fosforylacji. W trzeciej grupie jest miozyna izolowana z *Acanthamoeba*, której tylko ciężkie łańcuchy są fosforylowane.

Lekkie łańcuchy regulatorowe miozyny z mięśni gładkich mają ciężar około 20 kDa. Są one fosforylowane przez różne kinazy, z których najważniejszą jest kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny (MLCK). Fosforyluje ona serynę 19. Stopień ufosforylowania miozyny izolowanej z mięśni gładkich wpływa na dwie jej właściwości związane ze skurczem: na aktywność ATPazy aktomiozynowej oraz na zdolność do tworzenia filamentów. W roztworach zawierających fizjologiczne stężenie soli i MgATP ufosforylowana w serynie 19 miozyna jest w postaci filamentów, podczas gdy nieufosforylowana miozyna występuje jako monomer z podwójnie zgiętym ogonkiem, o stałej sedymentacji 10S. Fosforylacja monomerów 10S, które są niezdolne do polimeryzacji powoduje prostowanie się ogonków, a następnie utworzenie normalnych filamentów.

Wykazano ostatnio, że kinaza białkowa C – enzym aktywowany przez Ca^{2+} i diacyloglicerol fosforyluje lekkie łańcuchy miozyny izolowane z mięśni gładkich w innym miejscu niż MLCK, a mianowicie w treoninie 9. Miozyna ufosforylowana przez MLCK i przez kinazę białkową C ma obniżoną aktywność ATPazy aktomiozynowej w porównaniu z miozyną ufosforylowaną wyłącznie przez MLCK. Ponadto, fosforylacja treoniny 9 ułatwia powstawanie monomerów 10S, a więc działa destabilizująca na filamenty miozynowe.

W mięśniach gładkich fosforylacja lekkiego łańcucha ma kluczowe znaczenie regulujące. W badaniach z użyciem skrawków mięśni lub odbłonionych mięśni

stwierdzono, iż w stanie spoczynku poziom ufosforylowania lekkiego łańcucha jest niski i że po stymulacji mięśni wzrasta szybko do wysokiego poziomu. Następnie obserwuje się obniżenie ufosforylowania lekkiego łańcucha do poziomu wyjściowego chociaż napięcie mięśni, czyli siła izometryczna skurczu, utrzymuje się. Na podstawie takich badań wykazano, iż fosforylacja lekkiego łańcucha jest bezpośrednio związana z inicjacją skurczu, tj. z szybkością przyłączania i odłączania główek miozynowych do aktyny. Ponieważ, mimo defosforylacji miozyny siła skurczu jest utrzymana, sugeruje się, że w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni gładkich, oprócz fosforylacji miozyny biorą udział jeszcze inne mechanizmy regulujące. Jedną z hipotez tłumaczących to zjawisko jest hipoteza tzw. mostków zahaczonych. Proponuje się, że podczas połączenia ufosforylowanej miozyny z aktyną zostaje ona zdefosforylowana i nie może odłączyć się od aktyny. Powstaje w ten sposób energetycznie ekonomiczne połączenie utrzymujące napięcie mięści, ale bez hydrolizy ATP.

W mięśniach szkieletowych i sercowych obserwuje się w czasie cyklu skurczowo-rozkurczowego zmiany poziomu ufosforylowania lekkich łańcuchów, ale zmiany te nie mają kluczowego znaczenia w inicjacji lub zakończeniu cyklu. Mają prawdopodobnie działanie modulujące siłę lub energetykę skurczu tych mięśni.

Lekkie łańcuchy miozyny znajdują się w główce miozynowej, a więc ich miejsca fosforylacji znajdują się blisko miejsca wiązania aktyny przez miozynę oraz miejsca hydrolizy ATP. Można więc łatwo wyobrazić sobie mechanizm regulacji ATPazy aktomiozynowej polegający na oddziaływaniu miejsca regulatorowego i centrum aktynowego w tej samej cząsteczce. Miejsca fosforylacji lekkich łańcuchów są jednak daleko od końca ogonka miozyny, który bierze udział w inicjacji polimeryzacji. Jak zatem wytłumaczyć wpływ fosforylacji na tworzenie filamentów? Do tego pytania powrócę po omówieniu fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny w komórkach niemięśniowych oraz fosforylacji ciężkich łańcuchów.

Wszystkie miozyny izolowane z komórek niemięśniowych z wyjątkiem miozyny z *Acanthamoeba* mogą być ufosforylowane na lekkich łańcuchach przez kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny. We wszystkich badanych przypadkach, niezależnie od tego czy dana miozyna była fosforylowana na ciężkim łańcuchu czy nie, fosforylacja seryny na lekkim łańcuchu zwiększała aktywność ATPazy aktomiozynowej i stabilność filamentów, tak samo jak to ma miejsce w przypadku miozyny z mięśni gładkich.

Badania dotyczące fosforylacji miozyny *in vivo* w komórkach niemięśniowych są znacznie mniej zaawansowane niż analogiczne badania w mięśniach gładkich. Może to być związane m.in. z różnymi technicznymi trudnościami takimi, jak niską zawartością miozyny w komórkach niemięśniowych. Większość tych badań przeprowadzono na płytkach krwi, które stanowią wygodny model do badania *in vivo* korelacji między poziomem fosforylacji miozyny, a zjawiskami ruchowymi. Stymulacja płytek różnymi czynnikami powoduje zmianę kształtu i agregację płytek, wydzielanie m.in. serotoniny i retrakcję skrzepu. W zależności od użytego bodźca można badać te zjawiska osobno. W płytkach w stanie spoczynku poziom ufosforylowania lekkiego łańcucha jest niski. Po stymulacji trombiną — powodu-

jąca wydzielanie serotoniny – obserwuje się zwiększony poziom ufosforylowania miozyny. Natomiast użycie inhibitorów kalmoduliny, a więc zablokowanie aktywności kinazy lekkiego łańcucha miozyny powoduje, nie tylko zahamowanie fosforylacji miozyny, lecz również zahamowanie uwalniania serotoniny. Sugeruje to, iż oba procesy: fosforylacja i wydzielanie – są ze sobą powiązane.

W cytoszkielecie płytek w spoczynku miozyna nie jest połączona z aktyną, gdyż jest nieufosforylowana. Po aktywacji płytek ilość miozyny związanej ze strukturą cytoszkieletu znacznie wzrasta równoległe ze zwiększoną fosforylacją miozyny. Inhibitory kalmoduliny lub czynniki relaksacyjne, hamowały fosforylację lekkiego łańcucha miozyny i jednocześnie obniżały asocjację miozyny z aktyną. Dane te sugerują, że fosforylacja miozyny z płytek krwi reguluje jej asocjację z cytoszkieletem.

Użycie ADP i EDTA wywołuje zmianę kształtu płytek bez ich agregacji i wydzielania. W tej sytuacji obserwuje się szybką fosforylację lekkich łańcuchów miozyny, która poprzedza zmianę kształtu płytek na kulisty. Po kilku minutach poziom ufosforylowania lekkiego łańcucha obniża się do poziomu charakterystycznego dla niestymulowanych płytek, ale kształt kulisty pozostaje. Świadczy to o tym, iż fosforylacja miozyny jest potrzebna do zainicjowania zmiany kształtu, ale nie jest potrzebna do jego utrzymania. Proces ten przypomina inicjację skurczu mięśni gładkich w wyniku fosforylacji, w których napięcie utrzymuje się mimo zachodzącej następnie defosforylacji miozyny.

Pewną część badań wykonano z użyciem innych komórek eukariotycznych i wykazano korelację między fosforylacją lekkich łańcuchów miozyny, a skurczem fibroblastów.

W leukocytach stymulowanych chemicznie obserwowano powstanie lamellopodia, a jednocześnie obserwowano fosforylację lekkiego łańcucha miozyny. „Capping” indukowany w limfocytach przy pomocy kolchicyny zachodził równoległe z fosforylacją. Podobnie limfocyty traktowane przeciwciałami reagującymi z powierzchniowymi immunoglobulinami wykazywały zwiększoną lokomocję i zwiększony stopień ufosforylowania miozyny. Wszystkie te dane sugerują, że niektóre procesy ruchliwości komórek niemięśniowych są inicjowane poprzez fosforylację miozyny.

We wszystkich badanych dotąd przypadkach miejsca fosforylacji ciężkiego łańcucha miozyny znaleziono na końcu ogonka. Ufosforylowanie ciężkich łańcuchów miozyny izolowanej z *Physarum* wpływa stymulująco na aktywność ATPazy aktomiozynowej i stabilizująco na filamenty. Odwrotny efekt ma fosforylacja ciężkich łańcuchów miozyny izolowanej z *Acanthamoeba*, *Dictyostelium* i z komórek białaczki szpikowej. A mianowicie, zdefosforylowana forma tych miozyn wykazuje wysoką aktywność ATPazy aktomiozynowej i tworzy stabilne filamenty, a ufosforylowana forma ma niską aktywność ATPazy i tworzy niestabilne, rozkładające się w obecności ATP filamenty. Dotychczas nie stwierdzono by fosforylacja ciężkich łańcuchów miozyny izolowanej z mózgu, makrofagów i komórek raka wysiękowego Ehrlicha miała wpływ na stabilność filamentów lub aktywność ATPazy aktomiozynowej.

Badania, które wyjaśnić mogą rolę fosforylacji ciężkich łańcuchów miozyny *in vivo* były prowadzone na komórkach *Dictyostelium*. Uzyskane wyniki nie są jednoznaczne, ale pozwalają sformułować następujący wniosek. Poziom fosforylacji ciężkiego łańcucha miozyny z *Dictyostelium discoideum* zmienia się w zależności od stanu funkcjonalnego komórki. Stymulacja agregacji tych ameb przez cAMP prowadzi do defosforylacji ciężkich łańcuchów.

Ostatnio opisano fosforylację ciężkich łańcuchów miozyny *in vivo* w mięśniach gładkich mięczaków. Przedstawiono dane wskazujące, iż defosforylacja miozyn może być odpowiedzialna za utrzymanie długotrwałego napięcia tych mięśni w stanie „catch” (zacisku muszli), charakteryzującego się niskim stopniem zużycia ATP.

Miejsca fosforylacji ciężkiego łańcucha są zlokalizowane na końcu ogonka nic więc dziwnego, że wpływają na zdolność do tworzenia filamentów. Jak jednak wytłumaczyć ich wpływ na aktywność ATPazy, której centrum aktywne jest zlokalizowane na drugim końcu cząsteczki?

Do odpowiedzi na te pytanie wykorzystam wyniki badań przy użyciu miozyny izolowanej z *Acanthamoeba*. Jej ciężki łańcuch ulega fosforylacji, ale lekkie łańcuchy nie są fosforylowane. Ufosforylowana miozyna jest nieaktywna i tworzy małe, niestabilne filamenty. Natomiast nieufosforylowana miozyna jest formą aktywną: tworzy stabilne filamenty i reaguje z aktyną, wyrazem czego jest wysoka aktywność ATPazy aktomiozynowej. Hipoteza zaproponowana w pracowni Korna zakłada, że regulacja ATPazy aktomiozynowej *Acanthamoeba* dokonuje się na poziomie filamentów, dzięki oddziaływaniom międzycząsteczkowym, a nie w wyniku oddziaływań w obrębie pojedynczej cząsteczki. Według tej hipotezy filament uzyskuje aktywną lub nieaktywną konformację w zależności od całkowitej liczby reszt fosforanowych.

Podstawowe obserwacje, które są podłożem tej hipotezy zostały dokonane przy użyciu czterech form miozyny: nieufosforylowanej, ufosforylowanej, nieufosforylowanej połączonej z NEM oraz ufosforylowanej po trawieniu chymotrypsyną.

Doświadczenia polegały na pomiarach aktywności ATPazy aktomiozynowej i zdolności do tworzenia filamentów wspomnianych form miozyny, czyli homopolimerów oraz heteropolimerów, czyli filamentów, zbudowanych z dwóch form miozyny. Stwierdzono, że w warunkach pomiaru aktywności ATPazy aktomiozynowej *in vitro* miozyna z *Acanthamoeba* jest zawsze w postaci filamentów, co wyklucza bezpośredni kontakt między główką (miejscem hydrolizy ATP), a końcem ogonka (miejszem fosforylacji) tej samej cząsteczki. Ponadto wykazano, że cząsteczki nieufosforylowanej miozyny (aktywnej) w filamencie zawierającym cząsteczki ufosforylowanej miozyny (nieaktywnej) mają obniżoną aktywność. Natomiast w mieszaninie homopolimerów ufosforylowanej i nieufosforylowanej miozyny ta ostatnia ma normalną aktywność. A zatem, tylko wtedy nieaktywne cząsteczki ufosforylowanej miozyny hamują aktywność cząsteczek aktywnych, gdy znajdują się w tym samym filamencie. Ponadto stwierdzono, że miozyna enzymatycznie pozbawiona końca ogonka zawierającego miejsca fosforylacji ciężkiego łańcucha traci zdolność do polimeryzacji i jednocześnie traci aktywność ATPazy

aktomiozynowej, chociaż jej centrum aktywne nie jest zdegradowane. Podobnie, różne przeciwciała monoklonalne lub poliklonalne przyłączające się do ogonka depolimeryzują filamenty i powodują zanik aktywności. Wykazano również, że heteropolimery złożone z dwóch rodzajów cząsteczek miozyny, których homopolimery były nieaktywne wykazują aktywność ATPazy aktomiozynowej. Jeden rodzaj cząsteczek to ufosforylowana forma, a drugi rodzaj cząsteczek to zdefosforylowana miozyna, której aktywność nieodwracalnie zniszczono przez zablokowanie grup SH. Fakt, że heteropolimery tych dwóch rodzajów cząsteczek wykazywały aktywność wskazuje, że cząsteczki miozyny mogą wykazywać aktywność mimo tego, że mają ufosforylowane ogonki. Aktywność ta jest uzyskana dzięki obecności w filamentach cząsteczek zdefosforylowanych, które nadają filamentowi aktywną konformację mimo, że same mają nieaktywne główki. A zatem, wszystkie główki w filamencie miozynowym mają potencjalnie jednakową aktywność niezależnie od tego czy są połączone z ufosforylowanymi ogonkami czy z nieufosforylowanymi. Aktywność cząsteczek zależy bowiem od konformacji filamentu, a ta od globalnego stanu ufosforylowania tego filamentu.

W miozynie *Acanthamoeba*, podobnie jak w miozynie mięśniowej można wyróżnić rejon zawiasowy, dzielący ogonek miozyny na domenę S2 i domenę LMM. Zawias ten umożliwi ruchy domen względem siebie oraz względem osi filamentu. Można spekulować, że miejsca fosforylacji działają jako zatrzask unieruchamiający domenę S2 należącą do sąsiedniej cząsteczki. W ten sposób aktywna lub nieaktywna konformacja filamentu zależeć będzie od stopnia ufosforylowania końca ogonka, który w stanie ufosforylowania (nieaktywnym) zatrzaskuje domenę S2 i połączoną z nią główkę uniemożliwiając połączenie z aktywną, a po defosforylacji następuje otwarcie zatrzasku, uwolnienie domeny S2, a tym samym istnieje możliwość wykonania przez główkę cyklu hydrolizy ATP na aktywie.

Hipoteza powyższa została opracowana dla miozyny z *Acanthamoeba*, ale może dotyczyć innych miozyn, których ciężkie łańcuchy ulegają fosforylacji.

W tym miejscu, chcę przypomnieć pytanie, które wcześniej pozostawiłem bez odpowiedzi. Brzmiało ono: w jaki sposób stopień ufosforylowania lekkich łańcuchów miozyny wpływa na tworzenie się filamentów? Otóż sugeruję, iż mechanizm ten może być podobny do tego, który zaproponowano dla miozyny *Acanthamoeba*, mimo, że fosforylowana jest ona na ciężkim, a nie na lekkim łańcuchu. Moją sugestią opieram przede wszystkim na tym, że istnieje pewna prawidłowość dotycząca dwóch podstawowych właściwości miozyny niezbędnych dla pełnienia przez nią funkcji lokomotorycznej. Prawidłowość ta polega na tym, iż zdolność do tworzenia dwupolarnych filamentów i wysoka aktywność ATPazy aktomiozynowej (czyli zdolność do reagowania z aktywną) są ze sobą sprzężone. Ta forma miozyny, która ma niską aktywność ATPazy, czyli ma obniżone powinowactwo wobec aktywy, tworzy nietrwałe filamenty, które w obecności ATP depolimeryzują do monomerów z podwójnie zgiętym ogonkiem. Natomiast forma aktywna miozyny tworzy stabilne filamenty. Prawidłowość ta okazuje się prawdziwa nawet

w przypadku miozyny z mięśni szkieletowych i sercowych. Miozyny te wykazują wysoką aktywność ATPazy aktomiozynowej, a ich filamenty są stabilne niezależnie od stopnia ufosforylowania ich lekkich łańcuchów. Inaczej mówiąc, zarówno forma ufosforylowana jak i forma nieufosforylowana ma wysoką aktywność ATPazy i tworzy stabilne filamenty.

Na zakończenie chcę podsumować w punktach najważniejsze tezy mojego artykułu:

1. Miozyna jest fosforylowana w prawie wszystkich komórkach eukariotycznych.

2. Fosforylacji ulegają albo tylko lekkie łańcuchy (tak jak w mięśniach szkieletowych i sercowych), albo tylko ciężkie łańcuchy (*Acanthamoeba*), albo (najczęściej) zarówno ciężkie jak i lekkie łańcuchy.

3. Fosforylacja lekkich łańcuchów pełni pierwszorzędową funkcję w regulacji skurczu mięśni gładkich i w niektórych typach ruchliwości komórek niemięśniowych. W komórkach tych w spoczynku poziom ufosforylowania jest niski, ale wzrasta po aktywacji komórek inicjując tym aktywność ruchową taką jak skurcz, wydzielanie, zmianę kształtu, „capping”, czy lokomocję. W odpowiedzi na czynnik relaksacyjny obserwuje się defosforylację miozyny i hamowanie ruchliwości komórkowej.

4. Oprócz omawianej fosforylacji lekkich łańcuchów przez kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny na uwagę zasługuje fakt, iż lekkie łańcuchy miozyny z mięśni gładkich i z komórek niemięśniowych mogą ulegać fosforylacji pod wpływem innych kinaz takich jak np. kinaza białkowa C.

5. Fosforylacja ciężkich łańcuchów miozyny wpływa również na lokomotoryczne właściwości miozyny: na aktywność ATPazy aktomiozynowej oraz na strukturę filamentów. Nie wyjaśniono dotychczas jednoznacznie w jaki sposób miejsca fosforylacji zlokalizowane na końcu ogonka wpływają na aktywność ATPazy aktomiozynowej, której centrum aktywne znajduje się na przeciwnym końcu cząsteczki. Wg hipotezy K o r n a i w s p. tłumaczyć to można regulacją na poziomie filamentów, a nie na poziomie pojedynczej cząsteczki.

6. Wszystkie dostępne dane wskazują, że ta forma miozyny, która tworzy stabilne filamenty posiada wysoką aktywność ATPazy aktomiozynowej. Można przypuszczać, że nie jest to przypadek, ale że odzwierciedla to wymagania fizjologiczne dla miozyny jako motora zjawisk ruchowych, szczególnie w tych tkankach, w których filamenty miozynowe ulegają ciągłej polimeryzacji i depolimeryzacji *in vivo*, a więc przede wszystkim w komórkach niemięśniowych. Po to by ruch był efektywny miozyna musi być w stanie zdolnym do reagowania z aktywną oraz musi tworzyć dwupolarne struktury, na których ślizgają się filamenty aktywne.

Artykuł otrzymano 22 września 1988 r.
Zaakceptowano do druku 29 grudnia 1988 r.

PIŚMIENICTWO

1. Dąbrowska R., (1986), *Post. Biol. Kom.*, **2**, 145–174.
2. Shriver J. W., (1986), *Biochem. Cell Biol.*, **64**, 265–276.
3. Kuźnicki J., (1986), *FEBS Lett.*, **204**, 169–176.
4. Kuźnicki J., (1986), *Post. Biochem.*, **32**, 15–57.
5. Solomon F., (1987), *Science*, **236**, 1043–1044.
6. Dąbrowska R., (1987), w: *Komórka – jej budowa i ruch* (red. Kuźnicki L.), 94–132. Ossolineum, Wrocław.
7. Warrick H. M., Spudich J. A., (1987), *Ann. Rev. Cell Biol.*, **3**, 379–421.
8. Kuźnicki J., Baryłko B., (1988), *Int. J. Biochem.*, **20**, 559–568.
9. Korn E. D., Hammer J. A.III, (1988), *Ann. Rev. Biochem.*, w druku.

TERESA JAKUBOWICZ*

Fosforylacja białek rybosomowych u wyższych i niższych Eukaryota

Phosphorylation of ribosomal proteins in higher and lower Eukaryotes

Wykaz stosowanych skrótów: RSV – wirus mięsaka Rousa, AbMuLV – wirus białaczki mysiej Abelsona, EGF – naskórkowy czynnik wzrostowy, FGF – fibroblastyczny czynnik wzrostowy, MAP2 – ang. microtubule associated protein 2.

Rybosomy są podstawowym strukturalnym i funkcjonalnym elementem aparatu translacyjnego w komórce. Choć u odległych ewolucyjnie organizmów omawiane organella zachowały ten sam ogólny schemat budowy i choć pełnią w komórce tę samą funkcję, to w ich strukturze obserwuje się wiele różnic. Dotyczy to zarówno rRNA, jak i białek rybosomowych. Dlatego wydaje się, że analiza porównawcza strukturalnych komponentów rybosomu, u odległych filogenetycznie organizmów, przybliży nas do poznania zmian jakim uległy one podczas ewolucji. Pozwoli także wyjaśnić, które z komponentów rybosomu są odpowiedzialne za zachowanie jego funkcji w procesie translacji. Istnieją np. sugestie, że badania porównawcze rRNA małej podjednostki rybosomowej, będą już wkrótce przysłowiowym kamieniem z Rozety w ustalaniu filogenetycznego pokrewieństwa między grupami organizmów [1].

W badaniach porównawczych białek rybosomowych na szczególną uwagę zasługują białka ulegające fosforylacji. Ten typ modyfikacji został, jak dotąd wykazany jedynie u organizmów eukariotycznych. Nie obserwuje się go u prokariotów. Spośród ponad 70 białek rybosomowych Eukaryota, intensywnej fosforylacji *in vivo* i *in vitro* ulegają jedynie trzy. Dwa z nich to białka o charakterze kwaśnym, które zlokalizowane zostały w większej podjednostce rybosomowej. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych tych białek izolowanych z tkanek odległych ewolucyjnie organizmów eukariotycznych jak drożdże [2], *Artemia salina* [3,4], wątroba szczura [5] i komórki ludzkie [6], wykazała duży, osiągający 60%-stopień homologii. Sugeruje się, że białka te pochodzą od jednego, wspólnego pra-genu [7]. Pewną homologię w strukturze pierwszorzędowej wykazano także między omawianymi białkami Eukaryota i Archaeobacteria [5, 7] ale

* Dr, Zakład Biologii Molekularnej UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

zupelny jej brak w odniesieniu do kwaśnych białek rybosomowych bakterii właściwych [5,7].

Kwaśny charakter omawianych białek wynika z dużej (18%) zawartości reszt kwasu glutaminowego, które rozmieszczone są głównie w C końcowym fragmencie. W ich skład wchodzi zaledwie jedna bądź dwie reszty argininy a aż 20% stanowi alanina [5].

Pomimo braku wyraźnej homologii w sekwencji aminokwasowej kwaśnych białek rybosomowych Eukaryota i Prokaryota, posiadają one podobną organizację strukturalną w rybosomie. Występują w wielu kopiach w formie unikalnej, pentamerycznej struktury złożonej z dwóch par dimerów tych białek przyłączonych do wspólnego białka [4]. Być może tego typu organizacja strukturalna ma istotne znaczenie dla funkcji rybosomu. Zarówno u Prokaryota jak i u Eukaryota białka kwaśne zaangażowane są w procesie biosyntezy białka w reakcjach zależnych od GTP, a zwłaszcza w translokacji peptydylo-tRNA [8, 9]. Nie wydaje się jednak, żeby fosforylacja tych białek u Eukaryota odgrywała istotną rolę regulacyjną. Występują one w rybosomie w formie ufosforylowanej, niezależnie od fazy wzrostu komórki. Kwaśne białka rybosomowe należą do wymiennych (ang. exchangeable) białek rybosomu. Obserwowano ich wymianę między cytoplazmą a rybosomami między innymi u drożdży [10]. Jest prawdopodobne, że przyłączanie i odłączanie tych białek od rybosomu *in vivo* zależy od stopnia ufosforylowania. W fosforylacji tych białek biorą udział kinazy kazeinowe 1 i 2 [2, 11, 12].

Oprócz kwaśnych białek rybosomowych, fosforylacji ulega zasadowe białko małej podjednostki rybosomowej oznaczone jako S6 wg nomenklatury M c C o n - k e y ' a i w s p. [13]. W odróżnieniu od kwaśnych białek rybosomowych, poziom fosforylacji białka S6 ulega dynamicznym zmianom w zależności od stanu fizjologicznego komórki oraz warunków środowiska [14]. Bardzo często wzrost fosforylacji białka S6 skorelowany jest ze wzrostem syntezy białka. Wykazano, że stopień fosforylacji S6 jest wyższy w polisomach niż monosomach 80S [15,16]. Szereg badań *in vitro* wykazuje, choć niejednoznacznie, że modyfikowane w białku S6 podjednostki 40S, posiadają zdolność wybiórczej translacji określonych klas mRNA [17, 18] i włączenia kompleksów inicjujących do polisomów [19]. Sugeruje się, że ta zróżnicowana wybiórczość podjednostek 40S wiąże się ze zmianami konformacyjnymi 18S rRNA w regionie, który odpowiedzialny jest za przyłączenie mRNA do 40S [20, 21]. Warto tutaj dodać, że istnieje szereg doniesień wskazujących na brak funkcjonalnej różnicy między podjednostkami o różnym stopniu ufosforylowania [22, 23, 24].

Stosując technikę ustalania sekwencji aminokwasów drogą automatycznej degradacji Edmana [25] oraz sekwencji nukleotydów w rekombinacyjnych cDNA [26], poznano strukturę pierwszorzędową białka S6 izolowanego z wątroby szczura i z *Saccharomyces cerevisiae* [25, 26, 27]. Wykazano, że jedynym aminokwasem, który ulega fosforylacji jest seryna. W cząsteczce tego białka izolowanego z wątroby szczura, złożonego z 249 aminokwasów, zidentyfikowano 15 reszt serynowych przy czym aż 7 z tych reszt zlokalizowano w osiemnastoaminokwasowym fragmencie na końcu C białka S6:

Wątroba szczura Arg Arg Leu Ser Ser Leu Arg Ala Ser Thr Ser

Lys Ser Glu Ser Ser Glu Ly_SCOO-

S. cerevisiae Arg Arg Ala Ser Ser Leu Lys Ala_{COO}-

Od 1 – 5 spośród wspomnianych siedmiu reszt serynowych ulega fosforylacji *in vivo* oraz *in vitro*. Wydaje się, że ten fragment białka S6 jest wyeksponowany na powierzchnię rybosomu i przez to łatwo dostępny dla kinaz białkowych. Udział enzymów w złożonym mechanizmie fosforylacji białka S6 opisany został wcześniej [14] i jest zilustrowany na uaktualnionym schemacie (Ryc. 1).

Na przedstawionym schemacie zwraca uwagę różnorodność czynników, które oddziałując z różnymi receptorami na powierzchni komórki „uruchamiają” szereg reakcji enzymatycznych, prowadzących do powstawania od 1 – 5, w różnym stopniu ufosforylowanych, form białka S6.

Wykazano, że reszty serynowe w pozycjach 1 i 2 fosforylowane są przez kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów. Ponadto, opisano szereg innych kinaz, niezależnych od cyklicznych nukleotydów, które również fosforylują to białko. Należy tu wymienić kinazę aktywowaną na drodze organicznej proteolizy PAK II oraz zależną od jonów Ca⁺⁺ i fosfolipidów kinazę C [14, 28]. Obydwa enzymy fosforylują reszty serynowe w pozycjach 1, 2 i 3 białka S6. Kinazy te charakteryzuje niska specyficzność substratowa. Centralną rolę regulacyjną w fosforylacji białka S6 odgrywa kinaza specyficznie fosforylująca S6 – kinaza S6 (Ryc. 1). Enzym ten aktywowany jest przez surowicę [29, 30], czynniki wzrostowe [30, 31, 32, 33, 34], insulinę [35, 36], estry forbolu [37] i inne czynniki [38, 39]. Nie wiadomo dotychczas ile i które reszty serynowe są fosforylowane przez ten enzym. Czy jest to jedna kinaza katalizująca fosforylację pięciu reszt serynowych C końca białka S6, czy też kilka enzymów fosforylujących jednocześnie czy kolejno 2 – 3 reszty w różnych pozycjach. Ostatnio w niezaplodnionych jajach *Xenopus laevis* wykazano obecność dwóch różnych kinaz S6 – KS 6I i KS 6 II [40, 41]. Przeciwciała skierowane przeciw KS 6II nie dają reakcji immunologicznej z kinazą S 6I. Dodatnią reakcją immunologiczną wykazano natomiast z homologiczną kinazą S6 izolowaną z oocytów *Xenopus laevis* stymulowanych surowicą i progesteronem [41] oraz z fibroblastów kurczęcia stymulowanych surowicą lub transformowanych wirusem RSV [41]. Sugeruje to, że omawiane enzymy posiadają wspólną domenę antygenową [42].

Ostatnio drogą klonowania rekombinacyjnego cDNA kinazy S6 II z jajowodów *Xenopus laevis*, wykazano, że enzym różni się strukturą od innych kinaz [42]. Zawiera on dwie różne domeny kinazowe. Na odcinku 366 aminokwasów do końca N zidentyfikowano region posiadający duże podobieństwo do miejsca wiązania ATP w kinazie C, podjednostce katalitycznej kinazy A oraz G. W pozostałej części enzymu od końca C wykazano duży stopień homologii do miejsca wiązania ATP podjednostki katalitycznej kinazy fosforylazy b [42]. Być może ta niezwykła organizacja strukturalna enzymu daje możliwość modyfikacji wszystkich pięciu reszt serynowych na C końcu białka S6.

Aktywacja kinazy S6, podobnie jak fosforylacja białka S6 *in vivo* jest szybka i przejściowa. W komórkach 3T3 stymulowanych przez EGF obserwuje się

maksymalny poziom jej aktywności już po 5–15 minutach od podania czynnika wzrostowego a następnie powolny spadek w ciągu 2–3 godzin [34]. Aktywność omawianej kinazy *in vitro* można wykazać jedynie w obecności inhibitorów fosfataz [34]. Obserwacje te pośrednio wskazują, że fosfatazy fosfobiałkowe mogą, poprzez defosforylację powodować inaktywację kinazy S6. Ostatnio wykazano, że oczyszczony preparat fosfatazy 2A obniża właściwości katalityczne kinazy S6 [43]. Fosfataza 1 również, choć w mniejszym stopniu, wpływa na zahamowanie aktywności omawianego enzymu [42]. Dane te wskazują, że aktywność kinazy S6 jest regulowana przez odwracalną fosforylację. Przypuszcza się, że fosforylacja kinazy S6 zachodzi przy udziale nie zidentyfikowanej dotychczas jednej bądź kilku kinaz białkowych. Szereg obserwacji wskazuje, że kinazy tyrozynowe [37], kinaza C [37, 44] a ostatnio również kinaza A [45] mogą niezależnie od siebie w sposób pośredni wpływać na aktywację kinazy S6.

Ostatnio wykazano, że w komórkach 3T3 stymulowanych przez insulinę zachodzi szybka aktywacja serynowo/treoninowej kinazy MAP 2 [46]. Aktywacja tego enzymu zachodzi szybciej niż kinazy S6. Co więcej kinaza MAP2 wykorzystuje kinazę S6 jako substrat fosforylacji oraz powoduje wzrost jej aktywności *in vitro* [46].

Wydaje się, że bliższa charakterystyka enzymów w tej fosforylacyjnej kaskadzie dostarczy istotnej informacji odnośnie szlaku przekazywania sygnałów do komórki a być może także regulacji wzrostu komórkowego.

Dynamiczne zmiany w poziomie fosforylacji białka S6 obserwuje się zarówno u wyższych jak i niższych organizmów eukariotycznych jak grzyby, pierwotniaki i glony (Tab. 1.).

Dotyczy to również drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Funkcjonalnym i strukturalnym homologiem zwierzęcego białka S6 w drożdżach jest białko S10 [25, 26]. Wykazano, że modyfikacja białka S10 zachodzi w fazie ekspotencjalnego wzrostu, podczas kiełkowania spor oraz w krótkim czasie po podaniu świeżego podłoża [47, 48]. Natomiast brak fosforylacji tego białka obserwowano w komórkach pochodzących z fazy stacjonarnego wzrostu, w sporach drożdżowych a także w warunkach stresu cieplnego [48].

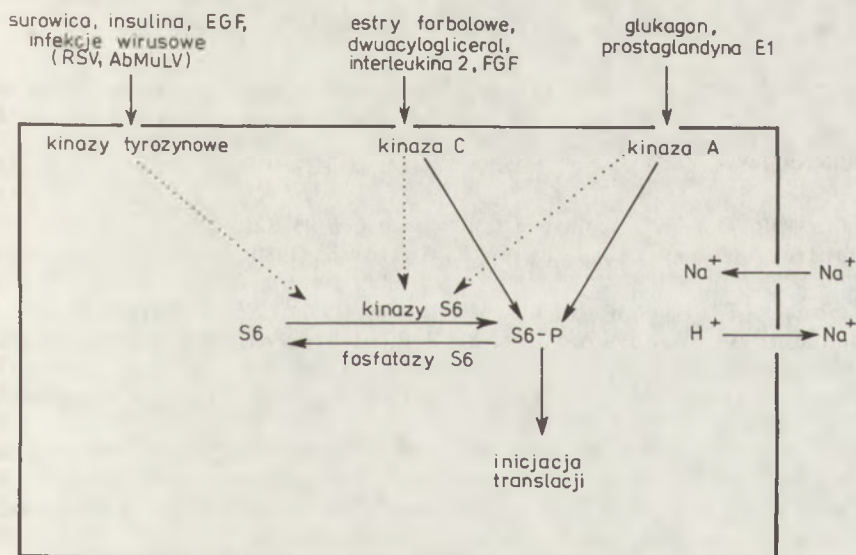
Analiza porównawcza struktury pierwszorzędowej zwierzęcego białka S6 z białkiem S10 drożdży, wykazała około 70% homologii. Istotną różnicę obserwuje się na końcu C omawianych białek (Ryc. 1). Wykazano mianowicie, że w drożdżowym białku S10 brakuje 10 aminokwasowej sekwencji, która u wyższych eukariotów stanowi substrat fosforylacji dla kinaz S6 stymulowanych czynnikami mitogennymi. I tak C końcowy fragment drożdżowego białka S10 posiada tylko dwie, homologiczne do zwierzęcego S6 reszty serynowe. Seryny w tych pozycjach fosforylowane są przez kinazy zależne od cAMP [54]. Powstaje zatem pytanie czy oprócz kinazy A, istnieją w komórkach drożdży inne niezależne od cyklicznych nukleotydów kinazy, które uczestniczą w modyfikacji tego białka?

Wykazano ostatnio, że podanie glukozy do hodowli komórek drożdży zatrzymanych w fazie G₀/G₁ pobudza hydrolizę fosfolipidów inozytolowych i w konsekwencji prowadzi do akumulacji fosforanów inozytolu [55, 56]. Przemiany te

Tabela 1

Fosforylacja/defosforylacja S6 u mikroorganizmów eukariotycznych

Nazwa organizmu	Warunki fosforylacji	Warunki defosforylacji	Literatura
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	faza ekspotencjonalnego wzrostu, przeniesienie do świeżego podłoża, kiełkowanie spor	faza stacjonarnego wzrostu, głodzenie, tworzenie spor, spory w stanie spoczynku, szok cieplny	[47, 48]
<i>Dictyostelium discoideum</i>	warunki głodowe, agregacja komórek, (przechodzenie w stan spoczynku)	we wszystkich fazach wzrostu	[49]
<i>Tetrachymena pyriformis</i>	głodzenie	faza ekspotencjonalnego wzrostu	[50, 51]
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	przeniesienie komórek do świeżego podłoża	faza ekspotencjonalnego wzrostu, głodzenie	[52]
<i>Physarum polycephalum</i>	w ciągu całego cyklu życiowego	głodzenie	[53]
<i>Mucor racemosus</i>	faza ekspotencjonalnego wzrostu	sporulacja	[54]



Ryc. 1. Mechanizm fosforylacji białka S6.

prowadzą przypuszczalnie do aktywacji kinazy C. Istnienie tego enzymu u drożdży zostało ostatnio eksperymentalnie potwierdzone [57]. Można więc przypuszczać, że wzrost fosforylacji S6 spowodowany podaniem świeżego podłoża (zawierającego glukozę jako źródło węgla) może być wywołany działaniem kinazy C. Drożdżowe

białko S10 ulega także fosforylacji przez homologiczną i heterologiczną kinazę aktywowaną drogą ograniczonej proteolizy [13]. Dane te wskazują na duże podobieństwo mechanizmu fosforylacji drożdżowego białka S10 do systemu zwierzęcego.

Nie jest jasne czy fosforylacja drożdżowego białka S10 spełnia istotną rolę fizjologiczną. Ostatnio w pracowni Warnera [58], drogą ukierunkowanej mutacji, obydwie reszty serynowe w C końcowym fragmencie białka S10 zostały zastąpione alaniną. Uzyskane w ten sposób mutanty posiadały nie zmienioną w stosunku do szczepów dzikich zdolność komórkowego wzrostu i różnicowania [58]. Zdaniem tych badaczy fosforylacja białka S10 oraz jego homologów u innych mikroorganizmów eukariotycznych, stanowi nieistotną dla procesów życiowych komórki ewolucyjną pozostałość. Na przykład głodzenie, które u większości przebadanych organizmów prowadzi do defosforylacji białka S6 u *Tetrachymena pyriformis* i *Dictyostelium discoideum* wzmacnia jego fosforylację (Tabela 1.).

Wydaje się, że jeśli nawet fosforylacja S6 u niższych eukariotów nie spełnia istotnej roli fizjologicznej, to badania tego zjawiska mają wciąż duże znaczenie poznawcze. Szybkie zmiany w poziomie fosforylacji tego białka w zależności od warunków środowiska mogą być wykorzystane jako dosyć czuła „sonda” do śledzenia przekazywania określonych bodźców do komórki. Jest to istotne, gdyż, jak się ostatnio wydaje przekazywanie sygnałów zewnątrzkomórkowych u mikroorganizmów eukariotycznych i u kręgowców zachodzi podobnie.

Artykuł napisano w ramach prac finansowanych przez CPBR 3.13. i RP-II-13.

Artykuł otrzymano 17 lipca 1988 r.
Zaakceptowano do druku 12 stycznia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Pace N. R., Olsen G. J., Woese C. R., (1986), *Cell*, **45**, 325–326.
2. Kudlicki W., Szyszka R., Paleń E., Gąsior E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **633**, 376–385.
3. Amons R., Pluijms W., Kriek J., Moller W., (1982), *FEBS Lett*, **146**, 143–147.
4. Uchiumi T., Wahba A. J., Traut R. R., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5580–5584.
5. Lih A., Wittmann-Liebold B., McNally J., Wool J. G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9189–9197.
6. Rich B. E., Steitz J. A., Hughes H., (1987), w *Translational Control*, Cold Spring Harbor Lab., New York, str. 134.
7. Wittmann-Liebold B., (1986), w *Structure, Function and Genetics of Ribosomes*, red. Hardesty B., Kramer G., str. 326–361, Springer-Verlag, New York.
8. Traut R. R., Tewardi D. S., Sommer A., Gavino G. R., Olson H. M., Glitz D. G., (1987), w *Structure, Function and Genetics of Ribosomes* red. Hardesty B., Kramer G., str. 286–308, Springer-Verlag, New York.
9. Möller W., Maassen J. A., (1986), w *Structure, Function and Genetics of Ribosomes*, red. Hardesty B., Kramer G., str. 309–325, Springer-Verlag New York.
10. Zinker S., Warner J. R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1799–1807.
11. Issinger O. G., (1977), *Biochim Biophys. Acta*, **477**, 185–189.

12. Kudlicki W., Grankowski N., Gąsior E., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 493–498.
13. Mc Conkey E. H., Bielka H., Gordon J., Lastick S. M., Lin A., Ogata K., Reboud J. P., Traugh J. A., Traut R. R., Warner J. R., Welfie H. H., Wool J. O., (1979), *Mol. Gen. Genet.*, **169**, 1–6.
14. Jakubowicz T., (1988), Fosforylacja białka rybosomowego S6 w komórkach zwierzęcych i drożdżowych hodowanych w warunkach fizjologicznych i w stanie stresu, Wydawnictwo „Annales” UMCS Lublin.
15. Thomas G., Martin-Perez J., Siegman M., Otto A. M., (1982), *Cell*, **30**, 235–242.
16. Nielsen P. J., Duncan R., Mc Conkey E. H., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **120**, 351–355.
17. Burghardt S. I., Traugh J. A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14003–14008.
18. Paleň E., Traugh J. A., (1987), *J. Biol. Chem.* **262**, 3518–3523.
19. Duncan R., Mc Conkey E. H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 539–544.
20. Thomas D. G., Ballou L. M., Jaeggi N., Jenó P., Knesel J., Kramer Y., Krieg J., Olivier A. R., Rudkin B. B., Ziegler A., (1986), Annual Report Friedrich Miescher-Institut, Basel, 69–72.
21. Westermann P., Sohi M. K., Arnstein H. R. V., (1986), *FEBS Lett.* **205**, 171–174.
22. Leader D. P., Thomas A., Voorma H. O., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **655**, 69–75.
23. Mastropaolo W., Henshaw E. C., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **656**, 246–255.
24. Tas P. W. L., Martini O. H., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **163**, 561–567.
25. Wettenhall R. E. H., Nick H. P., Lithgow T., (1988), *Biochemistry*, **27**, 170–177.
26. Chan Y. L., Wool I. R., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 2891–2896.
27. Planta R. J., Mager W. H., Leer R. J., Woudt L. L., Rause H. A., Ei-Baradi T. T. A. L., (1986), w *Structure Function and Genetics of Ribosomes*, red. Hardesty B., Kramer G., str. 697–718, Springer-Verlag, New York.
28. Traugh J. A., Pendergast A. M., (1986), *Nucl. Acid. Res.*, **33**, 195–229.
29. Jakubowicz T., Leader D., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **164**, 83–88.
30. Jenó P., Ballou L. M., Novak-Hofer I., Thomas G., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 406–5410.
31. Matsuda Y., Guroff G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2832–2844.
32. Matsuda Y., Nakanishi N., Dickens G., Guroff G., (1986), *J. Neurochem.*, **47**, 1728–1734.
33. Novak-Hofer J., Thomas G., (1984), *J. Biol. Chem.* **259**, 5995–6000.
34. Novak-Hofer J., Thomas G., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10314–10319.
35. Pierre M., Toru-Delbouffe D., Gavaret J. M., Pomerance M., Jacquemin C., (1986), *FEBS Lett.*, **206**, 162–166.
36. Tabarini D., Heinrich J., Rosen O. M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4369–4373.
37. Pelech S. L., Krebs E. G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 11598–11606.
38. Erikson E., Maller J. L., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 742–746.
39. Jakubowicz T., Leader P., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **168**, 372–376.
40. Erikson E., Maller J. L., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 350–355.
41. Erikson E., Stefanowicz D., Blehis J., Erikson R. L., Maller J. L., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 3147–3155.
42. Jones S. W., Erikson E., Blenis J., Maller J. L., Erikson R. L., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3377–3381.
43. Ballou L. M., Jenó P., Thomas G., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 1188–1194.
44. Evans S. W., Farrar W., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 4624–4630.
45. Pierre M., Gavaret J. M., Matricon C., Pomerance M., Jacquemin C., Toru-Delbouffe D., (1988), *FEBS Lett.*, **228**, 219–222.
46. Ray L. B., Sturgill T. W., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1502–1506.

47. Szyszka R., Gąsior E., (1984), *Acta Biochim. Polon.*, **31**, 375–382.
48. Jakubowicz T., (1985), *Acta Biochim. Polon.*, **32**, 7–12.
49. Juliani M.H., Da Costa Maia J.C., Bonato M.C.N., (1983), *FEBS Lett.*, **154**, 400–406.
50. Cuhly M., Sripati C.E., Hayes D.H., (1985), *J. Cell. Physiol.*, **124**, 349–357.
51. Sripati C., Cuny M., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **162**, 669–674.
52. Jantzen H., Schultze I., (1987), *J. Cell. Physiol.*, **130**, 444–452.
53. Belanger G., Godin C., Lemieux G., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **120**, 143–148.
54. Larsen A., Sypherd P.S., (1980), *J. Bacteriol.*, **154**, 1467–1471.
55. Otaka E., Kumazaki T., Matsumoto K., (1986), *J. Bacteriol.*, **167**, 713–715.
56. Janssens P.M.W., (1987), *TIBS*, **12**, 456–459.
57. Kuo W.-N., Lee T.G., Richardson T.B., Cheema I.R., Brown L.G., Burch E.I., Nicolson J.S., Rahmani M.A., (1987), W Advances in protein phosphatases, t.4.
58. Johnson S.P., Warner J.R., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1338–1345.

WIESŁAW KUDLICKI*

Udział peptydów spektryno-podobnych w regulacji inicjacji syntezy białka w retikulocytach królika

Participation of spectrin-related peptides in regulation of protein synthesis initiation in rabbit reticulocytes

Wykaz stosowanych skrótów: eIF – eukariotyczne czynniki inicjujące, Met-tRNA_i – inicjatorowy metionyno-tRNA, dsRNA – dwuniciowy RNA, RSV – wirus mięsaka Rousa, GEF – czynnik odpowiedzialny za wymianę nukleotydów guaninowych, HCR – inhibitor translacji regulowany przez heminę, DAI – inhibitor translacji aktywowany przez dwuniciowy RNA, hsp – białka szoku termicznego

Z badań nad ekspresją informacji genetycznej w komórkach eukariotycznych wynika, że u organizmów wyższych translacja stanowi ważne miejsce regulacji. Modyfikacja wielu komponentów aparatu translacyjnego w drodze sprzężonych procesów fosforylacji i defosforylacji jest doskonałym przykładem takiej regulacji. Powszechnie znana jest fosforylacja niektórych czynników inicjujących takich, jak eIF-2, eIF-3, eIF-4B, białka S6 podjednostki rybosomowej 40S czy kompleksów mRNP. Szczególnie wiele uwagi w dotychczasowych badaniach poświęcono fosforylacji podjednostki α czynnika eIF-2. Uważa się, że modyfikacja tego białka pełni istotną rolę w mechanizmie kontroli inicjacji syntezy polipeptydu [1, 2, 3].

Inicjacja jest pierwszym a zarazem najbardziej złożonym etapem translacji mRNA [3, 4]. Duża złożoność procesu inicjacji wynika z rozbudowanego aparatu translacyjnego u organizmów wyższych. Zapoczątkowanie syntezy polipeptydu wymaga obecności przynajmniej dziewięciu czynników enzymatycznych zwanych czynnikami inicjującymi. Katalizują one przebieg cząstkowych reakcji składających się na proces inicjacji zakończony utworzeniem kompleksu inicjującego 80S. Jednym z lepiej poznanych pod względem struktury i funkcji czynników inicjujących jest czynnik eIF-2 [1, 4]. Jest to białko złożone przeważnie z trzech podjednostek α , β , γ różniących się ciężarem cząsteczkowym. Czynnik eIF-2 tworzy wraz z Met-tRNA_i i GPT tak zwany kompleks potrójny, który przenoszony jest w początkowej fazie inicjacji do podjednostki rybosomowej 40S.

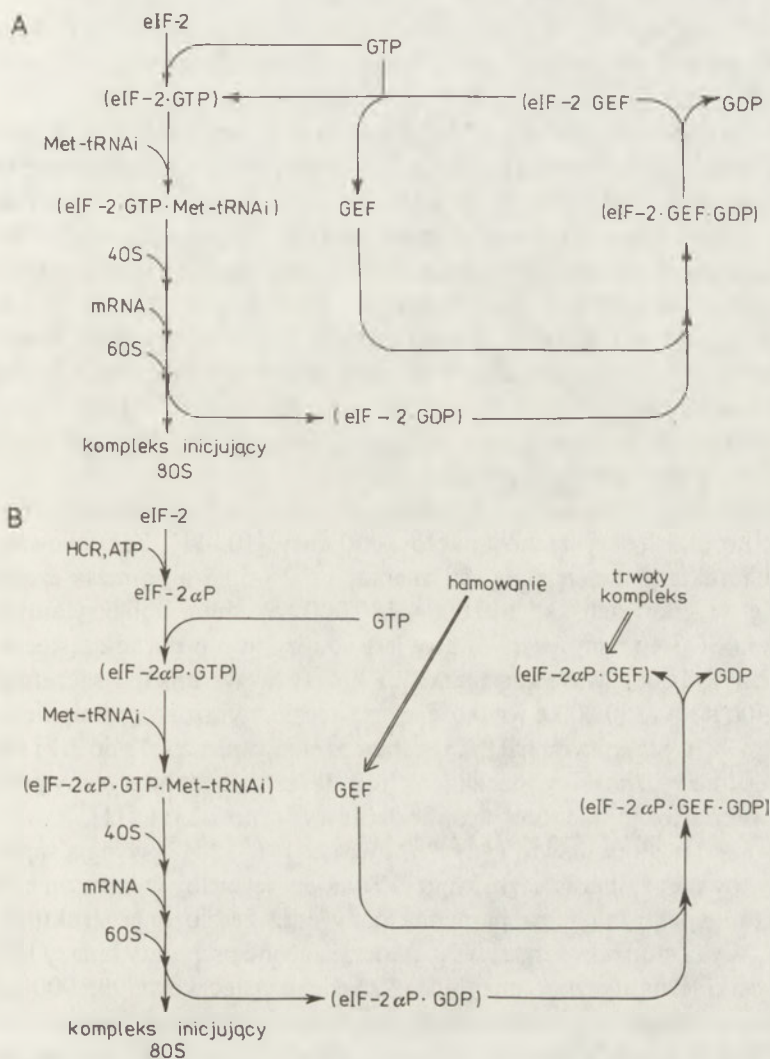
Uważa się, że za wiązanie GTP odpowiedzialna jest podjednostka α tego

*Dr. Zakład Biologii Molekularnej UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

czynnika, natomiast podjednostka γ uczestniczy w wiązaniu Met-tRNA_i i mRNA [2, 3].

Podjednostka α czynnika eIF-2 jest fosforylowana przez specyficzne kinazy białkowe. Proces ten zachodzi zarówno w warunkach *in vitro* jak *in vivo*, a jedynym fosforylowanym aminokwasem jest seryna. Fosforylacja eIF-2 została najlepiej udokumentowana w układzie retikulocytarnym. Badania przeprowadzone na tym materiale przyczyniły się w dużym stopniu do poznania mechanizmów oraz znaczenia fosforylacji eIF-2 α w kontroli syntezy polipeptydu. Wiadomo, że w lizatach retikulocytarnych za fosforylację eIF-2 α odpowiedzialne są dwie różne kinazy białkowe: enzym aktywowany w lizacie w warunkach braku heminy (HCR, ang. hemin controlled repressor) oraz kinaza aktywowana w obecności niskich stężeń dsRNA (DAI, ang. ds RNA activated translational inhibitor) [1, 5, 6]. Uważa się, że fosforylacja podjednostki α przez HCR lub DAI wpływa na zmianę aktywności czynnika eIF-2 i blokuje syntezę białka na etapie inicjacji. Wykazano również, że skutek działania obu kinaz może być odwracany przez specyficzną fosfatazę białkową obecną w lizatach retikulocytów [1, 2, 6]. Podobny mechanizm kontroli translacji został potwierdzony również w innych typach komórek eukariotycznych [2, 3]. Ponadto, szereg ostatnich doniesień wskazuje na istotne znaczenie fosforylacji eIF-2 α podczas działania czynników stresowych [7, 8, 9]. Można powiedzieć, że komórki, które znalazły się przejściowo w warunkach niekorzystnych dla swojego wzrostu (brak heminy w retikulocytach, szok termiczny, głodzenie aminokwasowe, infekcja wirusowa, brak surowicy) reagują w podobny sposób indukując fosfokinazy białkowe odpowiedzialne za fosforylację eIF-2 α i hamowanie syntezy białek niestresowych.

Przez długi czas nie było jednak jasne w jaki sposób fosforylacja eIF-2 α wpływa na zmianę jego aktywności biologicznej i prowadzi do zahamowania inicjacji syntezy polipeptydu. Obecnie wiadomo, że aktywność eIF-2 zależy od obecności dodatkowych czynników białkowych. Jednym z nich jest dobrze już poznany i scharakteryzowany czynnik GEF (ang. guanine nucleotide exchange factor) [1, 2, 3, 4]. Występuje on zazwyczaj w formie kompleksu z eIF-2, bądź w stanie wolnym w cytoplazmie. Jest to białko o masie cząsteczkowej 250 000 – 300 000, złożone z 5–6 różnych polipeptydów. Już od początku badań wiadomo było, że czynnik GEF dodany do lizatów retikulocytarnych pozbawionych heminy przywracał ich zdolność do syntezy białka, nie wpływał jednak na poziom fosforylacji eIF-2 α . Obecnie wiadomo, że czynnik ten ułatwia usunięcie GDP z kompleksu [eIF-2·GDP] i umożliwia zastąpienie go przez GTP. Wiadomo bowiem, że po zakończonym cyklu inicjacji syntezy polipeptydu, eIF-2 uwalniany jest z rybosomu w formie kompleksu [eIF-2·GDP] i w takiej postaci pozostaje on nieaktywny. Jego dalszy udział w translacji uzależniony jest od wymiany GDP na GTP w tym kompleksie. Ma to zasadnicze znaczenie dla regeneracji fizjologicznej aktywności eIF-2, ponieważ tylko kompleks [eIF-2·GTP] jest w stanie przyłączyć inicjatorowy tRNA i rozpocząć kolejną rundę inicjacji. Proces ten w języku angielskim określany jest jako „recycling” czynnika eIF-2. Szczegóły omawianej reakcji przedstawia skrótowo Ryc. 1A.



Ryc. 1. Schemat obrazujący udział czynnika odpowiedzialnego za wymianę nukleotydów guanimowych eIF-2(GEF) w regulacji inicjacji syntezy białka. A – przebieg inicjacji translacji w obecności nieufosforylowanego czynnika eIF-2, B – przebieg inicjacji translacji po fosforylacji podjednostki α czynnika eIF-2 przez kinazę HCR. (wg. 2, zmodyfikowany).

Fosforylacja podjednostki α czynnika eIF-2 przez HCR lub DAI blokuje reakcję wymiany nukleotydów GDP na GTP. Ufosforylowany eIF-2(α -P) zachowuje zdolność reakcji z GEF, tworzy z nim jednak trwały kompleks. Wiadomo, że w komórce retikulocytarnej stężenie molowe czynnika GEF jest dwudziestokrotnie mniejsze niż stężenie eIF-2. W ten sposób niewielkie ilości czynnika GEF odpowiedzialnego za regenerację eIF-2 unieczynniane są w formie kompleksu [eIF-2(α -P)-GEF]. Fosforylacja eIF-2 α pozwala więc na udział tej cząsteczki w przebiegu tylko jednej rundy inicjacji. Jego defosforylacja przywraca czynnikowi

zdolność dysocjacji GEF i pozwala na ponowne przyłączenie GTP. Mechanizm kontroli translacji poprzez fosforylację/defosforylację eIF-2 α przedstawia Ryc. 1B.

Badania nad kontrolą syntezy białka w retikulocytach królika mają już 15 letnią historię. Doprowadziły one do poznania mechanizmu i roli fosforylacji eIF-2 α w regulacji procesu translacji. Istnieją jednak nadal pewne wątpliwości dotyczące między innymi kinazy regulowanej przez heminę. Niejasny jest ciągle mechanizm aktywacji tego enzymu w warunkach nieobecności heminy jak i również miejsce jego występowania w komórce. Wiadomo, że obecność heminy w środowisku kinazy hamuje jej aktywność w stosunku do eIF-2 α , brak jest jednak jednoznacznej odpowiedzi o miejscu działania heminy w cząsteczce enzymu i sposobie jego inaktywacji. Szereg wątpliwości dotyczy również budowy strukturalnej HCR i mechanizmów regulujących jego aktywność w komórce. Badania ostatnich lat przyniosły pewien postęp w tej dziedzinie.

Enzym został wyizolowany z frakcji supernatantu postrybosomowego retikulocytów królika i oczyszczony około 2000 razy [10, 11]. Zaktywowana forma kinazy charakteryzuje się stałą sedymentacji 5.2–5.8S a jej masa cząsteczkowa waha się w granicach od 140 000–180 000. W żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS enzym obserwowany jest jako pasmo o masie cząsteczkowej od 80 000 do 100 000. Masa cząsteczkowa kinazy w warunkach sączenia na żelu wynosi 300 000–350 000 a wielkość jej cząsteczki wyrażona promieniem Stokesa równa jest 78Å. Stała asymetrii (f/f_0) została oszacowana na 1.73 do 2.1 i świadczy o dużej niesymetryczności cząsteczki enzymu. Jej kształt geometryczny przypomina wydłużoną pałeczkę, w której stosunek osiowy wynosi 23:1 [11].

Ostatnie dane z pracowni Hardesty'ego [11, 12, 13] wydają się wyjaśniać ten nietypowy kształt cząsteczki kinazy. Zdaniem tej grupy wynika on z obecności fragmentów spektryny w preparacie kinazy oraz ze złożonej struktury samego enzymu. Wykazano bowiem, że wysoko oczyszczone preparaty kinazy HCR, obok podjednostki katalitycznej enzymu o masie cząsteczkowej 95 000–100 000, zawierają również w swoim składzie polipeptydy rozpoznawane przez przeciwciała monoklonalne specyficzne dla spektryny [12, 13]. W zależności od preparatu kinazy, masa cząsteczkowa towarzyszących enzymowi polipeptydów wynosi odpowiednio 90 000, 94 000, lub 120 000 daltonów [11]. Spektryna, główne białko szkieletu plazmatycznego retikulocytów, znana jest z asymetrycznego kształtu [14, 15]. Jej podstawowym elementem strukturalnym jest dimer złożony z elastycznych, pałeczkowatych podjednostek α (m.cz. 240 000) i β (m.cz. 220 000) o długości 100 nm każda. Podjednostki te mają zdolność polimeryzacji, tworząc $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer o łącznej długości 200 nm. Ich skład aminokwasowy wskazuje na wysoki stopień homologii i, jak stwierdzono, zbudowane są one z powtarzających się fragmentów zawierających po 106 aminokwasów [15].

Polipeptyd o masie cząsteczkowej 90 000 dominuje ilościowo w preparacie kinazy i jemu w dotychczasowych badaniach poświęcono najwięcej uwagi [11, 13, 16]. Daje się on częściowo oddzielić od aktywności kinazy w drodze elektroforezy w

zelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Przeciwciała monoklonalne dla białka 90 000 krzyżowo reagują z łańcuchami α i β spektryny. Oczyszczony polipeptyd 90 000 nie fosforyluje eIF-2 α , natomiast jego obecność w preparacie kinazy zwiększa około trzykrotnie poziom fosforylacji tego czynnika inicjującego. Podobnie zachowują się również łańcuchy α i β spektryny [11]. Właściwości fizyczne białka o masie cząsteczkowej 90 000 zbliżone są do tych jakie obserwowano w przypadku oczyszczonej frakcji HCR [16]. Wykazano, że zarówno łańcuch β spektryny jak i polipeptyd 90 000 fosforylowane są *in vitro* przez kinazę kazeinową II oraz katalityczną podjednostkę kinazy zależnej od cAMP [13]. W przypadku β spektryny fosforylowane miejsca zlokalizowane są w C-końcowym fragmencie białka o ciężarze cząsteczkowym 20 000. W obu przypadkach funkcjonalne znaczenie tej modyfikacji nie jest jeszcze znane. Obserwacje te skłoniły autorów do wysunięcia wniosków, że polipeptyd 90 000 zasocjowany z kinazą HCR jest genetycznie spokrewniony z frakcją β spektryny albo stanowi fragment jej C-końca uwolniony w drodze proteolizy. Sugerowano również, że polipeptyd 90 000 może być miejscem działania heminy w cząsteczce inhibitora. Zaobserwowano bowiem, że hamujący wpływ heminy na aktywność enzymatyczną kinazy odwracany był w obecności wzrastających stężeń białka 90 000. Znane są również doniesienia wskazujące na wiązanie się heminy z frakcją spektrynową oraz jej wpływ na organizację i polimeryzację łańcuchów α , β spektryny [11, 13].

Dużym i ciekawym zaskoczeniem było stwierdzenie, że sekwencja aminokwasów N-końcowego fragmentu białka 90 000 retikulocytów królika jest bardzo podobna do analogicznej sekwencji białka szoku termicznego 83 000 *Drosophila* (20 spośród 22 aminokwasów). Podobieństwo to zostało potwierdzone również w odniesieniu do innych znanych białek Hsp (ang. heat shock proteins) 83 – 90 kDa, a między innymi białka drożdży oraz komórek limfatycznych myszy [16]. Wszystkie one posiadają wydłużoną strukturę a w przypadku białka Hsp 90 000 komórek HeLa wiadomo, że jego stała sedymentacji i promień Stockesa są zbliżone do tych, jakie opisano dla polipeptydu 90 000 obecnego w preparacie HCR retikulocytów.

Z fizjologicznego punktu widzenia interesujący jest fakt, że indukcja syntezy białka Hsp 90 000 w komórkach HeLa połączona jest z równoczesnym hamowaniem translacji innych białek komórkowych. Wiadomo, że w odpowiedzi na szok termiczny komórki te reagują wzmożoną fosforylacją eIF-2 α [7, 9]. Kinaza odpowiedzialna za tę fosforylację w komórkach HeLa wrażliwa jest na heminę a jej aktywność hamowana jest przez przeciwciała skierowane przeciwko frakcji HCR retikulocytów [17]. Z drugiej strony białko 90 000 syntetyzowane przez komórki HeLa w warunkach szoku cieplnego rozpoznawane jest podobnie jak analogiczne białko retikulocytów przez przeciwciała specyficzne dla spektryny. Jest rzeczą prawdopodobną, że właśnie to białko odpowiedzialne jest za modulowanie aktywności eIF-2 α kinazy podczas stresu cieplnego. Już wcześniej obserwowano połączenie białek Hsp 83 – 90 kDa z różnymi kinazami tyrozynowymi jak również z kinazą kazeinową II [13]. Trudno jest na obecnym etapie badań wyjaśnić dlaczego

białka zidentyfikowane jako białka szoku termicznego rozpoznawane są jednocześnie przez przeciwciała specyficzne dla spektryny i dają z nimi krzyżowe reakcje immunologiczne.

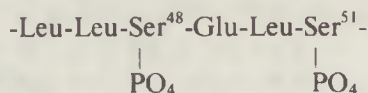
Godnym podkreślenia jest fakt, że białko o masie cząsteczkowej 120 000 obecne w niewielkich ilościach w preparacie kinazy towarzyszy również fosfatzie fosfobiałkowej, defosforylującej w uprzywilejowany sposób podjednostkę α czynnika eIF-2. Jest ono rozpoznawane również przez przeciwciała specyficzne dla spektryny i obok białka o masie cząsteczkowej 35 000 stanowi główny składnik wspomnianej fosfatazy. Jego obecność ma istotne znaczenie dla aktywności enzymatycznej fosfatazy w stosunku do eIF-2 (α -P) [11, 12].

Interesujący jest również fakt, że polipeptyd β spektryny dodany do lizatu retikulocytarnego hamuje syntezę białka w stężeniach zbliżonych do tych, jakie używano w badaniach HCR. Przeprowadzone badania kinetyczne wskazują, że hamowanie ma miejsce na etapie inicjacji, jednak jego precyzyjny mechanizm nie jest znany [18].

Ostatnie lata przyniosły również znaczny postęp w badaniach dotyczących samego czynnika eIF-2. Przyczyniły się one do lepszego poznania właściwości fizykochemicznych poszczególnych jego podjednostek, ich składu aminokwasowego oraz przybliżonej funkcji biologicznej.

Określona została struktura pierwszorzędowa polipeptydu α czynnika eIF-2 komórek fibroblastów ludzkich HeLa, mózgu szczura oraz częściowo retikulocytów królika [19, 20, 21]. W każdym z tych przypadków skład aminokwasowy jest bardzo zbliżony i wskazuje na znaczny konserwatyzm ewolucyjny omawianej cząsteczki. Zarówno u szczura jak i u człowieka podjednostka α złożona jest z 315 aminokwasów (m.c. 36.1 kDa) a ich sekwencje wskazują bardzo wysoki stopień homologii (99%). Sekwencja pierwszych 52 aminokwasów N-końcowego fragmentu eIF-2 α retikulocytów królika jest zgodna z analogicznymi odcinkami obserwowanymi u szczura i człowieka [19, 20].

Zidentyfikowane zostały miejsca fosforylowane w podjednostce α w warunkach hamowania inicjacji syntezy polipeptydu. Wykazano, że spośród 16 reszt seryny obecnych w eIF-2 α jedynie 2 ulegają fosforylacji. Są to: seryna w pozycji 48 [20] oraz w pozycji 51 [22, 23, 25] zlokalizowane w pobliżu N-końca omawianej cząsteczki. Niżej przedstawiony fragment N-końca podjednostki α zawiera zaznaczone, potencjalne miejsca fosforylacji dla kinazy regulowanej przez heminę w retikulocytach królika [20, 22].



Zaobserwowano, że w warunkach *in vitro* obraz fosforylacji eIF-2 α ulega zmianie pod wpływem łańcuchów α lub β spektryny. Obserwowano wzmożoną w ich obecności fosforylację polipeptydu α w miejscu seryny 51 [22], natomiast przy braku spektryny seryna 48 była głównym modyfikowanym aminokwasem [20]. W badaniach nad identyfikacją miejsc fosforylowanych przez HCR w podjednostce α

bardzo przydatny okazał się syntetyczny polipeptyd złożony z 13 aminokwasów: Ile-Glu-Gly-Arg-Ile-Leu-Leu-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Arg-Arg, o sekwencji odpowiadającej aminokwasom 41 – 54 N-końcowego regionu podjednostki α retikulocytów królika. W tym przypadku seryna w pozycji 51 była jedynym biorcą fosforanu z ATP, w reakcji katalizowanej przez kinazę regulowaną przez heminę, a wartość K_m dla tego substratu wynosi $80 \mu M$ [23]. Jest to zgodne z obserwacjami Colthurst i wsp. [23], którzy sugerują, że seryna 51 jest głównym fosforylowanym w eIF-2 α miejscem wspólnym dla obozu znanych inhibitorów translacji – HGR i DAI.

Inne podejście eksperymentalne w kierunku określenia miejsc fosforylacji we eIF-2 α zastosowała ostatnio grupa Hershey'a [19]. Wyizolowali oni z komórek ludzkich HeLa informacyjny RNA złożony z 1600 nukleotydów, stanowiących transkrypt genu dla podjednostki α czynnika eIF-2. W drodze ukierunkowanych mutacji punktowych w otrzymanych komplementarnych DNA uzyskali oni mutanty z zablokowanymi miejscami fosforylacji w pozycji seryny 48 lub seryny 51. W miejscu wspomnianych reszt seryny została podstawiona alanina. Fragmenty sekwencji DNA mutantów w serynie 48 i w serynie 51 oraz wprowadzone zmiany nukleotydów przedstawia schemat [24]:

Typ dziki:

```
ATT CTT CTT AGT GAA TTA TCC AGA CGA CGT ATC
Ile Leu Leu Ser Glu Leu Ser Arg Arg Arg Ile
```

Mutant w Ser – 48:

```
ATT CTT CTT GCT GAA TTA TCC AGA CGA CGT ATC
Ile Leu Leu Ala Glu Leu Ser Arg Arg Arg Ile
```

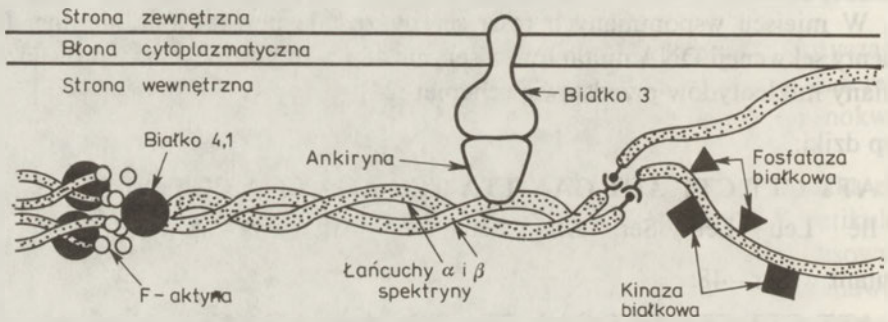
Mutant w Ser – 51:

```
ATT CTT CTT AGT GAA TTA GCC AGA CGA CGT ATC
Ile Leu Leu Ser Glu Leu Ala Arg Arg Arg Ile
          48                51
```

Zmutowane cDNA były transkrybowane *in vitro* oraz poddane translacji w lizatach retikulocytów królika. Wykazano, że w przypadku typu dzikiego i mutantu z zablokowaną seryną 48 zsyntetyzowane polipeptydy α były intensywnie fosforylowane przez enzymy obecne w lizacie. Dodatkowe ilości kinazy regulowanej przez heminę oraz kinazy aktywowanej przez dwuniciowy RNA wzmagały w obydwu przypadkach fosforylację eIF-2 α . W przypadku mutantu w pozycji seryny 51 obserwowano nieznaczną fosforylację polipeptydu α a wprowadzenie dodatkowych ilości HCR i DAI nie wpływało na zmianę obrazu fosforylacji. Zdaniem autorów seryna w pozycji 51 stanowi właściwe miejsce fosforylacji zarówno dla HCR jak i DAI, którego modyfikacja prowadzi do zahamowania inicjacji syntezy białka.

O tym, że błony biologiczne, zarówno wchodzące w skład cytoszkieletu, jak i plazmatyczne, poza funkcjami strukturalnymi odpowiadają także za sterowanie

szeregiem procesów metabolicznych istotnych dla życia komórki, było wiadomo już od dawna. Obecnie proponuje się, że spektryna, białko szkieletu plazmatycznego retikulocytów, bierze również udział w regulacji procesu translacji, wpływając na aktywność enzymów uczestniczących w fosforylacji i defosforylacji eIF-2 α . Przemawia za tym obecność polipeptydów spektryno-pochodnych w preparatach kinazy i fosfatazy jak również ich udział w modulowaniu aktywności tych enzymów w stosunku do eIF-2 α . Przypuszcza się, że zarówno kinaza jak fosfataza występują w komórce w formie związanej z błonami szkieletu plazmatycznego, skąd mogą być uwalniane do cytoplazmy w wyniku proteolizy. Przejście do frakcji białek rozpuszczalnych wiązałoby się z jednoczesną aktywnością enzymów. Wiadomo bowiem, że w świeżo otrzymanych ekstraktach komórkowych, kinaza HCR występuje w dużym stopniu w formie nieaktywnego prekursora. Potraktowanie takiego ekstraktu proteazą (np. trypsyną) zwiększa znacznie aktywność obecnej w nim kinazy w stosunku do eIF-2 α .



Ryc. 2. Hipotetyczny schemat komórkowego rozmieszczenia enzymów uczestniczących w fosforylacji i defosforylacji podjednostki α czynnika eIF-2 (wg. 25, zmodyfikowany)

Hipotetyczny schemat wewnątrzkomórkowej lokalizacji enzymów biorących udział w modyfikacji podjednostki α czynnika eIF-2 przedstawia Rycina 2.

Artykuł napisano w ramach prac finansowanych przez CPBR 3.13. i RP-II-13.

Artykuł otrzymano 17 lipca 1988 r.
Zaakceptowano do druku 5 stycznia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Ochoa S., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 325–349.
2. Proud Ch. G., (1986), *TIBS*, **11**, 73–77.
3. Pain V. M., (1986), *Biochem. J.*, **235**, 625–637.
4. Moldave K., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 1109–1149.
5. Petryshyn R., Chen J. J., (1986), *The Enzymes*, **18**, 360–381.
6. Grankowski N., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 3–28.
7. Duncan R. and Hershey J. W. B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 11882–11889.
8. Duncan R. and Hershey J. W. B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5493–5497.

9. Scorsone K. A., Panniers R., Rowlands A. G. and Henshaw E. C., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 14 538–14 543.
10. Edelman A. M., Blumenthal D. K., Krebs E. G., (1987), *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 567–613.
11. Kudlicki W., Fullilove S., Read R., Kramer G., Hardesty B., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 9695–9701.
12. Hardesty B., Kramer G., Kudlicki W., Chen S.-Ch., Rose D., Zardeneta G., Fullilove S., (1985), *Adv. Prot. Phosphatases I*, 235–257.
13. Kudlicki W., Fullilove S., Kramer G., Hardesty B., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5332–5336.
14. Bennett V., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 273–304.
15. Speicher D., (1986), *J. Cell. Biochem.*, **3**, 245–258.
16. Rose D. W., Wettenhall R. E. M., Kudlicki W., Kramer G., Hardesty B., (1987), *Biochemistry*, **26**, 6583–6587.
17. De Benedetti A., Baglioni C., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 338–342.
18. Kudlicki W., Kramer G., Hardesty B., (1986), *FEBS Lett.*, **200**, 271–274.
19. Ernst H., Duncan R. F., Hershey W. B., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1206–1212.
20. Wettenhall R. E. H., Kudlicki W., Kramer G., Hardesty B., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 12 444–12 447.
21. Schafer M. P., Fairwell T., Parker D. S., Knight M., Anderson W. F., Safer B., (1987), *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**, 337–346.
22. Kudlicki W., Wettenhall R. E. H., Kemp B. E., Szyszka R., Kramer G., Hardesty B., (1987), *FEBS Lett.*, **215**, 16–20.
23. Colthurst D. R., Campbell D. G., Proud C. G., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **166**, 357–363.
24. Pathak V. K., Schindler D., Hershey J. W. B., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 993–995.
25. Kramer G., Wollny E., Fullilove S., Tipper J., Kudlicki W., Hardesty B., (1985), w *Haemotology and Blood Transfusion*, red. Neth, Gallo, Greaves, Janka, vol. 29. str. 302–305, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

ANDRZEJ JERZMANOWSKI*

Wpływ postsyntetycznych fosforylacji na strukturę histonu H1 i jego funkcję w chromosomach (*Minireview*)

Effect of postsynthetic phosphorylation on the structure and chromosomal function of histone H1 (*Minireview*)

Chromosomy organizmów eukariotycznych zbudowane są z pojedynczego, ciągłego dupleksu DNA połączonego na całej swej długości z występującymi periodycznie, regularnymi kompleksami małych, zasadowych białek – histonów. Podstawowa podjednostka strukturalna chromosomu – nukleosom, składa się z białkowego rdzenia zawierającego 8 cząsteczek histonów rdzeniowych (po parze każdego z 4 rodzajów: H2A, H2B, H3 i H4), owiniętego wokół tego rdzenia odcinka DNA o długości ok. 200 par zasad (z czego z powierzchnią rdzenia oddziałuje ściśle 146 par zasad) oraz jednej cząsteczki histonu H1. Ta ostatnia jest blisko dwa razy większa od cząsteczek histonów rdzeniowych. Umieszczona jest na zewnątrz białkowego rdzenia nukleosomu i przypuszczalnie stabilizuje pozycję dupleksu DNA w miejscu jego wejścia i zejścia z powierzchni rdzenia. H1 oddziałuje także z fragmentem DNA (z tzw. łącznikiem)** przebiegającym pomiędzy sąsiadującymi nukleosomami.

Pojedynczy łańcuch nukleosomów tworzy włókno cienkie chromatyny (chromatyna i chromosom są terminami używanymi wymiennie w literaturze biochemicznej) o grubości 10 nm (jest to średnica nukleosomu). Włókno cienkie tworzy z kolei struktury wyższego rzędu. Pierwszą z nich jest włókno grube o średnicy 30 nm zwane też solenoidem ponieważ powstaje przez ściśle, spiralne zwinięcie włókna 10 nm. W solenoidzie na jeden skręt spirali przypada 6 nukleosomów. W tym stadium stopień upakowania DNA jest już dość znaczny, odcinek solenoidu zawiera bowiem ok. 40-krotnie dłuższy od siebie fragment DNA. Solenoid może tworzyć struktury jeszcze wyższego rzędu, aż do stadium maksymalnego upakowania DNA, które osiągnęte jest w czasie mitotycznej kondensacji chromosomów. Długość DNA zawartego w pojedynczym chromosomie przekracza ok. 10 000 razy długość samego chromosomu.

Regularna, nukleosomowa struktura chromatyny jest uniwersalną cechą organizacji materiału genetycznego eukariontów. Uniwersalność tę zapewnia silnie

* Doc. dr hab., Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, 02-089 Warszawa, Żwirki i Wigury 93

** nazwa angielska: linker

konserwatywna ewolucyjnie struktura trzeciorzędowa histonów (w wypadku H3 i H4 silnie konserwatywna ewolucyjnie jest również struktura pierwszorzędowa). Nie ulega wątpliwości, że obecność nukleosomów i tworzonych przez nie struktur wyższego rzędu jest absolutnie niezbędna dla funkcjonowania komórki eukariotycznej. Jakie ma znaczenie dla komórki ta skomplikowana, przestrzenna organizacja DNA? Po pierwsze umożliwia ona zredukowanie do rozsądnych wymiarów niezwykle długich cząsteczek DNA i sprawne operowanie nimi w procesach takich jak np. podział komórki. Po drugie umożliwia bardzo skuteczne zablokowanie dostępu do informacji genetycznej. Ta druga funkcja jest niezwykle istotna ze względu na sposób funkcjonowania komórki eukariotycznej. W odróżnieniu od komórki prokariotycznej replikuje ona swój DNA tylko w ściśle określonej fazie cyklu komórkowego i jest zdolna do różnicowania, które wymaga skutecznego powstrzymania transkrypcji w znacznych obszarach genomu.

Obecnie powszechnie akceptowany jest pogląd, że jedną z najważniejszych konsekwencji skompleksowania DNA z histonami jest represja transkrypcji i replikacji [1]. Kluczową rolę w tej represji gra histon H1. Jest on tym spośród histonów, który odpowiedzialny jest za tworzenie z cienkiego włókna chromatynowego solenoidu i kolejnych struktur wyższego rzędu. Właśnie te struktury, a nie sama obecność nukleosomów, stanowią zaporę dla procesów wymagających aktywnego udziału DNA. Pozbawienie chromatyny histonu H1 umożliwia skuteczną inicjację transkrypcji *in vitro* pomimo skomplikowania DNA z rdzeniami nukleosomowymi [2].

Kluczowym elementem akceptowanego dzisiaj modelu regulacji dostępności DNA chromatyny dla transkrypcji i replikacji jest modulacja represyjnej funkcji H1. W jaki sposób modulacja ta może się w komórce dokonywać? Wydaje się, że mogą tu wchodzić w grę co najmniej dwa, funkcjonujące niezależnie mechanizmy. Jeden związany jest z istnieniem wariantów sekwencyjnych H1 (w komórce ssaka istnieje co najmniej 5–6 wariantów sekwencyjnych H1), drugi z jego postsyntetycznymi modyfikacjami.

Na podstawie danych doświadczalnych pokazujących, że warianty sekwencyjne H1 różnią się między sobą zdolnością do kondensowania DNA i chromatyny, a także, że są niejednociele rozmieszczone w chromatynie, Cole zaproponował, że różnice w stopniu skondensowania chromatyny (heterochromatynizacji) widoczne pod mikroskopem wywołane są nierównomiernym rozmieszczeniem wariantów H1. Według koncepcji Cole'a wzór skondensowania chromatyny może określić kolejność replikacji poszczególnych jej rejonów i decydować o typie różnicowania komórkowego [3].

Jeśli idzie o modyfikacje postsyntetyczne, H1 może w chromatynie ulegać poli(ADP)rybozylacji, fosforylacji, a także metylacji. Spośród tych modyfikacji zdecydowanie najistotniejsza wydaje się fosforylacja, o niej też wiadomo najwięcej.

Dla omówienia znaczenia fosforylacji pomocne będzie krótkie przedstawienie budowy cząsteczki H1 i danych dotyczących jej funkcjonowania w chromatynie.

Histon H1 (średnio ok. 220 aminokwasów) jest białkiem o budowie mieszanej.

Dwie struktury nieuporządkowane i bogate w aminokwasy zasadowe (Lys, Arg) fragmenty końcowe: krótszy N-końcowy (35–40 aminokwasów) i dłuższy C-końcowy (100–110 aminokwasów) przedzielone są globularnym rejonem cząsteczki, zbudowanym z 80–90 aminokwasów. Rejon globularny zawiera większość aminokwasów hydrofobowych i całość struktury 2-go i 3-cio rzędowej wykrywanej w cząsteczce HI. *In vitro*, w roztworze, faldowanie rejonu hydrofobowego typowego (np. ssaczego) HI następuje już od ok. 0,3 M NaCl.

Szereg danych doświadczalnych wskazuje na to, że to właśnie część globularna HI, umieszczona w specyficznym dla siebie miejscu wiązania na powierzchni nukleosomu, „spina” schodzący i wchodzący dupleks DNA wymuszający charakterystyczne zygzakowate ułożenie nukleosomów we włóknie cienkim chromatyny. N- i C-końcowe części niezestrukturalizowane oddziałują prawdopodobnie głównie z linkerem, to jest międzynukleosomowym fragmentem DNA. Dokładny sposób ich związania z DNA nie jest znany. Ze względu na znaczną część dodatnich ładunków mogą one skutecznie neutralizować sporą część ujemnie naładowanych grup fosforanowych w linkerowym DNA.

Mechanizm działania HI w chromatynie nie jest całkowicie jasny. Dla efektu kondensacyjnego (indukcji struktur wyższego rzędu) niezbędna jest przede wszystkim skuteczna neutralizacja grup fosforanowych DNA. Stwierdzono, że izolowane C-końcowe fragmenty HI są zdolne do samodzielnego kondensowania chromatyny *in vitro*.

W cząsteczce HI fosforylacji ulega seryna i treonina. Nie stwierdzono do tej pory fosforylacji tyrozyny. Wszystkie miejsca fosforylacji rozmieszczone są w niezestrukturalizowanych N- i C-końcowych „ogonach” cząsteczki. W żadnym badanym do tej pory HI nie znaleziono fosforylacji w części globularnej. W typowej cząsteczce HI ssaków maksymalnie fosforylacji ulega 8 miejsc (6 seryn i 2 treoniny).

W komórkach eukariotycznych można wyróżnić dwa rodzaje fosforylacji HI: a) fosforylację charakterystyczną dla komórek stacjonarnych (niedzielących się) b) fosforylację charakterystyczną dla komórek dzielących się.

W komórkach nie dzielących się (ze zróżnicowanych tkanek) obserwuje się fosforylację niewielkiej puli HI (ok. 1% HI związanego z chromatyną) po indukcji takimi bodźcami, jak: hormony podawane *in vivo* (glukagon w przypadku HI z wątroby szczura, TSH w przypadku HI z tarczycy cielęcia), dibutyrylo-cAMP (stacjonarne komórki z kultur tkankowych), szok termiczny (*Tetrahymena*) [4]. We wszystkich opisanych przypadkach fosforylacja jest bardzo wybiórcza. Ogranicza się na ogół (u ssaków) do wprowadzenia jednego fosforanu w tak zwane miejsce A w HI (Ser 37) leżące w N-końcowym fragmencie cząsteczki tuż przed początkiem rejonu globularnego. Fosforylowana w miejscu A seryna leży w charakterystycznym otoczeniu: Lys-Ala-Ser/PO₄-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Glu-Leu-Ile-Thr-Lys. Identycznej fosforylacji dokonuje *in vitro* kinaza zależna od cAMP z tym, że fosforylacji w miejscu A ulega wtedy 100% obecnych w roztworze cząsteczek HI. Sądzi się, że ta sama, zależna od cAMP kinaza działa także *in vivo*. Ponieważ stymulacja fosforylacji w miejscu A wspomnianymi wyżej bodźcami dotyczy

niewielkiej puli H1 i skorelowana jest z pojawieniem się w komórkach nowego RNA przypuszcza się, że pośredniczy ona w otwieraniu dla transkrypcji jakichś wybranych rejonów chromatyny. Pomimo iż fosforylacja w miejscu A nie wywiera dramatycznego wpływu na konformację całego H1 (badaną *in vitro*) osłabia ona wyraźnie siłę wiązania N-końcowego fragmentu z DNA [4].

Fosforylacja H1 w komórkach dzielących się jest zjawiskiem zachodzącym na o wiele większą skalę. Jest to też zjawisko uniwersalne wśród eukariontów. Za wyjątkiem drożdży, u których wciąż jeszcze sporna jest sprawa identyfikacji H1, fosforylację H1 związaną z cyklem mitotycznym wykryto u ssaków [5], owadów [6], pierwotniaków [7], a także u tak prymitywnych eukariontów jak śluzowce [8]. Za fosforylację tę odpowiedzialna jest kinaza zwana wzrostową, enzym niezależny od cAMP, który, jak się wydaje, może ulegać aktywacji przez fosforylację. Kinaza ta rozpoznaje sekwencję: Lys-Ser(Thr)/PO₄⁻/-Pro-Lys, a więc inną od rozpoznawanej przez kinazę zależną od cAMP.

Sposób fosforylacji H1 w cyklu podziałowym został szczegółowo przebadany u ssaków [5] oraz u niższego eukarionta *Physarum polycephalum* [8]. U ssaków (linia komórek chomika CHO) fosforylacja H1 zaczyna się w fazie G1 od wprowadzenia jednej grupy fosforanowej do C-końcowego fragmentu ok. 50% cząsteczek. W okresie syntezy DNA (faza S) fosforylacja typu G1 jest kontynuowana, pojawia się także dodatkowo częściowa fosforylacja (ok. 10% cząsteczek H1) w nowym miejscu fragmentu C-końcowego. Fosforylacja w fazie G2 jest podobna do tej w G1 i S, wzrasta nieco ilość cząsteczek z przynajmniej dwoma grupami fosforanowymi. Zasadnicza zmiana w sposobie fosforylacji następuje, gdy komórki wchodzi w okres mitozy. Rozpoczyna się wówczas zjawisko zwane superfosforylacją H1. Cały chromatynowy H1 (wszystkie warianty sekwencyjne) ulega fosforylacji, przy czym wszystkie cząsteczki uzyskują maksymalną liczbę (od 6 w przypadku H1 chomika) fosforanów. Fosforylacje następują zarówno w C- jak i N-końcowym fragmencie cząsteczki i dotyczą zarówno seryny jak i treoniny. Po zakończeniu mitozy, w czasie dekondensacji chromatyny wszystkie fosforany obecne w H1 są usuwane. Fosforylacja H1 w cyklu komórkowym komórek odbywa się według z grubsza podobnego schematu.

W naszym laboratorium badaliśmy szczegółowo sposób fosforylacji histonu H1 u *Physarum polycephalum*, śluzowca, który jest typowym przedstawicielem niższych eukariontów, o niewielkiej zdolności do różnicowania. Histon H1 u tego organizmu, podobny zarówno pod względem składu aminokwasowego jak i podstawowych własności do H1 ssaczy, jest największym z dotąd poznanych przedstawicieli tej klasy białek (zawiera ok. 320 aminokwasów, jest więc o $\frac{1}{3}$ dłuższy od H1 ssaków). W *Physarum* występuje tylko jeden wariant sekwencyjny H1 [8].

Physarum jest niezwykle dogodnym materiałem do badań zjawisk w cyklu komórkowym ze względu na naturalną synchronię podziałów jądrowych. Przeprowadzone przez nas badania sposobu fosforylacji H1 w cyklu komórkowym *P. polycephalum* wykazały, obok podobieństw, także bardzo interesujące różnice w

stosunku do fosforylacji HI u ssaków. Być może różnice te mogą rzucić pewne światło na ogólną rolę fosforylacji HI w komórce.

Podobnie jak u ssaków, HI w *Physarum* ulega w cyklu komórkowym bardzo intensywnym fosforylacjom, których kulminacją jest masowa i odwracalna superfosforylacja podczas mitozy, ściśle skorelowana czasowo z mitotyczną kondensacją chromosomów. *Physarum* różni się od ssaków przede wszystkim tym, że w czasie interfazy fosforany wprowadzane są nie do części, a do wszystkich cząsteczek HI i że ta interfazalna fosforylacja nie jest usuwana po mitozie, lecz utrzymuje się (w starym HI) również w następnym cyklu komórkowym. Mamy tu do czynienia z niespotykaną u innych organizmów, nieodwracalną modyfikacją HI przez fosforylację. Dopiero na tę nieodwracalną fosforylację interfazową nałożona jest odwracalna superfosforylacja mitotyczna, w czasie której ilość fosforanów na cząsteczkę HI zwiększa się przejściowo z ok. 8–12 w interfazie do ok. 16–24 w metafazie mitozy.

Szczegółowe badania losów nowosyntetyzowanego HI w *Physarum* wykazały, że po syntezie (w fazie S) odkładany jest on w chromatynie w formie niezmodyfikowanej. Pierwszą zachodzącą modyfikacją nie jest jednak fosforylacja, a metylacja (jest to pierwszy przypadek, w którym wykazano ten rodzaj modyfikacji w HI). Polega ona na przyłączeniu grup metylowych do reszt epsilon-NH₂ w 15–20% lizyn w cząsteczce HI. Dopiero po zakończeniu tej nieodwracalnej już później metylacji może się rozpocząć interfazowa fosforylacja HI [8].

Jaka może być funkcja fosforylacji HI w dzielących się komórkach? O ile fosforylacjom interfazowym (G1, S i G2) przypisywano na ogół znaczenie w rozluźnieniu struktury chromatyny (głównie na podstawie badań fizyko-chemicznych w modelowych układach *in vitro*), to w przypadku superfosforylacji mitotycznej postulowano wielokrotnie odwrotną rolę – udział w kondensacji chromosomów w mitozie. W tym ostatnim przypadku głównym argumentem była ścisła korelacja czasowa obu zjawisk, a także to, że osłabienie ładunku HI przez fosforylację nie musi zmniejszać jego zdolności do kondensacji ponieważ:

a) osłabienie ścisłego oddziaływania N- i C-końcowych fragmentów HI z łącznikowymi odcinkami DNA może prowadzić do zmiany sposobu wiązania HI: zamiast spinać nukleosomy w pojedynczym włóknie może on tworzyć mostki łączące różne włókna, stając się przez to silnym czynnikiem agregującym.

b) niektóre rodzaje fosforylacji, mimo iż sumarycznie zmniejszają ilość dodatnich ładunków w HI mogą oddziaływać na stabilność konformacyjną części globularnej, zwiększając np. jej powinowactwo do nukleosmu i wpływając na wzrost zdolności do kondensowania DNA.

W szeregu wykonywanych ostatnio badań fizyko-chemicznych nad efektem kondensacyjnym fosforylacji w N- i C-końcowych rejonach HI nie stwierdzono opisanego wyżej sieciowania włókien chromatynowych [9, 10]. Trudniejsza do rozstrzygnięcia jest sprawa ewentualnego wpływu fosforanów na konformację części globularnej. U ssaków, ze względu na stosunkowo niewielką ilość reszt fosforanowych wprowadzanych do cząsteczki HI, wpływ taki nie jest łatwy do

zauważenia. Bardzo pomocny okazał się tu jednak H1 z *Physarum*. Ze względu na niespotykaną u innych organizmów nieodwracalność fosforylacji interfazowej postanowiliśmy sprawdzić jakiego fragmentu cząsteczki ona dotyczy i jaki wywiera wpływ na oddziaływanie H1 z chromatyną.

W wyniku podjętych badań stwierdziliśmy, że fosforylacja interfazalna w H1 z *Physarum* nie dotyczy części globularnej, ani rejonu N-końcowego, grupuje się natomiast w ok. 70-cio aminokwasowym fragmencie rejonu C-końcowego bezpośrednio przyległym do części globularnej cząsteczki [11]. Stosując dichroizm kołowy do badania przebiegu renaturacji i denaturacji części globularnej w histonie H1 z *Physarum* zawierającym i niezawierającym interfazowych fosforanów we wspomnianym rejonie stwierdziliśmy, że obecność grup fosforanowych wywiera bardzo silny wpływ na formowanie się struktury 2-go rzędowej w części globularnej. Grupy fosforanowe muszą więc być umieszczone w bardzo „strategicznym” położeniu w stosunku do części globularnej. Badanie tworzenia się struktury 3-cio rzędowej w całej cząsteczce wykazało, że rejon zawierający fosforany interfazowe, w odróżnieniu od pozostałej części fragmentu C-końcowego, jest częściowo uporządkowany (choć wyraźnie słabiej niż część globularna) [11]. Być może, właśnie to uporządkowanie powoduje, że reszty fosforanowe znajdują się bliżej części hydrofobowej cząsteczki. Jaka może być funkcja takiego rozmieszczenia grup fosforanowych? Częściowej odpowiedzi na to pytanie udzieliły doświadczenia, w których badano zdolności do fałdowania części globularnej H1 w zależności od stężenia soli. Badania te pokazały, że sekwencja aminokwasowa części globularnej w H1 z *Physarum* jest zdecydowanie mniej „dopracowana” ewolucyjnie niż analogiczna sekwencja w H1 ssaków. Objawia się to przede wszystkim różnicą w zdolności do tworzenia stabilnej struktury trzeciorzędowej. Do utworzenia jej w przypadku H1 z grasicy cielęcej potrzeba tylko ok. 0,5 M NaCl, podczas gdy w przypadku H1 z *Physarum* – aż 1,2 M NaCl. Jednak – i tu tkwi być może odpowiedź na pytanie o znaczenie nieodwracalnej modyfikacji przez fosforylację – obecność fosforanów interfazowych w C-końcowym „rejonie strukturalizującym” obniża wymagane do fałdowania stężenie NaCl do ok. 0,9 M, a więc aż o 0,3 M. Wydaje się więc, że H1 z *Physarum* dzięki nieodwracalnej fosforylacji nadrabia jakby braki w układzie aminokwasów i staje się bardziej zbliżony do H1 z organizmów wyższych. W zróżnicowaniu stopnia nieodwracalnej fosforylacji interfazowej (co ma miejsce u *Physarum*) tkwią jednocześnie znaczne możliwości regulacji stabilności obszaru globularnego H1.

Zwiększona zdolność H1 do fałdowania części globularnej spowodowana fosforylacją mogłaby wywoływać zmianę stopnia skondensowania chromatyny. Aby sprawdzić tę możliwość zbadalibyśmy jakie efekty w chromatynie z erytrocytów kurczenia spowoduje wymiana rodzimych histonów z grupy H1 na ufosforylowany lub nieufosforylowany H1 z *Physarum*. Usuwanie H1 nie jest operacją nie pozostawiającą śladu w natywnej strukturze chromatyny. Stąd pełna chromatyna rekonstruowana z chromatyny pozbawionej uprzednio H1 nie odpowiada w 100% układowi natywnemu. Tym niemniej, jeśli zmiany konformacyjne w ufosforylowanym H1 pociągałyby za sobą znaczne efekty kondensacyjne powinno to być

łatwo zauważalne. Wyniki naszych doświadczeń pokazały jednak, że ufosforylowany HI z *Physarum* kondensuje chromatynę nie mocniej, a wyraźnie słabiej niż HI nieufosforylowany [12].

Naszym zdaniem dane te świadczą, że fosforylacja HI w interfazie, bez względu na to czy wpływa wyłącznie na osłabienie wiązania N- i C-końcowych fragmentów do DNA, czy też prowadzi do stabilizacji części globularnej białka, służy przede wszystkim relaksacji DNA, czyli zmniejszenia stopnia jego upakowania.

Analiza dostępnych danych [13] oraz ostatnie wyniki badań fizykochemicznych nad chromatyną rekonstruowaną z HI o wysokim (mitotycznym) stopniu fosforylacji [10] pokazują, że również superfosforylacja podczas mitozy nie jest czynnikiem sprzyjającym kondensacji, a przeciwnie prowadzi raczej do rozluźnienia struktury chromatyny.

Jaki jednak sens dla komórki miałyby rozluźnienie struktury chromatyny w fazie (mitoza), w której chromosomy osiągają najbardziej zwartą postać? Rezultaty uzyskane przez nas w badaniach mitotycznych superfosforylacji u *Physarum* uzasadniają dwa ważne wnioski: po pierwsze mitotyczna superfosforylacja HI musi być zjawiskiem o bardzo podstawowym, archetypowym znaczeniu u eukariontów, skoro zachodzi zarówno u ssaków jak i w tak odległym od nich ewolucyjnie organizmie, jak należący do śluzowców *Physarum*, po drugie równie ważne jak wprowadzenie fosforanów do HI w mitozie musi być dla komórki ich późniejsze usunięcie. Przymuszczenie determinują one jakiś jednorazowy stan komórki, dozwolony tylko w ustalonej fazie cyklu podziałowego.

Szczególne znaczenie dla interpretacji zjawiska mitotycznej superfosforylacji HI mają ostatnie prace Wu i wsp. pokazujące, że w międzygatunkowych hybrydach komórkowych wymiana HI między chromosomami na miejsce tylko podczas mitozy, HI jest natomiast na stałe związany z własnymi chromosomami w interfazie [14]. Mogłoby to wskazywać, że superfosforylacja umożliwia, pomimo maksymalnego skondensowania chromosomów, aktywną wymianę HI. Superfosforylacja poprzedza także wymianę wariantów HI zachodzącą w czasie dojrzewania męskiego pronukleusa u jeżowca [15].

Biorąc te wszystkie fakty pod uwagę wydaje się, że superfosforylacja HI w mitozie może służyć umożliwieniu jego wymiany na dowolne białko (o porównywalnym powinowactwie do DNA), w dowolnym rejonie DNA. Jak pokazali Schlisel i Brown [2] dodanie HI skutecznie blokuje transkrypcję chromatyny, z której przedtem sztucznie HI usunięto, nawet jeśli do układu takiego dodaje się następnie egzogenne czynniki transkrypcyjne. Jeżeli jednak chromatyna bez HI inkubowana była z czynnikami transkrypcyjnymi zanim dodano egzogenne HI ten ostatni nie był już w stanie zahamować transkrypcji. Ma tu więc miejsce bezpośrednia konkurencja o miejsce wiązania (nie musi to być to samo miejsce) według zasady pierwszeństwa. Na podobnej zasadzie znaczne osłabienie siły wiązania HI z DNA na skutek superfosforylacji mitotycznej, może umożliwiać dołączenie w tym czasie czynników warunkujących zajście replikacji DNA w najbliższej fazie S. Wyluczając z rozważań mitotyczną kondensację chromosomów replikacja DNA jest jedynym procesem, który mógłby przekonywująco uzasadnić

uniwersalność i absolutną niezbędność mitotycznej superfosforylacji H1 wśród eukariontów. Osiągniętego stanu aktywacji replikacyjnej DNA nie mogłaby już zmienić defosforylacja H1, która u ssaków ma miejsce w fazie G1. Warto zauważyć, że u *Physarum* faza G1 w ogóle nie występuje, a synteza DNA zaczyna się bezpośrednio po metafazie, gdy H1 jest jeszcze w pełni ufosforylowany.

Podsumowując omówione wyżej fakty wydaje się, że najsilniejszym represorem w stosunku do transkrypcji i replikacji DNA chromatyny jest niezmodyfikowany H1. Fosforylacje stanowią czynnik przejściowo (lub stale, jak w przypadku interfazowej fosforylacji u *Physarum*) osłabiający tę represję: miejscowo i selektywnie w czasie interfazy, całkowicie i niespecyficycznie w czasie mitozy. Superfosforylacja mitotyczna H1 miałaby szczególne znaczenie, jako mechanizm powodujący przejściowe odblokowanie dla oddziaływań z czynnikami regulatorowymi 10% komórkowego genomu. To ostatnie jest, teoretycznie rzecz biorąc, warunkiem sine qua non pomyślnej replikacji całego genomu. Tego rodzaju przypuszczenie tłumaczyłoby znany od dawna fakt, że do osiągnięcia potencjalnej zdolności do replikacji DNA komórka eukariotyczna musi bezwzględnie przejść przez fazę mitozy.

Artykuł otrzymano 15 sierpnia 1988 r.
Zaakceptowano do druku 5 stycznia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

- Weintraub H., (1984), *Cell*, **38**, 17–27.
- Schlissel M. S., Brown D. D., (1984). *Cell*, **38**, 903–913.
- Cole R. D., (1987), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **30**, 433–449.
- Hohmann P., (1983), *Molec. Cell. Biochem.*, **57**, 81–92
- Gurley L. R., D'Anna J. A., Barham S. S., Deaven L. L., Tobey R. A., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 1–15.
- Billings P. C., Orf J. W., Palmer D. K., Talmaga D. A., Pan C. G., Blumenfeld M. (1979) *Nucl. Acid Res.*, **6**, 2151–2164.
- Glover C. V. C., Vavra K. J., Guttman S. D., Gorovsky M. A., (1981) *Cell*, **23**, 73–77.
- Jerzmanowski A., Maleszewski M. (1985), *Biochemistry*, **24**, 2360–2367.
- D'Anna J. A., Strniste G. F., Gurley L. R., (1979) *Biochemistry*, **18**, 943–951.
- Kaplan L. J., Bauer R., Morrison E., Langan T. A., Fasman G. D., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 8777–8785.
- Jerzmanowski A., Moraczewska J., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **910**, 111–115.
- Jerzmanowski A., Staroń K., (1981), *J. Theor. Biol.*, **89**, 191–194.
- Wu L. H., LeRoy K., Rechsteiner M., (1986) *J. Cell. Biol.*, **103**, 465–474.
- Green G. R., Poccia D. L., (1984), *Develop. Biol.*, **108**, 235–245.

*W siedemdziesięciolecie Instytutu
Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
artykuł ten dedykujemy pamięci
profesor Gabrieli M. Drabikowskiej,
wybitnemu badaczowi struktury
i funkcji błon biologicznych mięśni*

KONRAD S. FAMULSKI*, ANNA B. WOJTCZAK**

Wpływ tyroksyny na zależną od cAMP fosforylację białek i transport jonów wapnia w sarkolemie serca i mięśni szkieletowych

**Thyroxine influences the cAMP-dependent protein phosphorylation and the ion
transport in heart and skeletal muscle sarcolemma**

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wpływ tyroksyny na funkcje receptora beta-adrenergicznego i fosforylację białek zależną od cAMP
- III. Wpływ tyroksyny na aktywność pompy wapniowej zależnej od kalmoduliny
- IV. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Effect of thyroxine on beta-receptor functions and cAMP-dependent protein phosphorylation
- III. Effect of thyroxine on the activity of the calmodulin-dependent calcium pump
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Ca-ATPaza – pompa wapniowa zależna (lub niezależna) od kalmoduliny, CaM – kalmodulina, DHA – dihydroalprenolol, SI – sarkolema, SR – sarkoplazmatyczne retikulum.

1. Wstęp

Hormony tarczycy regulują wzrost, rozwój i różnicowanie właściwie wszystkich komórek ssaków, ale przede wszystkim podwyższają mechaniczną aktywność serca i mięśni szkieletowych [1]. Wpływają też na metabolizm białek [2, 3] i zwiększają wrażliwość tkanek na inne hormony [4]. W przypadku hypertyreodemii stwierdza się podniesienie częstości skurczu jak i zwiększenie objętości krwi wyrzucanej

* Dr, ** prof. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa 02-093, Pasteura 3

przez serce [5]. Pewne obserwacje sugerują, że zmiany te mogą być spowodowane pośrednio przez zmienioną wrażliwość mięśnia sercowego na katecholoaminy [4], spowodowaną modyfikacją receptorów β -adrenergicznych. Nie bez znaczenia jest obserwacja, że propranolol – związek blokujący β -receptory był z powodzeniem stosowany w leczeniu pewnych przejawów tyreotoksykozy n.p. tachykardii [6].

Z kolei inne doniesienia wskazują na wywołane hipertyreozą zmiany w funkcji sarkoplazmatycznego retikulum (SR). Organellum to odpowiedzialne jest za cykl gromadzenia i uwalniania wewnątrzkomórkowego wapnia i w ten sposób reguluje proces skurczowo-rozkruczowy mięśni. Tyroksyna *in vivo* powoduje aktywację pomp wapniowych w SR serca [7, 8] i mięśni szkieletowych [9, 10].

Do tej pory niewiele było prac dotyczących wpływu tyroksyny na funkcje błon zewnętrznych komórek kurczliwych (sarkolemy). Błony te zawierają trzy unikalne układy, których nie ma w strukturach SR. Są to:

- i receptory B-adrenergiczne
- ii endogenna kinaza białkowa zależna od cAMP (kinaza A)
- iii pompa wapniowa zależna od kalmoduliny (Ca-ATPaza zależna od CaM).

Układy te nie tylko stanowią o odrębności sarkolemy (SI), ale i o specjalnej funkcji pełnionej przez tę strukturę jaką jest przenoszenie informacji z „makroświata” do wnętrza komórki i utrzymywanie homeostazy jonowej. Jako przykład może tu posłużyć ścisły związek pomiędzy poziomem hormonów tarczycy we krwi a aktywnością pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ ATPazy) [11, 13], enzymu odpowiedzialnego za utrzymanie równowagi sodowo-potasowej, a więc za repolaryzację komórki po skurczu [4].

II. Wpływ tyroksyny na funkcje receptora β -adrenergicznego i fosforylację białek zależną od cAMP

Najczęściej spotykanym sposobem badania wpływu tyroksyny na funkcje błon biologicznych jest wywołanie u zwierząt doświadczalnej hipertyreozy przez podskórne podawanie L-tyroksyny. Z tak przygotowanych zwierząt pobiera się serca lub tzw. szybkie mięśnie szkieletowe, które służą za materiał potrzebny do otrzymywania preparatów sarkolemy. W tabeli 1 przedstawiono poziom tyroksyny i jej aktywnego biologicznie metabolitu trójjodotyroniny po siedmiu dniach podawania hormonu. Pomiarzy przeprowadzono przy zastosowaniu techniki radioimmunologicznej.

Tabela 1

Poziom tyroksyny i trójjodotyroniny we krwi królików. Opracowano na podstawie [14]

Stan hormonalny zwierząt	Tyroksyna ng/100 ml	Trójjodotyronina $\mu\text{g}/100$ ml
Eutyreoz	6,2	68
Hypertyreoz	70	340

Mierząc wiązanie pochodnej propranolu – [³H]-dihydroalprenolol (DHA) ocenia się ilość receptorów β-adrenergicznych w preparatach SI [13]. Wykorzystując tę możliwość określono wpływ hipertyreozы na w.m. receptor. Dane te przedstawiono w tabeli 2. W preparatach SI z serca obserwuje się w stanie hipertyreozы znaczący wzrost ilości receptorów β-adrenergicznych. Jednocześnie w tym stanie wzrasta poziom cAMP w komórkach [15] i obserwuje się wewnątrzkomórkowe efekty jego działania. Przykładem może tu być β-adrenergiczna aktywacja fosforylasy glikogenu [16] w stanie hipertyreozы (3). Skoro hormony tarczycy powodują zwiększoną odpowiedź serca na katecholoaminy należy się spodziewać zmian jakościowych i ilościowych w ufosforylowaniu białek błony SI.

Tabela 2

Wiązanie DHA przez sarkolemę z serca królika. Opracowano na podstawie (14).

Stan hormonalny zwierząt	Wiązanie całkowite pmoles DHA/mg białka	Stała wiązania nM
Eutyreoza	2,6	3,2
Hypertyreoza	3,9	3,1

Tabela 3

Aktywności kinaz białkowych ekstrahowanych z sarkolemy komórek serca i mięśni szkieletowych. Substratem dla kinaz była protamina. Aktywność kinaz w obecności cAMP podano po odjęciu wartości uzyskanych dla fosforylacji niezależnej od cAMP. Opracowano na podstawie [14, 18]

Stan hormonalny zwierząt	Aktywność kinaz białkowych nmole ³² P/mg białka/10 min.	
	- cAMP	+ cAMP
SI z serca		
Eutyreoza	7,5 ± 0,6	18,2 ± 1,5
Hypertyreoza	8,2 ± 0,8	9,3 ± 0,4
SI z mięśni szkieletowych		
Eutyreoza	6,6 ± 0,5	14,4 ± 0,4
Hypertyreoza	16,9 ± 0,9	9,4 ± 0,4

Kinazy białkowe mogą występować w cytosolu komórkowym jak i wiązać się do błon SI. Stosując łagodną ekstrakcję Tritonem X-100, enzymy te można oddzielić od błon i mierzyć ich aktywności wobec egzogenego substratu – protaminy (18). Wyniki takiego doświadczenia przedstawia tabela 3.

Aktywność kinaz(y) zależnych od cAMP jest znacznie niższa w preparatach SI otrzymanych ze zwierząt będących w stanie hipertyreozы. Na podstawie tego wyniku można sugerować, że tyroksyna rzeczywiście wpływa na procesy komór-

kowe regulowane przez cAMP. Jak już wiadomo hipertyreozą powoduje podwyższenie poziomu cAMP w komórkach. Ten zaś z kolei powodować będzie wzmożoną dysocjację holoenzymu kinazy. Tak więc zahamowanie aktywności kinazy A w hipertyreozie może być pozorne, albowiem najprawdopodobniej spowodowane jest uwolnieniem podjednostki katalitycznej kinazy z błony do cytosolu [17]. Natomiast aktywność kinaz niezależnych od cAMP wzrasta w stanie hipertyreozy. Szczególnie wyraźnie widać to w preparatach SI otrzymywanych z mięśni szkieletowych. W chwili obecnej nie jesteśmy w stanie wykazać czy jest to wynikiem zwiększenia się ilości kinazy w błonie, czy jej aktywacji. Do rozwiązania tego zadania niezbędne są bezpośrednie badania wykorzystujące techniki immunologiczne i fotoznakowanie.

Pewne dane dotyczące wpływu tyroksyny na fosforylację białek można uzyskać badając stopień włączenia reszty fosforanowej gamma z cząsteczki ATP do białek SI.

Analiza autoradiogramów preparatów fosforylowanych *in vitro* niesie za sobą pewne niebezpieczeństwo. Ilość wolnych reszt serynowych lub treoninowych w peptydach uwarunkowana jest wypadkową aktywności kinaz i fosfataz *in situ* [19]. Bardzo pomocna jest w takich przypadkach tzw. technika powtórnej fosforylacji (back phosphorylation). Pokróćce, zasada metody polega na porównaniu wydajności ufosforylowania danego preparatu nie traktowanego i traktowanego uprzednio fosfatazą białkową. Różnica w ilości włączonego fosforanu świadczy o tym w jakim stopniu dane białko było ufosforylowane *in situ*.

Tabela 4

Wpływ tyroksyny na zależną od cAMP fosforylację peptydów SI z serca. Opracowano na podstawie [14]. Fosforylację białek błon nie traktowanych fosfatazą przyjęto za 100%

Stan hormonalny zwierząt	Peptyd	Wzrost włączenia fosforanu %
Eutyreoza	55	169%
	45	256%
	25	205%
Hypertyreoza	55	341%
	45	268%
	25	207%

Preparaty SI komórek serca zawierają szereg peptydów podlegających fosforylacji przez kinazę A. Najwydajniej fosforylowane są peptydy o względnej masie cząsteczkowej 55 kDa, 45 kDa i 25 kDa [20]. Wpływ tyroksyny na fosforylację tych peptydów przedstawiono w tabeli 4. Z danych przedstawionych w tej tabeli wynika, iż peptyd 55 kDa jest głównym obiektem fosforylacji w SI podczas hipertyreozy.

Obraz endogennej fosforylacji peptydów SI komórek mięśni szkieletowych jest bardziej złożony [21]. Hypertyreoza powoduje obniżenie fosforylacji peptydów 30 kDa i 47 kDa. Natomiast bardzo wyraźnie podwyższa się fosforylacja niezależna od cAMP peptydów 60 kDa i 7 kDa [18].

III. Wpływ tyroksyny na aktywność pompy wapniowej zależnej od kalmoduliny

Jednym z dobrze poznanych enzymów w SI, którego aktywność reguluje kinaza A, jest Ca-ATPaza zależna od kalmoduliny [18, 22, 23]. Kinaza aktywuje tę ATPazę nawet w obecności kalmoduliny, a więc wpływ obu czynników regulujących aktywność ATPazy sumuje się. Jak wykazują dane zamieszczone w tabeli 5 hypertyreoza także powoduje zwiększenie aktywności ATPazy.

Tabela 5

Wpływ tyroksyny na aktywność Ca-ATPazy w SI komórek serca i mięśni szkieletowych. Opracowano na podstawie [18 i 24].

Stan hormonalny zwierząt	Aktywność μmole P/mg białka/godz.	
	serce	mięśnie szkieletowe
Eutyreoza	3,78	6,9
Hypertyreoza	8,46	12,4

Tabela 6

Wpływ defosforylacji i refosforylacji białek SI na aktywność Ca-ATPazy zależnej od CaM. Opracowano na podstawie [18]

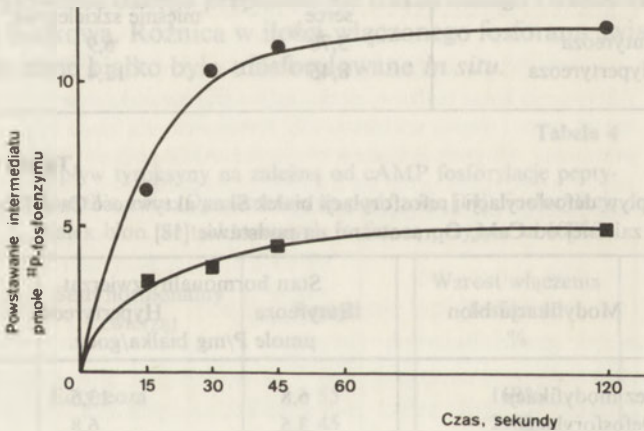
Modyfikacja błon	Stan hormonalny zwierząt	
	Eutyreoza	Hypertyreoza
	μmole P/mg białka/godz.	
Bez modyfikacji	6,8	13,5
Defosforylacja	3,5	6,8
Refosforylacja	6,8	13,5

Powstaje pytanie w jaki sposób podanie tyroksyny powoduje „ekstra” aktywację enzymu, skoro aktywność ATPazy jest u zwierząt kontrolnych stymulowana przez CaM i kinazę A? Bezpośredni wpływ hormonu na aktywność ATPazy został wykluczony [18]. Preparaty SI izolowane z mięśni zwierząt kontrolnych i z hypertyreozą nie różniły się wrażliwością na CaM. Pozostaje pytanie czy aktywacja ATPazy może być wynikiem zmian aktywności kinaz białkowych wywołanych stanem hypertyreozy.

Ca-ATPaza obecna w preparatach SI jest zwykle w formie pełni aktywnej i aby zademonstrować jej stymulację przez kinazę A należy błonę uprzednio poddać

defosforylacji [18, 22]. Proces ten (patrz tabela 6) powoduje znaczne obniżenie aktywności enzymu niezależnie od tego, czy badano preparat SI otrzymany ze zwierząt kontrolnych czy też otrzymujących hormon. Pomimo to różnice w aktywności ATPazy pozostają. Fosforylacja endogenna błon prowadzona w obecności cAMP przywraca wyjściowe wartości aktywności ATPazy lecz w dalszym ciągu pozostaje różnica wywołana hipertyreozą. Tak więc tyroksyna nie wpływa na aktywację ATPazy przez kinazę A.

Inną możliwością jest zwiększenie przez tyroksynę liczby aktywnych cząsteczek ATPazy w błonie SI. Ca-ATPaza zależna od CaM tworzy w obecności ATP i Ca przejściową formę wysokoenergetyczną zwaną ufosforylowanym intermedyatem. Różni się on od typowych estrów fosfoserynowych tworzonych przez kinazy i stanowi prawdopodobnie bezwodnik kwasowy utworzony z gamma grupy fosforanowej ATP i grupy karboksylowej reszty kwasu asparaginowego [25]. Śledząc tworzenie intermediatu w warunkach zapewniających maksymalną wydajność tego procesu [26] można wyznaczyć ilość aktywnych cząsteczek enzymu. Rycina 1 przedstawia szybkość tworzenia intermediatu i jego maksymalną ilość w błonach SI. Wynika zeń, że preparat SI otrzymany z mięśni zwierząt będących w stanie hipertyreozy zawiera więcej cząsteczek ATPazy zdolnych do tworzenia ufosforylowanego intermediatu [27].



Ryc. 1. Kinetyka tworzenia ufosforylowanego intermediatu Ca-ATPazy zależnej od CaM w preparatach SI komórek mięśni szkieletowych izolowanych ze zwierząt kontrolnych (■) i będących w stanie hipertyreozy (●). Opracowano na podstawie [18, 27].

IV. Uwagi końcowe

Związek pomiędzy poziomem hormonów tarczycy a wybranymi funkcjami błon komórek serca i mięśni szkieletowych zaznacza się wyraźnie w warunkach doświadczalnej hipertyreozy. Znamienne obserwacją jest, iż tyroksyna może pośrednio wpływać na procesy regulowane przez cAMP i Ca^{2+} , a więc dwa

najważniejsze pośredniki wewnątrzkomórkowe. Przyczyną zwiększonej wrażliwości komórek na katecholaminy jest podwyższenie ilości β -adrenergicznych receptorów. Spowodowany przez to zwiększony poziom cAMP nieuchronnie prowadzi do wzmoczonej fosforylacji między innymi białek błonowych. Szczególnie widoczne jest to na przykładzie peptydu 55 kDa w SI komórek serca. Peptyd ten może być identyfikowany jako podjednostka regulatorowa kinazy A typu II, która ulega auto- lub egzofosforylacji [28, 29]. Z kolei fosforylacja tej podjednostki ułatwia dysocjację podjednostki katalitycznej w obecności cAMP [17, 30]. Zwiększenie ilości podjednostek katalitycznych w cytosolu może prowadzić do zwiększonej fosforylacji różnych białek.

Ufosforylowany peptyd 55 kDa może być także produktem proteolitycznej degradacji cząsteczki kanału wapniowego. Masa cząsteczkowa nienaruszonego kanału wynosi 170 kDa, a peptyd powstający wskutek działania wewnątrzkomórkowych proteaz faktycznie zawiera miejsce fosforylacji przez kinazę A [31]. Należy podkreślić, że fosforylacja cząsteczek białkowych stanowiących kanały wapniowe [32] i kanały potasowe zależne od jonów wapnia [20] katalizowana jest przez enzym niezwiązany z błoną (lub zdysocjowaną podjednostkę katalityczną enzymu). Prowadzi to do zwiększonego napływu jonów wapnia do komórki i wpływu jonów potasu, a więc jej depolaryzacji. Natomiast fosforylacja Ca-ATPazy zależnej od CaM katalizowana jest przez kinazę A związaną z błoną i nie podlega modulacji przez tyroksynę [18, 21, 22]. Natomiast aktywacja pompy jest niewątpliwie związana z wywołanym przez tyroksynę wzrostem ilości aktywnych cząsteczek ATPazy w błonach SI. Wydajniejsza, na skutek tego wypompowywania jonów wapnia z komórki może mieć duże znaczenie dla skrócenia czasu relaksacji mięśni, a więc dla przyspieszenia tempa skurczu. Podobną zależność pomiędzy poziomem hormonów tarczycy, aktywności Na^+/K^+ ATPazy i częstością skurczu wykazano jednoznacznie badając mięsień sercowy [1].

Praca została wykonana w ramach problemu badawczego C.P.B.P. 0. 4.01

*Artykuł otrzymano 15 sierpnia 1988 r.
Zaakceptowano do druku 3 stycznia 1989 r.*

PIŚMIENNICTWO

1. Nauman J., (1983), w „Cardiac Metabolism”, Drake-Holland A. J. i Noble M. J. M. red., John Wiley & Sons Ltd., 505–525.
2. Parmacek M. S., Magid N. M., Lesch M., Decker R. S., Samarel A. M., (1986), *Am. J. Physiol.*, **251** (*Cell Physiol.*, **20**), C727–C736.
3. Zeman R. J., Brenstein P. L., Ludemann R., Etlinger J. D., (1986), *Biochem. J.*, **240**, 296–272.
4. Williams R. S., Lefkowitz R. J., (1983) w „Molecular Basis of Thyroid Hormone Action”, Oppenheimer J. H. i Samuels H. H. red., Academic Press, New York, London, 325–351.
5. Wilkin T. J., (1981), *British Med. J.*, **286**, 1459–1460.
6. Starling K., Hottenburg R., (1971), *Sem. Nucl. Med.*, **1**, 422–431.

7. Ash A.D.F., Besh H.R. J.r., Harigaya S., Zaimis E., (1972), *J. Physiol.*, **244**, 1–19.
8. Suko J., (1972), *J. Physiol.*, **228**, 563–582.
9. Nunes M.T., Bianco A.C., Migala A., Agostini B., Hasseblach W., (1985), *Z. Naturforsch.*, **40c**, 726–734.
10. Simonides W.S., Hardeveld C., (1986), *Cell Calcium*, **7**, 147–160.
11. Kjeldsen K., Nørgaard A., Gotzsche C.O., Thomassen A., i Clausen T., (1984), *Lancet*, **8389**, 8–10.
12. Kjeldsen K., Nørgaard A., Clausen T., (1984), *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **402**, 100–108.
13. Baker S.P. i Potter L.T., (1980), *Membrane Biochem.*, **3**, 185–207
14. Famulski K.S., Szymańska G., Szymański P., Sarzała M.G., (1987); *Biomed. Biochem. Acta*, **46**, S448–S451.
15. Tsai J.S., Chen A., (1978), *Nature*, **275**, 138–140.
16. Kuźnicki J., Famulski K.S., (1986), *Post. Biochem.*, **32**, 285–299.
17. Buxton I.L., Brunton L.L., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 10233–10239.
18. Famulski K.S., Pilarska M., Wrzosek A., Sarzała M.G., (1988), *Eur. J. Biochem.*, **171**, 363–368.
19. Ingebritsen T.S., Cohen P., (1983), *Science (Wash. DC)*, **211**, 311–338.
20. Wen Y., Famulski K.S., Carafoli E., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 237–243.
21. Michalak M., Famulski K.S., Carafoli E., (1984), **259**, 15540–15547.
22. Caroni P., Carafoli E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9371–9373.
23. Neyses L., Reinlib L., Carafoli E., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10283–10287.
24. Szymańska G., (1987), Praca Doktorska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa.
25. James P., Zvarith E.I., Shakhparonov M.I., Penniston J.P., Carafoli E., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 7–12.
26. Luterbacher S., Schatzman H.J., (1983), *Experientia*, **39**, 311–312.
27. Famulski K.S., Wrzosek A., (1988), w „Ion Pumps. Fuction Structure Regulation”, Stein w.d. red., Alan Liss Inc., New York, w druku.
28. Rangel-Aldao R., Rosen O.M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7526–7533.
29. Church J.G., Derdemezi J.B., Yuan S., Sen A.K., (1986), *Biochem. J.*, **238**, 341–344.
30. Rangel-Aldao R., Rosen O.M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3375–3381.
31. Vandaele S., Fosset M., Galizzi J.-P., Lazdunski M., (1987), *Biochemistry*, **26**, 5–9.
32. Reuter H., (1983), *Nature*, **301**, 569–574.

JOANNA GEMEL*

Kinazy białkowe a aktywność fotosyntetyczna chloroplastów

Protein kinases and photosynthetic activity of chloroplasts

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Substraty kinaz białkowych w chloroplastach nie wykazujące właściwości enzymatycznych
- III. Kinazy fosforylujące dublet białkowy LHCP oraz białko o masie cząsteczkowej 9 000
- IV. Regulacja rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami przez fosforylację białek błon tylakoidów
- V. Białka enzymatyczne fosforylowane w chloroplastach
 - V-1. Karboksylaza/oksygenaza RuBP
 - V-2. Fosfotransferaza ATP: pirogronian, P_i
 - V-3. Karboksylaza PEP
- VI. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Nonenzymatic substrates of chloroplast protein kinases
- III. Protein kinases phosphorylating LHCP dublet and protein of molecular weight 9 000
- IV. Regulation of excitation energy distribution between photosystems in terms of thylakoid membrane proteins phosphorylation
- V. Enzymatic proteins phosphorylated in chloroplasts
 - V-1. Carboxylase/oxygenase RuBP
 - V-2. Phosphotransferase ATP: pyruvate, P_i
 - V-3. PEP carboxylase
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: LHC – kompleks chlorofil a/b – białko, zbierający energię, LHCP – część białkowa kompleksu LHC, RuBP – rybulozo-1,5-bisfosforan, ATP – adenozyntrifosforan, ADP – adenozyndifosforan, P_i – fosforan nieorganiczny, PS I(II) – I(II) układ fotosyntezy, DCMU – 3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimetylomocznik, DBMIB – 2,5-dibromo-3-metylo-6-izopropyl-p-benzochinon, PEP – fosfoenolpirogronian, NADP⁺ – utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego.

* Dr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

I. Wprowadzenie

Badania nad fosforylacją białek chloroplastowych datują się dopiero od 1977 r. [1]. Jednakże postęp prac w tej dziedzinie jest bardzo szybki. Artykuł przeglądowy na ten temat, który ukazał się w 1987 r. w *Postęпах Biochemii* [2] można już dzisiaj uzupełnić o szereg interesujących faktów tak, że mogą one stać się przedmiotem nowego opracowania.

II. Substraty kinaz białkowych w chloroplastach nie wykazujące właściwości enzymatycznych

W otoczkach chloroplastów fosforylacji ulega około 10 różnych białek. Większość z nich znajduje się w zewnętrznej błonie otaczającej organelum [3, 4].

Fosforylacja białek występujących w błonach tylakoidów tj. białek wchodzących w skład LHC (kompleks chlorofil a/b – białko, zbierający energię) o masach cząsteczkowych 23 000 i 25 000, nazwanych przez Bennetta dubletem białkowym [5] oraz białka o masie 9 000, została ostatnio dobrze scharakteryzowana. Szczególnie dużo uwagi poświęcono białku o masie 9 000, ze względu na rozbieżne poglądy odnośnie jego roli biologicznej. Początkowo utożsamiano je z cytochromami: b_{563} [5, 6] lub b_{559} [7] albo z proteolipidem wrażliwym na DCCD (N,N'-dicykloheksylokarbodiimid) [8], wchodzącym w skład syntetazy ATP. Jednak z porównania N-końcowych sekwencji aminokwasowych tych białek [9 – 11] wynika, że fosforylowane białko nie może być utożsamiane z żadnym z nich. Badania z zastosowaniem detergentów Tritonu X-100 i β -oktyloglukozydu sugerują, że jest ono peryferyjnym składnikiem kompleksu rozszczepiającego wodę [9, 12].

Ostatnio opisano też zależną od światła fosforylację kompleksu rdzeniowego PS II: białka o masie cząsteczkowej 43 000 i dwóch białek o masach 32 000, określanych jako D1 [12, 13] i D2 [12]. Ich fosforylacja może regulować strukturę i/lub funkcję PS II [12 – 14].

Pierwszym i na razie jedynym opisanym przykładem białka stromy fosforylowanego przez kinazę białkową związaną z błonami tylakoidów, jest białko o masie 12 000. Szczegółowe badania wykazały, że jest ono rozpuszczalnym białkiem jedynie w formie ufosforylowanej, zaś nieufosforylowane wiąże się z błonami. Jego fosforylację hamuje DCMU (patrz punkt III). Rola biologiczna tego białka jest nieznana [16].

Ponadto w stromie chloroplastów fosforylacji ulega kilka białek rybosomowych [14a, 15] oraz enzymatycznych [15].

III. Kinazy fosforylujące dublet białkowy LHCP oraz białko o masie cząsteczkowej 9 000

Przez pewien czas przedmiotem dyskusji było, czy dublet LHCP i białko o masie cząsteczkowej 9 000 fosforyluje ta sama kinaza białkowa [17, 18] czy dwie

odrębne [19]. Fosforylacja obu substratów wykazuje szereg cech wspólnych. Zarówno w LHCP, jak i w białku o masie 9 000 fosforylacji ulega reszta(y) treoniny w pobliżu N-końca łańcucha polipeptydowego, skierowanego ku stromie [20 – 22]. Sekwencje aminokwasowe tych białek w pobliżu miejsca fosforylacji wykazują wysoki stopień homologiczności [20]. Ich fosforylacja jest możliwa jedynie w przypadku zredukowania plastochinonu, dzięki przeprowadzeniu reakcji na świetle lub w obecności związków umożliwiających jego redukcję [19]. Równocześnie jednak fosforylacja obu białek różni się szeregiem właściwości:

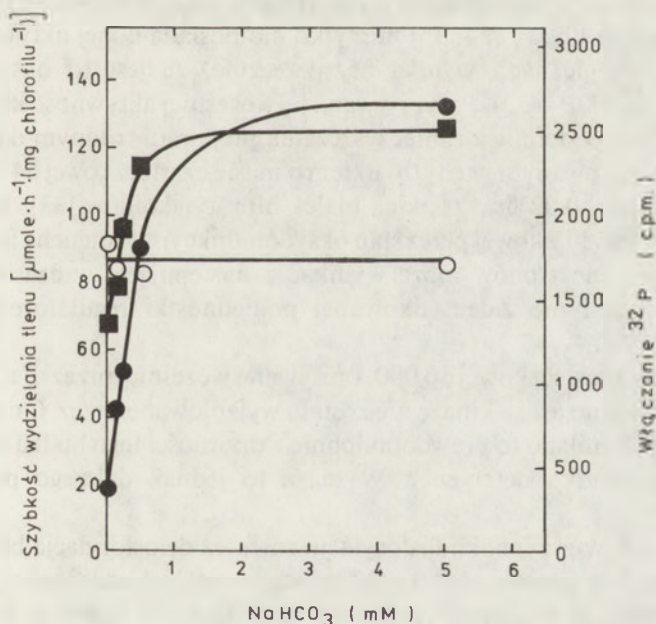
1. W obecności ATP związki oddziaływujące z grupami tiolowymi w mniejszym stopniu reagują z LHCP niż z białkiem o masie cząsteczkowej 9 000 [23].

2. Analog nukleotydów adeninowych 5'-fluorosulfonylobenzoadenozyna (FSBA) [24] hamuje fosforylację pierwszego z wymienionych białek w 95%, zaś drugiego tylko w 35% [25].

3. Jony Zn^{2+} silniej stymulują fosforylację LHCP niż białka o masie 9 000 [26, 27].

4. Fosforylacja obu białek różni się wrażliwością na inhibitory fotosyntetycznego transportu elektronów np. fosforylacja LHCP jest w przeciwieństwie do fosforylacji białka o masie 9 000 wrażliwa na DBMIB [14, 19] i bardziej wrażliwa na chlorek kobaltu [19].

5. Dwutlenek węgla ($NaHCO_3$) stymuluje jedynie fosforylację białka o masie 9 000 (19) (Ryc. 1). Fakty te wskazują bezspornie na istnienie dwu odrębnych kinaz białkowych, jednej fosforylującej LHCP, drugiej białko o masie 9 000.



Ryc. 1. Zróżnicowany wpływ $NaHCO_3$ na wydzielanie tlenu (●) oraz fosforylację białka o masie cząsteczkowej 9 000 (■) i LHCP (○) w nienaruszonych chloroplastach szpinaku. Wg Foyer [19], dzięki uprzejmości autorki i Biochemical Society Editorial Office.

Szczególnie interesującą cechą tej ostatniej jest jej wrażliwość na dwutlenek węgla. Jest on w fotosyntezie nie tylko substratem karboksylazy RuBP i karboksylazy PEP, lecz także jest niezbędny dla fotosyntetycznego transportu elektronów w PS II. Jego brak hamuje reakcję Hilla [28]. Stymulacji fosforylacji białka o masie cząsteczkowej 9 000 towarzyszy zwiększenie szybkości wydzielania tlenu przez chloroplasty. Wydaje się, że fosforylacja tego białka hamuje cykliczny transport elektronów w PS II [2], dzięki czemu następuje zwiększenie intensywności reakcji Hilla. W przeciwieństwie do roślin chłodoodpornych (np. jęczmień) fosforylacja LHCP w roślinach chłodowrażliwych (np. ryż.) jest hamowana przez obniżoną temperaturę [30]. Ostatnio rozstrzygnięto pomiędzy dwoma możliwymi wyjaśnieniami tego zjawiska: hamowaniem aktywności kinazy białkowej a ograniczeniem dostępności jej substratu w niskich temperaturach. Okazało się bowiem, że fosforylacja histonu* w przeciwieństwie do LHCP jest niezależna od temperatury w zakresie 5–25°C. Niedostępność miejsc fosforylacji może być wynikiem zmian konformacyjnych polipeptydów LHCP, zatem ograniczenia dostępności substratu w obniżonej temperaturze [31].

Couglan i Hind [32, 33] wyizolowali z błon tylakoidów szpinaku kinazę białkową o masie cząsteczkowej 64 000 fosforylującą LHCP. Jej niższa aktywność *in vitro* niż *in vivo* może być wynikiem niekorzystnych modyfikacji białka wywołanych działaniem detergentów stosowanych w czasie preparatyki [32]. Autorzy potwierdzili występowanie opisanego wcześniej [34, 35] białka o masie cząsteczkowej 25 000 oraz jego aktywność kinazy białkowej w reakcji z histonem [33]. Równocześnie udowodnili, że białko o masie cząsteczkowej 38 000, uważane poprzednio też za kinazę [34, 35] nie tylko nie posiada takiej aktywności, lecz z badań immunologicznych wynika bezspornie, że jest to oksydoreduktaza ferredoksyna: NADP⁺ [33]. Przypisywana jej wcześniej aktywność kinazy [34, 35] wynikała prawdopodobnie z zanieczyszczenia preparatu trudnym do wyizolowania, nie zidentyfikowanym wtedy, białkiem o masie cząsteczkowej 64 000. Stanowi ono bowiem tylko 0,02% wszystkich białek błon tylakoidów [33]. Brak kontroli aktywności kinazy białkowej przez stan oksydoredukcyjny łańcucha fotosyntetycznego transportu elektronów może wynikać z następującej w czasie izolowania enzymu dysocjacji nie zidentyfikowanej podjednostki regulatorowej wiążącej plastochinon [32].

Białko o masie cząsteczkowej 50 000, opisywane wcześniej przez Farchusa i wsp. [24], uważane też za kinazę nie zostało wyizolowane przez Couglana i Hinda [32]. Wynikało to prawdopodobnie z oporności tego białka na stosowane w drugim przypadku detergenty. Wymaga to jednak dalszego potwierdzenia [32].

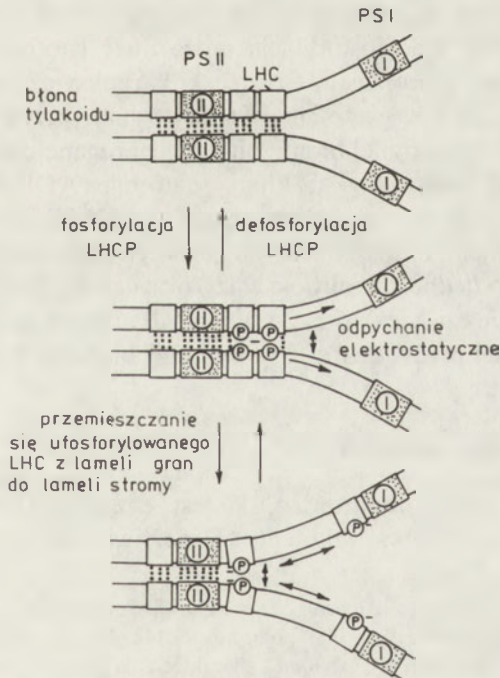
Podobnie jak w przypadku fosforylacji, również defosforylacja białek LHCP i białka o masie cząsteczkowej 9 000, wydaje się być zależna od odrębnych enzymów. Wskazują na to m.in. różnice w wymaganiach wobec kofaktorów. Dla defosforylacji LHCP wymagane jest około 200-krotnie większe stężenie Mg²⁺ niż

* Histony mogą być stosowane jako sztuczne substraty kinaz białkowych tylakoidów [26].

dla białka o masie 9 000. Nie można jednak wykluczyć, że defosforylację obu białek katalizuje jedna fosfataza, zaś obserwowane różnice wynikają z odrębności sposobu interakcji różnych substratów z jedną fosfatazą. Defosforylacja opisywanych białek przebiega niezależnie od światła, przy optimum pH około 9 [14].

IV. Regulacja rozdziatu energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami przez fosforylację białek

Zmieniające się warunki oświetlenia roślin są przyczyną nierównomierności wzbudzenia fotoukładów. Silne światło słoneczne jako bardziej krótkofalowe jest absorbowane głównie przez PS II, zaś słabe oświetlenie jest lepiej wykorzystywane przez PS I, absorbujący dłuższe fale [36, 37]. Przekazywanie energii wzbudzenia do ograniczającego fotoukładu ma istotne znaczenie dla poprawienia wydajności kwantowej fotosyntezy [37, 38]. Umożliwia to istnienie precyzyjnego mechanizmu regulującego, którego podstawą jest fosforylacja białek błon tylakoidów: LHCP oraz wg najnowszej hipotezy Allena i Holmesa [18], również fosforylacja białka o masie 9 000. Światło wzbudzające głównie PS II, tj. o długości fali poniżej 680 nm, sprzyja redukcji puli plastochinonu, aktywującego kinazy białkowe fosforylujące LHCP związane z lamelami gran oraz białko o masie cząsteczkowej



Ryc. 2. Schemat przedstawiający odwracalne przemieszczanie się LHCP z lameli gran do lameli stromy na skutek fosforylacji/defosforylacji białek dubletu. Wg Andersona [38a], dzięki uprzejmości Elsevier Science Publishers.

9 000 (Ryc. 2). Po fosforylacji część LHC tzw. ruchliwa pula, przemieszcza się do lameli stromy, natomiast białko o masie 9 000 pozostaje w lamelach gran. Elektrostatyczne odpychanie ufosforylowanych form tych białek sprzyja przemieszczaniu się LHC do lameli stromy, co zmniejsza możliwość przenoszenia energii pomiędzy centrami PS II na skutek ograniczenia sprzężenia pomiędzy nimi [39, 40]. W związku z tym zwiększa się ilość energii wzbudzenia przekazywanej do PS I w porównaniu z PS II. Natomiast wzbudzenie głównie PS I na skutek oświetlenia chloroplastów światłem bardziej długofalowym, o długości przekraczającej 680 nm jest przyczyną utlenienia plastochinonu, zatem defosforylacja LHCP i białka o masie 9 000. Ruchliwa pula LHC wraca do lameli gran, co zwiększa sprzężenie pomiędzy centrami PS II. Dzięki temu następuje zwiększenie ilości energii wzbudzenia przekazywanej do PS II w porównaniu z PS I [39, 40].

V. Białka enzymatyczne fosforylowane w chloroplastach

V-1. Karboksylaza/oksygenaza RuBP

Karboksylaza/oksygenaza RuBP należy do białek najsilniej fosforylowalnych w stromie chloroplastów [41]. Za reakcję tę jest odpowiedzialna kinaza białkowa niezależna od światła, prawdopodobnie rozpuszczalny enzym stromy. Ze względu na to, że tylko duża podjednostka enzymu* jest syntetyzowana w chloroplastach, zaś mała w cytoplazmie, tę ostatnią można też wykryć jako białko związane z otoczką organelum [4]. Jego fosforylacja może mieć istotne znaczenie dla jej transportu do wnętrza chloroplastu. Cząsteczki karboksylazy/oksygenazy RuBP związane z otoczką są bez wątpliwości fosforylowane przez kinazę białkową występującą także w zewnętrznej błonie otaczającej organelum [4].

Jony Mg^{2+} stymulują aktywność tej kinazy, natomiast ADP jest jej inhibitorem. W zakresie pH 7–8 jest ona niewrażliwa na zmiany pH [4]. Dla swej aktywności wymaga fosfolipidów, jak fosfatydyloseryna i fosfatydylocholina oraz jonów Ca^{2+} (44). Oprócz małej podjednostki karboksylazy/oksygenazy RuBP, fosforyluje ona też polipeptyd o masie cząsteczkowej 24 000 [4]. Być może jest ona identyczna z opisywanym wcześniej przez Lina i wsp. [34] białkiem wykazującym własności kinazy białkowej.

V-2. Fosfotransferaza ATP: pirogronian, P_i

Fosfotransferaza ATP: pirogronian, P_i jest enzymem roślin typu C_4^{**} i niektórych gruboszowatych (tzw. sukulenty). Umożliwia ona odtworzenie pierwot-

* Karboksylaza/oksygenaza RuBP ma masę cząsteczkową około 560 000 i składa się z 8 dużych (o masie 56 000) oraz 8 małych (o masie 16 000) podjednostek [42, 43].

** Rośliny typu C_4 (np. rodzina *Graminae*) charakteryzują się tym, że pierwszym trwałym produktem fotosyntezy jest w nich związek czterowęglowy – szczawiooctan. Natomiast w roślinach typu C_3 (większość roślin wyższych) analogiczną rolę pełni związek trójwęglowy – 3-fosfoglicerynian. W związku z tym pierwotnym akceptorem dwutlenku węgla w pierwszej grupie roślin jest fosfoenolo-pirogronian, zaś w drugiej rybulozo-1,5-bisfosforan [42].

V-3. Karboksylaza PEP

nego akceptora dwutlenku węgla, PEP. Enzym ulega aktywacji przez fosforylację. Modyfikacji tej ulega reszta histydyny w centrum aktywnym białka. Następnie fosforan jest przenoszony na pirogronian z utworzeniem produktu reakcji. Jednakże enzym z ufosforylowaną histydyną może zostać zdezaktywowany przez białko regulacyjne wykorzystujące w reakcji fosforylacji ADP [45, 46]. Fosforan z pozycji β -nukleotydu jest przenoszony na resztę treoniny enzymu. Ponowna aktywacja enzymu jest możliwa dzięki działaniu tego samego białka regulacyjnego, w obecności fosforanu. Światło jako czynnik sprzyjający powstawaniu ATP, kosztem obniżenia poziomu ADP sprzyja aktywacji enzymu, zaś ciemność dezaktywacji. Regulacja aktywności fosfotransferazy przez fosforylację/defosforylację ma szczególny charakter ze względu na to, że jest ona zależna tylko od jednego białka regulacyjnego. Wykorzystuje ono ADP jako donor reszt fosforanowych w procesie inaktywacji enzymu lub powoduje fosforylacyjne odszczepienie fosforanu od nieaktywnego enzymu, co umożliwia katalizowanie reakcji [45].

V-3. Karboksylaza PEP

Karboksylaza PEP, jest enzymem katalizującym wiązanie dwutlenku węgla w roślinach typu C_4 i gruboszowatych z wytworzeniem szczawiooctanu. Aktywność tego białka i jego wrażliwość na efekторы zależy od modyfikowanej przez światło fosforylacji. Enzym izolowany z roślin gruboszowatych przetrzymywanych na świetle, jest hamowany przez jabłczan, ale ulega aktywacji pod wpływem glukozo-6-fosforanu. Natomiast białko izolowane z roślin rosnących w ciemności jest niewrażliwe na te związki [47]. Warunki świetlne nie wpływają na specyficzność substratową, ani na ilość enzymu (badania immunologiczne) [48], mogą natomiast kontrolować posttranslacyjną modyfikację enzymu. Zgodnie z tą sugestią, stwierdzono specyficzne wobec karboksylazy PEP i zachodzące jedynie w ciemności, włączanie ^{32}P . Inkubacja preparatu enzymatycznego z roślin rosnących w ciemności z fosfatazą, nadaje mu wrażliwość na jabłczan [15]. Wyniki te potwierdzają znaczenie fosforylacji karboksylazy PEP w regulacji jej aktywności enzymatycznej.

VI. Podsumowanie

Zagadnienie udziału kinaz białkowych w regulacji aktywności fotosyntetycznej chloroplastów pozostaje nadal problemem bardzo aktualnym i kryjącym wiele zagadek. Biologiczna rola ostatnio opisanej fosforylacji białek PS II: D1 i D2 oraz białka o masie 43 000 jest dopiero w sferze hipotez [12, 13]. Białko o masie 12 000 związane z błonami tylakoidów lub nie w zależności od stopnia jego fosforylacji nie zostało utożsamione z żadnym z poznanych do tej pory białek chloroplastowych [16]. Niejasne jest też znaczenie fosforylacji podstawowego enzymu cyklu Calvina karboksylazy/oksygenazy RuBP, w każdym razie jej dużej podjednostki [41]. Nie są też zakończone prace nad charakterystyką kinaz białkowych fosforylujących białka

chloroplastowe. Nieliczne są prace, w których powiodło się ich wyizolowanie, a nawet te, które poczytują sobie to za sukces, są nim tylko połowicznie. Izolowane kinazy białkowe charakteryzują się bowiem często zmianą właściwości w porównaniu z występującymi *in vivo* (np. utrata zależności aktywności od stanu oksydoredukcyjnego łańcucha fotosyntetycznego transportu elektronów w przypadku kinazy białkowej LHCP [32]). Rozwiązanie tych problemów przyniosą niewątpliwie najbliższe lata.

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania Panu Prof. Zbigniewowi Kaniudze za zachęcanie mnie do napisania niniejszej pracy oraz cenne uwagi podczas jej przygotowania.

Artykuł opracowano w ramach badań nad strukturą i funkcją aparatu fotosyntezy roślin chłodowrażliwych (temat 1.09 w problemie CPBR 05.02).

Artykuł otrzymano 15 sierpnia 1988 r.
Zaakceptowano do druku 5 stycznia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Bennett J., (1977), *Nature* **269**, 344–346.
2. Gemel J., (1987), *Post. Biochem.* **33**, 7–28.
3. Soll J., (1985), *Planta* **166**, 394–400.
4. Soll J., Buchanan B. B., (1983), *J. Biol. Chem.* **258**, 6686–6689.
5. Bennett J., (1979), *Eur. J. Biochem.* **99**, 133–137.
6. Süß K. H., (1980), *FEBS Lett.* **112**, 255–259.
7. Widger W. R., Farchaus J. W., Cramer W. A., Dilley R. A., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.* **233**, 72–79.
8. Allen J. F., Bennett J., Steinback K. E., Arntzen C. J., (1981), *Nature* **291**, 21–25.
9. Farchaus J., Dilley R. A., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 94–101.
10. Widger W. R., Cramer W. A., Hermodson M., Meyer D., Gullifor M., (1984), *J. Biol. Chem.* **259**, 5870–5876.
11. Sebald W., Wachter E., (1980), *FEBS Lett.* **122**, 307–311.
12. Ikeuchi M., Plumley F. G., Inoue Y., Schmidt G. W., (1987), *Plant Physiol.* **85**, 638–642.
13. Morder J. B., Telfer A., Barber J., (1988), *Biochim. Biophys. Acta* **932**, 362–365.
14. Michel H., Shaw E. K., Bennett J., (1987) w *Plant Membranes: Structure, Function, Biogenesis*, str. 85–102, Alan R. Liss, Inc.
- 14a. Guitton C., Dorne A. M., Mache R., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**, 297–303.
15. Ranjeva R., Boudet A. M., (1987), *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**, 73–93.
16. Bhalla A., Bennett J., (1987), *Arch. Biochem. Biophys.* **252**, 97–104.
17. Black M. T., Foyer C. H., Horton P., (1984), *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 557–562.
18. Allen J. F., Holmes N. G., (1986), *FEBS Lett.* **202**, 175–181.
19. Foyer C. H., (1987), *Biochem. J.*, **248**, 103–108.
20. Hird S. M., Dyer T. A., Gray J. C., (1986), *FEBS Lett.* **209**, 181–186.
21. Bennett J., (1980), *Eur. J. Biochem.* **104**, 85–89.
22. Mullett J. E., (1983), *J. Biol. Chem.* **258**, 9941–9948.
23. Millner P. A., Widger W. R., Abbott M. S., Cramer W. A., Dilley R. A., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 1736–1742.
24. Farchaus J., Dilley R. A., Cramer W. A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta* **809**, 17–26.
25. Wyatt J. T., Colman R. F., (1977), *Biochemistry* **16**, 1333–1342.

26. Markwell J. P., Baker N. R., Thornber J. P., (1983), *Photochem. Photobiophys.* **5**, 201–207.
27. Markwell J. P., Baker N. R., Bradbury M., Thornber J. P., (1984), *Plant Physiol.* **74**, 348–354.
28. Good N. E., (1963), *Plant Physiol.* **38**, 298–304.
29. Barr R., Melhem R., Lezotte A. L., Crane F. L., (1980), *J. Bioenerg. Biomembr.* **12**, 197–203.
30. Moll B. A., Steinback K. E., (1986), *Plant Physiol.* **80**, 420–423.
31. Moll B. A., Eilmann M., Steinback K. E., (1987), *Plant Physiol.* **83**, 428–433.
32. Coughlan S. J., Hind G., (1986), *J. Biol. Chem.* **261**, 11378–11385.
33. Coughlan S. J., Hind G., (1986), *J. Biol. Chem.* **261**, 14062–14068.
34. Lin Z.-F., Lucero H. A., Racker E., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 12153–12156.
35. Lucero H. A., Lin Z.-F., Racker E., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 12157–12160.
36. Bennett J., (1984), *Physiol Plant.* **60**, 583–590.
37. Bennett J., (1984), *Biochem. Soc. Trans.* **12**, 771–774.
38. Haworth P., Kyle D. J., Horton P., Arntzen C. J., (1982), *Photochem. Photobiol.* **36**, 743–748.
- 38a. Anderson J. M., (1987) w „Photosynthesis”, red. Ames J., str. 273–297, Elsevier, Amsterdam.
39. Haworth P., Kyle D. J., Arntzen C. J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta* **680**, 343–351.
40. Torti F., Gerola P. D., Jennings R. C., (1984), *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 321–325.
41. Foyer C. H., (1985), *Biochem. J.* **231**, 97–103.
42. Kaniuga Z., (1976), *Post. Biochem.* **22**, 245–305.
43. Buchanan B. B., Schürman P., (1973) w „Current Topics in Cellular Regulation”, red. Horecker B. L., Stadtman E. R., t. 7, str. 1–20, Academic Press, New York, London.
44. Muto S., Shimogawara K., (1985), *FEBS Lett.* **193**, 88–92.
45. Burnell J. N., Hatch M. D., (1985), *Trends Biochem. Sci.* **10**, 288–291.
46. Burnell J. N., Hatch M. D., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 288–293.
47. Nimmo G. A., Nimmo H. G., Fewson C. A., Wilkins M. B., (1984), *FEBS Lett.* **178**, 199–203.
48. Gadal P., Queiroz O., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 151–159.

30. Maitwell J.P., Baker N.R., Thorpe J.P. (1987) *Journal of Neurophysiology*, 57, 200-207.

31. Moll B.A., Eilmann M., Steinbach K.E. (1987) *Brain*, 110, 421-431.

32. Coughlin S.I., Hind G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11378-11382.

33. Coughlin S.I., Hind G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11383-11387.

34. Lin Z-F., Lucero-Hernandez A., Rucker E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12157-12161.

35. Lucero H.A., Lin Z-F., Rucker E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12162-12166.

36. Bennett J. (1984) *Brain*, 107, 779-787.

37. Haworth P., Kyle D.I., Horton T., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 101-107.

38. Haworth P., Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 108-114.

39. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 115-121.

40. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 122-128.

41. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 129-135.

42. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 136-142.

43. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 143-149.

44. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 150-156.

45. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 157-163.

46. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 164-170.

47. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 171-177.

48. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 178-184.

49. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 185-191.

50. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 192-198.

51. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 199-205.

52. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 206-212.

53. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 213-219.

54. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 220-226.

55. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 227-233.

56. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 234-240.

57. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 241-247.

58. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 248-254.

59. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 255-261.

60. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 262-268.

61. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 269-275.

62. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 276-282.

63. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 283-289.

64. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 290-296.

65. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 297-303.

66. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 304-310.

67. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 311-317.

68. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 318-324.

69. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 325-331.

70. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 332-338.

71. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 339-345.

72. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 346-352.

73. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 353-359.

74. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 360-366.

75. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 367-373.

76. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 374-380.

77. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 381-387.

78. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 388-394.

79. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 395-401.

80. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 402-408.

81. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 409-415.

82. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 416-422.

83. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 423-429.

84. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 430-436.

85. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 437-443.

86. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 444-450.

87. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 451-457.

88. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 458-464.

89. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 465-471.

90. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 472-478.

91. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 479-485.

92. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 486-492.

93. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 493-499.

94. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 500-506.

95. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 507-513.

96. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 514-520.

97. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 521-527.

98. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 528-534.

99. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 535-541.

100. Kyle D.I., Atkinson C.J. (1987) *Brain*, 110, 542-548.

MARIA SANECKA-OBACZ*

Kinazy białkowe ośrodkowego układu nerwowego w ontogenezie

Protein Kinases of Central Nervous System during Ontogenesis

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Aktywność kinaz białkowych serynowo/treoninowych
 - II-1. Kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów
 - II-2. Kinazy zależne od wapnia i kalmoduliny
 - II-3. Kinazy zależne od wapnia i fosfolipidów
 - II-4. Kinazy o innym lub nieznanym sposobie aktywacji
- III. Aktywność kinaz białkowych tyrozynowych
- IV. Regulacja aktywności kinaz białkowych
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Protein Serine / Threonine Kinases Activity
 - II-1. Cyclic Nucleotide-Dependent Kinases
 - II-2. Calcium/Calmodulin-Dependent Kinases
 - II-3. Calcium/Phospholipid-Dependent Kinases
 - II-4. Protein Kinases of another or unknow mechanism of activation
- III. Protein Tyrosine Kinases Activity
- IV. Regulation of Protein Kinases Activity
- V. Concluding Remarks

Wykaz stosowanych skrótów: EGF – naskórkowy czynnik wzrostowy, NGF – czynnik wzrostu nerwów, cAMP – cykliczny 3', 5' adenozynomonofosforan, kD – kilodaltony cGMP – cykliczny 3', 5' guanozynomonofosforan, OUN – ośrodkowy układ nerwowy.

I. Wstęp

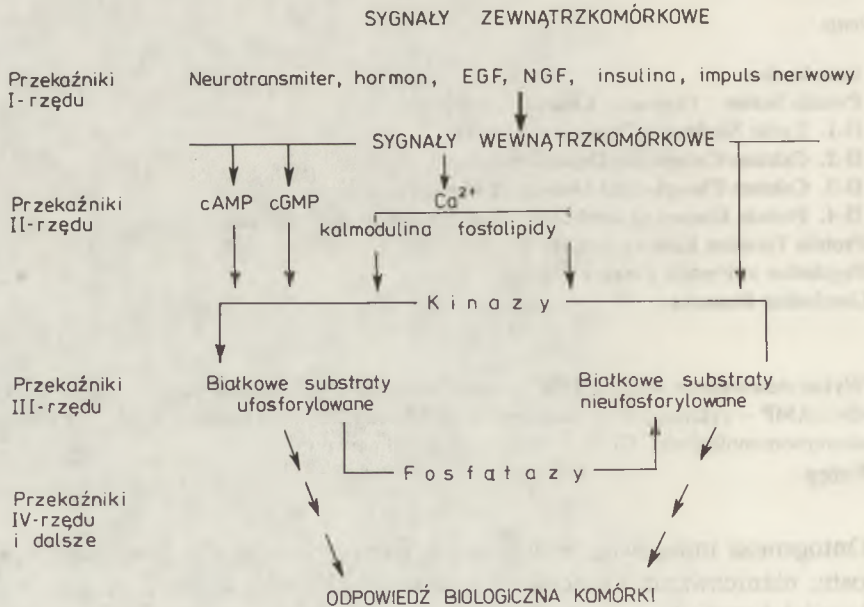
Ontogeneza mózgowia, podobnie jak i innych narządów, obejmuje procesy wzrostu, różnicowania i specjalizacji komórek. Procesy wzrostu i różnicowania większości komórek zachodzą w życiu płodowym [1], natomiast specjalizacja funkcjonalna komórek, dokonuje się w ciągu całego życia osobniczego [2].

* Dr, Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Lublinie ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin.

Zmiany rozwojowe zachodzące pod wpływem środowiska zewnętrznego (sensorycznego) określamy mianem plastyczności rozwojowej [2]. Plastyczność mózgu jest bardzo duża we wczesnym okresie życia i zmniejsza się wraz z wiekiem. Dla wielu procesów rozwojowych jest ona duża tylko we wczesnych, określonych okresach życia – mówimy wtedy o okresach krytycznych. Przyjmuje się, że początek okresu krytycznego wiąże się z dojrzewaniem określonych neuronów do ich funkcji, a jego koniec z utratą przez nie plastyczności rozwojowej. Tylko część neuronów zachowuje plastyczność w ciągu całego życia osobniczego, ale dzięki tym neuronom, możliwe jest uczenie się i procesy kompensacyjne po uszkodzeniu mózgu.

Podkreślić należy, że równoległe z rozwojem występują procesy inwolucyjne. Neuronów i ich wypustki są produkowane w nadmiarze, a następnie znaczna ich część degeneruje się [1, 2]. W późnym okresie życia procesy inwolucyjne nasilają się, a otępienie starcze jest okresem całkowitego załamania się plastyczności neuronów.

Zarówno rozwój morfologiczny, jak i specjalizacja funkcjonalna (plastyczność rozwojowa) są precyzyjnie regulowane między innymi poprzez fosforylację różnych białek. Procesy fosforylacji w mózgu są znacznie intensywniejsze niż w innych tkankach [3], ponieważ oprócz ogólno-komórkowych funkcji regulacyjnych, fosforylacja w mózgu zaangażowana jest w specyficzne funkcje neuronów [3, 4]. Schematycznie przedstawiono to na Rycinie:



Sygnały zewnątrzkomórkowe, określane jako przekazniki I rzędu, bezpośrednio lub pośrednio poprzez cAMP, cGMP, Ca^{2+} (przekazniki II rzędu) działają na kinazy białkowe, fosforylujące różne substraty. W efekcie następuje ekspresja

genów, różnicowanie, proliferacja, zmiana aktywności enzymów, transport aksonalny, reorganizacja synaps (plastyczność), wytworzenie impulsu nerwowego [3, 4, 5, 6, 7]. Te i inne efekty określamy mianem odpowiedzi biologicznej komórki. Wszystkie ogniwa systemu fosforylacji zmieniają się podczas rozwoju.

W niniejszym artykule przedstawiono ontogenetyczne zmiany aktywności ważniejszych kinaz białkowych ośrodkowego układu nerwowego. Każdy z podrozdziałów poprzedzono krótką charakterystyką omawianych kinaz. Nieco więcej uwagi poświęcono kinazom zależnym od Ca^{2+} i kalmoduliny, nieomawianym w innych artykułach tego tomu, natomiast mniej uwagi poświęcono kinazie zależnej od cyklicznego AMP, opisanej w *Postęпах Biochemii* w 1987 roku [8].

Zebrany materiał nie wyczerpuje w pełni omawianego zagadnienia, pozwoli jednakże zorientować się w zakresie badań i poglądów na ten temat.

II. Aktywność kinaz białkowych serynowo/treoninowych

Wśród kinaz białkowych serynowo/treoninowych wyróżnić można, w zależności od sposobu aktywacji, kinazy: 1 – zależne od cyklicznych nukleotydów, 2 – zależne od jonów wapnia i kalmoduliny, 3 – zależne od jonów wapnia i fosfolipidów i 4 – o innym lub nieznanym sposobie aktywacji.

Wszystkie enzymy tej grupy przenoszą końcową resztę fosforanową z ATP na serynę lub (i) treoninę białkowych substratów. Sekwencja aminokwasów sąsiadujących z hydroksyaminokwasem będącym akceptorem fosforanu jest istotnym [3], ale nie jedynym czynnikiem determinującym specyficzność substratową, bowiem niektóre miejsca mogą być fosforylowane przez kilka kinaz, inne wymagają enzymu swoistego [5, 9, 10]. Wszystkie kinazy podlegają autofosforylacji, ale nie są substratami nawzajem dla siebie.

Kinazy wykrywane w mózgowiu są specyficznymi formami kinaz występujących w innych tkankach organizmów wyższych. Ilościowo przeważają kinazy zależne od Ca^{2+} i kalmoduliny, stanowiące 1–2% ogólnej ilości białek danego obszaru [11], natomiast pozostałe kinazy stanowią od 0,01 do 0,1% [12, 13].

II-1. Kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów

W ośrodkowym układzie nerwowym występują dwie odrębne kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów: kinaza A zależna od cyklicznego AMP i kinaza G zależna od cyklicznego GMP.

Kinaza zależna od cAMP (kinaza A) jest tetramerem (R_2C_2), występującym w dwu odmianach izomerycznych (typ I i typ II), różniących się podjednostką regulatorową.

W mózgowiu występują oba izoenzymy [14, 15, 16], ale pod względem ilościowym przeważa typ II, zwany neuronalnym [5, 17]. Podjednostka regulatorowa (R_{II}) kinazy neuronalnej posiada odmienne własności fizykochemiczne od podjednostki analogicznej R_{II} występującej w tkankach nienerwowych [5, 8, 18].

Kinaza ta jest równomiernie rozmieszczona we wszystkich obszarach mózgowia z wyraźną lokalizacją neuronalną [14, 17, 19, 20, 21, 22].

Aktywność kinazy A zależy w dużym stopniu od badanego obszaru i okresu rozwoju. W okresie postnatalnym nie obserwowano istotnych zmian aktywności kinazy zależnej od cAMP w surowych preparatach kory mózgowej szczurów [23], myszy [24] i ludzi [25]. Istotny wzrost stwierdzano w mózgu kurcząt w okresie embrionalnym [26], Sanecka-Obacz M., Szyszka R., (dane niepublikowane) oraz w mózdzku szczura w okresie postnatalnym. W mózdzku szczura, najpierw pojawia się typ I kinazy A, a dopiero po 10 dniach typ II, oba typy osiągają szczyt aktywności w tym samym czasie, około 25 dnia życia i w późniejszym okresie poziom kinazy nie zmienia się [27]. Ponadto obserwowano, w preparatach wzbogaconych w błony synaptyczne [28, 29], oraz w homogenatach kory wzrokowej [30, 31], zależny od rozwoju wzrost fosforylacji endogennej, stymulowanej przez cykliczny AMP. Wskazuje to na udział kinazy zależnej od cAMP oraz jej białkowych substratów w dojrzewaniu (plastyczności rozwojowej) synaps.

Kinaza zależna od cyklicznego GMP (kinaza G) jest dimerem. Każda podjednostka posiada obszar regulatorowy wiążący 2 cząsteczki cGMP i obszar katalityczny. Związanie cGMP wywołuje zmiany konformacyjne w enzymie i ujawnia właściwości katalityczne. Obie podjednostki połączone są trwale przez dwa mostki siarczkowe [3]. Najwyższe stężenie kinazy G znaleziono w mózdzku, natomiast bardzo niskie stężenia w pozostałych obszarach [32, 33].

Dotychczas w mózdzku, opisano tylko jeden fizjologiczny substrat dla kinazy zależnej od cGMP, zwany substratem G [3, 5]. Jest to termostabilne, rozpuszczalne w kwasach białko o masie 23 kD. Po ufosforylowaniu (2 reszty treoniny), wykazuje ono własności inhibitora fosfatazy białkowej 1 i 2A [5]. Dwa dalsze substraty kinazy G, białko A (90 kD) i białko B (54 kD), znaleziono w zwojach szyjnych górnych [34].

Zarówno w mózdzku [35] jak i w całym mózgu [36] obserwowano wzrost aktywności kinazy G w okresie postnatalnym. Np. w mózdzku nowonarodzonych szczurów jej poziom jest niski, wzrasta w okresie od 10 do 25 dnia i u osobników dorosłych pozostaje niezmienny. Równoległe do wzrostu aktywności kinazy G wzrasta w mózdzku poziom cyklicznego GMP [37].

Tak więc, kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów wykrywano w różnych okresach ontogenezy. Aktywność ich wyraźnie rośnie w okresie intensywnej synaptogenezy: w mózgu – w okresie prenatalnym, a w mózdzku – w okresie postnatalnym. U osobników dorosłych poziomy obu kinaz nie zmieniają się.

Interesującym jest, że w nowotworach mózgu, pojawia się typ I kinazy zależnej od cAMP i wzrasta poziom kinazy zależnej od cGMP [38].

II-2. Kinazy zależne od wapnia i kalmoduliny

Z mózgu wyodrębniono 4 kinazy należące do tej grupy. Są to: kinaza lekkiego łańcucha miozyny, kinaza fosforylasy i dwie tzw. kinazy zależne od wapnia i kalmoduliny typ I i typ II. Specyficzne funkcje neuronów związane są z aktywnością dwu ostatnich kinaz.

Kinaza zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny typu I jest monomerem, aktywowanym przez kompleks kalmodulina-wapń. Jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w mózgu [39, 40, 41]. Wykrywano ją we wszystkich strukturach subkomórkowych, a zwłaszcza w synapsach [42]. Fosforyluje ona te same miejsca w synapsynie (miejsce 1) i w białku III, co kinaza zależna od cAMP [5, 40, 42].

Kinaza zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny typu II jest multimerem, zbudowanym z podjednostek *alfa* (α 50 kD) i *beta* (β 60 kD). Obie podjednostki wiążą kalmodulinę w obecności wapnia [43, 44] i w kompleksie tym wykazują aktywność kinazową oraz zdolność do autofosforylacji [43, 44, 45, 46]. Mapy peptydów otrzymanych w wyniku ograniczonej proteolizy podjednostek *alfa* i *beta* są różne, natomiast monoklonalne przeciwciała wytwarzane przeciwko podjednostkom *alfa*, rozpoznają również podjednostki *beta* enzymu, izolowane z tego samego i z rozmaitych obszarów mózgu [44]. Podjednostki *alfa* i *beta* są zatem białkami odrębnymi, ale immunologicznie spokrewnionymi.

Zależna od wapnia i kalmoduliny kinaza typu II fosforyluje wiele substratów fizjologicznych [11, 43, 45, 47]. W ośrodkowym układzie nerwowym, kinaza ta występuje w znacznym stężeniu i rozmieszczona jest nierównomiernie w poszczególnych obszarach i strukturach subkomórkowych [11, 21, 22]. W całym mózgu stanowi ona około 1% białek całkowitych, natomiast w poszczególnych obszarach ilość jej waha się od 0,1% białek całkowitych w móście do 1,3% w korze i 2% w hipokampie [11]. Badania immunocytochemiczne [49] wskazują na lokalizację neuronalną, z dużym zagęszczeniem enzymu w połączeniach synaptycznych (synaptic junction – SJ) [50], w zagęszczeniach postsynaptycznych (postsynaptic density – PSD) [51, 52], w neuronalnym cytoszkielecie [47, 53, 54], a także w jądrze [52].

Enzymy izolowane z różnych części mózgowia, a także z różnych struktur subkomórkowych wykazują znaczne różnice w liczbie i proporcji obu podjednostek [21, 22, 48, 53]. Drastyczne różnice wykazują izoenzymy kory mózgowej ($\alpha_9\beta_3$, 550 kD) (i mózdzku ($\alpha_2\beta_8$, 615 kD) [44]. Siatkówka zawiera enzym o ciężarze cząsteczkowym 275 kD, zbudowany tylko z podjednostek *alfa* [55].

Podjednostki *alfa* i *beta* enzymów pochodzących z różnych źródeł nie różnią się między sobą [44, 56], natomiast poszczególne izoenzymy różnią się wpływem autofosforylacji na aktywność katalityczną. Na przykład, autofosforylacja enzymu z siatkówki przekształca kinazę zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny w kinazę hamowaną przez wapń i kalmodulinę a bardzo aktywną w nieobecności wapnia [55]. Wpływ autofosforylacji izoenzymu z kory mózgowej na jego aktywność zależy od stężenia ATP [57]. Przy niskim, ale wysycającym stężeniu ATP ($5\mu\text{M}$) autofosforylacja powoduje 75% redukcję aktywności kinazy, przy czym pozostała aktywność jest w dalszym ciągu zależna od wapnia i kalmoduliny. Przy wysokim, ale fizjologicznym stężeniu ATP ($500\mu\text{M}$), przeciwnie – autofosforylacja powoduje konwersję enzymu do form aktywnych w nieobecności wapnia i kalmoduliny bez obniżenia jego aktywności [57, 58].

Obserwowane w dojrzałym mózgu ogromne zróżnicowanie izoenzymów; ich nierównomierne rozmieszczenie w poszczególnych obszarach i strukturach sub-

komórkowych jest wynikiem dynamicznych zmian zachodzących w procesie dojrzewania, głównie we wczesnym okresie postnatalnym [53].

W mózdku na przykład, bezpośrednio po urodzeniu, poziom podjednostki *alfa* jest niski i tylko minimalnie wzrasta w ciągu pierwszego i drugiego tygodnia odpowiednio w cytosolu i w cytoszkielecie. Natomiast poziom podjednostki *beta*, już wyjściowo kilkakrotnie wyższy rośnie gwałtownie, osiągając szczyt w drugim tygodniu w cytosolu i w cytoszkielecie, a w czwartym tygodniu w jądrach. W korze mózgowej ilościowo przeważa również podjednostka *beta*, ale poziomy obu podjednostek wzrastają proporcjonalnie w ciągu pierwszych 10 dni, po czym następuje gwałtowny wzrost stężenia podjednostki *alfa* – do wartości maksymalnej w drugim tygodniu w cytosolu, a w trzecim tygodniu w cytoszkielecie i jądrach [53]. Tak więc we wczesnym okresie postnatalnym w obu obszarach ilościowo przeważa podjednostka *beta*, a w czasie rozwoju tylko w korze mózgowej następuje odwrócenie tego stosunku.

Zmianę (wzrost) wartości stosunku podjednostek *alfa* do *beta* podczas rozwoju obserwowali także inni badacze [51, 59]. Wyniki te sugerują występowanie w mózgu różnych form izoenzymów regulowanych w sposób zależny od wieku.

Izoenzymy takie zostały wyizolowane i oczyszczone przez Rosta i wsp. [60]. Masa cząsteczkowa enzymu izolowanego z kory mózgowej szczurów 10 dniowych wynosiła 500 kD, przy stosunku molowym podjednostek *alfa/beta* 1:1, zaś szczurów dorosłych 700 kD i stosunku 3:1.

Ponadto w zagęszczeniach postsynaptycznych występują dwie dodatkowe formy kinazy zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny typu II, „aktywna” i „nieaktywna”, różniące się zdolnością autofosforylacji podjednostek *alfa* w nich zawartych [51].

W czasie rozwoju obserwuje się zmiany rozmieszczenia subkomórkowego. W mózgu osobników nowonarodzonych, poziom kinazy jest czterokrotnie wyższy w cytosolu niż we frakcjach sedymentujących (particulate), a wraz z wiekiem stosunek ten odwraca się [48].

Obserwowane podczas rozwoju mózgu zmiany stymulowanej przez wapń i kalmodulinę kinazy typu II, są ściśle zsynchronizowane z synaptogenezą i stanowią przykład molekularno-funkcjonalnego dojrzewania synaps.

II-3. Kinazy zależne od wapnia i fosfolipidów (kinaza C)

Kinazy zależne od wapnia i fosfolipidów są monomerami. Można je rozdzielić chromatograficznie, na kolumnie z hydroksyapatytu na trzy izoenzymy: typ I (γ), typ II ($\beta\beta_{II}$) i typ III (α) [61, 65]. Wszystkie izoenzymy mają podobne ciężary cząsteczkowe (82 kD), posiadają aktywność katalityczną i zdolność autofosforylacji w obecności Ca^{2+} i fosfatydyloseryny lub dioleinianu, oraz wiążą estry forbolu [66]. Różnią się profilem elucji z hydroksyapatytu, miejscem autofosforylacji (seryna w typie I i II, seryna i treonina w typie III) [62], determinantą antygenową [62, 64] i strukturą I-rzędową [67]. Występują w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego i w różnych frakcjach subkomórkowych.

Najwyższe stężenie kinazy typu I obserwowano w mózdku [61, 63], w hipokampie i w jądrze migdałowatym [63], typu II w korze mózgowej [61, 63] i we wzgórzu [63], zaś typu III w rdzeniu kręgowym [61] i w opuszce węchowej [63]. Analizując wzajemne proporcje między poszczególnymi typami należy stwierdzić, że w badanych obszarach mózgu największym wahaniem ilościowym podlegają kinazy typu I i III. W mózdku na przykład typ I stanowi 56%, typ III – 10%; w rdzeniu kręgowym typ I prawie nie występuje, a typ III stanowi ponad 50%. Typ II natomiast, rozmieszczony jest prawie równomiernie we wszystkich obszarach i, z wyjątkiem mózdku, stanowi najwyższy odsetek aktywności całkowitej.

Badania immunocytochemiczne i autoradiograficzne wskazują na lokalizację neuronalną, głównie w zakończeniach pre- i postsynaptycznych [68, 69, 70], a w mózdku, w komórkach Purkiniego i w ich dendrytach [65, 66].

K i k k a w a i w s p. [68] wykazali, że około 1/3 całkowitej aktywności zależnej od wapnia i fosfolipidów znajduje się we frakcji cytosolowej, pozostała część we frakcjach sedimentujących (particulate). Nie znaleziono różnic między enzymami z obu źródeł [68].

Aktywność enzymu i subkomórkowe rozmieszczenie podlega spontanicznym zmianom zależnym od stanu komórki. W komórkach proliferujących aktywność kinazy C jest wysoka i odnajduje się ją głównie w ziarnistościach, natomiast w komórkach spoczynkowych aktywność ta jest niższa i występuje głównie w cytosolu. [71].

Przejściowy wzrost poziomu Ca^{2+} i diglicerydów w komórce [72, 73] a także estry forbolu [74] przesuwają kinazę C z cytoplazmy, gdzie jest nieaktywna, do błon, gdzie może być aktywowana. Translokacja kinazy C pokrywa się z fosforylacją głównego składnika białkowego błon presynaptycznych, a zarazem głównego substratu tego enzymu [75, 76, 77] i z wytworzeniem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (long-term potentiation – LTP). Istnieją przesłanki by sądzić, że zjawisko to (LTP) odgrywa dużą rolę w plastyczności rozwojowej i pamięciowej neuronów [76, 77, 78, 79].

Poziom kinazy C w mózgu zmienia się w czasie dojrzewania [69, 80, 81, 82]. W korze mózgowej, mózdku i w śródmózgowiu świnki morskiej, na 20 dni przed porodem poziom kinazy jest niski i wzrasta nierównomiernie w poszczególnych obszarach. Największy wzrost obserwowano w korze mózgowej, nieco mniejszy w mózdku; w obu obszarach aktywność osiąga maksimum około 5 dnia po porodzie, a po dalszych 10 dniach nieco spada. W śródmózgowiu, wzrost jest najmniejszy; maksymalny poziom osiągany jeszcze przed porodem, a w okresie postnatalnym obserwuje się również obniżenie aktywności [80].

W mózgu szczurów wzrost poziomu kinazy C następuje nieco później, około 30 dnia po porodzie, po czym obniża się, zachowując w okresie dojrzałym 60% wartości maksymalnej [69, 81]. Czasowe przesunięcie wystąpienia aktywności maksymalnej w obu grupach badanych zwierząt, odpowiada różnicy czasowej osiągnięcia przez nie maksymalnego ciężaru mózgu [83]. A zatem w obu grupach zwierząt wzrost poziomu kinazy C przypada na okres synaptogenezy i mielinizacji.

Interesującym jest, że aktywność kinazy C odmywana z frakcji rybosomalnej KCl (salt wash), mierzona zarówno wobec substratu egzogenego (histonu H3), jak i substratów endogennych, jest znacznie wyższa u szczurów 2 miesięcznych w porównaniu z 4 – 10 dniowymi. Ponadto, w obu grupach wiekowych, podjednostki *alfa* i *beta* czynnika inicjującego 2 (eIF-2) fosforylowane są z różną wydajnością. U dorosłych zwierząt obserwuje się wzrost fosforylacji podjednostki *beta* z jednoczesnym hamowaniem fosforylacji podjednostki *alfa* [82].

Dotychczas nie ustalono związku między typem kinazy C a jej specyficzną funkcją w neuronach. Jednakże zgromadzone obserwacje odnośnie kinazy typu I (występuje tylko w ośrodkowym układzie nerwowym i to w górnych jego piętach, nie występuje w okresie płodowym, a pojawia się dopiero po urodzeniu i wzrasta w okresie postnatalnym) sugerują, że właśnie ona spełnia istotną funkcję w plastyczności synaps związanej z procesem uczenia się i pamięci.

II-4. Kinazy o innym lub nieznanym sposobie aktywacji

Oprócz kinaz aktywowanych przez cykliczne nukleotydy i jony wapnia w mózgu, podobnie jak i w innych tkankach, występują tzw. kinazy niezależne (independent). Nazwy tych kinaz pochodzą najczęściej od substratów, na które działają. Są to np. kinazy kazeinowe, kinazy neurofilamentów, kinazy zasadowych białek mieliny i inne.

Z mózgu wyodrębniono dwie kinazy kazeinowe; typ I i typ II [84, 85, 86]. Wykrywano je w różnych frakcjach subkomórkowych [82, 85, 86], a poziom ich aktywności nie zmienia się w czasie rozwoju [82], (Sanecka-Obacz M., Szyska R., dane niepublikowane). Własności fizykochemiczne i specyficzność substratowa kinaz kazeinowych mózgu [87, 88] są podobne do analogicznych enzymów występujących w innych tkankach [89].

Niezależne kinazy neurofilamentów, znaleziono w mózgu wołu [90], świnki morskiej [91] i szczura [92]. Z egzogennych substratów kinazy te przedkładają kazeinę nad histon, ale i kazeina jest słabym akceptorem fosforu [93]. Substratami naturalnymi są wszystkie trzy neurofilamenty (NF 200, NF 145, NF 68), a ponadto cztery inne białka neurofilamentów (53, 55, 65, 300 kD), dwa zasadowe białka mieliny (18, 21 kD) i dwa białka cytoszkieletu – kwaśne fibrylarne białko gleju (glial fibrillary acidic protein) i vinetyna (vinetin) [95]. Egzogeny MAP-2, główne białko mikrotubul, zwiększa szybkość fosforylacji neurofilamentów i sam jest intensywnie fosforylowany przez kinazę „niezależną” [93]. Sugeruje to możliwość udziału tej kinazy w fizjologicznym oddziaływaniu mikrotubul i neurofilamentów. W dostępnej literaturze nie znaleziono danych odnośnie zmian aktywności kinaz neurofilamentów w ontogenezie.

Zasadowe białka mieliny (14, 17, 18,5, 21,5 kD) są substratami dla wielu typów kinaz *in vitro*. Chociaż w mielinie wykazano obecność kinazy zależnej od cAMP [94], od Ca^{2+} i kalmoduliny [95], od Ca^{2+} i fosfolipidów [96], to nie ma pewności czy białka mieliny są substratami dla wszystkich tych kinaz również *in vivo*.

Cykliczny AMP znacznie obniża fosforylację zasadowych białek mieliny oligodendrocytów w hodowli tkankowej [97].

Aktywność kinaz niezależnych od wapnia i cyklicznych nukleotydów w mielinie jest bardzo wysoka [98, 99, 100]. Białka mieliny fosforylowane są już w oligodendrocytach, a więc przed utworzeniem osłonek mielinowych [97, 100]. Intensywność fosforylacji zasadowych białek mieliny obniża się wraz z wiekiem [101, 102, 103]. We wszystkich badanych okresach rozwoju, fosforylacja seryny przewyższa inkorporację fosforanu do treoniny [103]. Aktywność kinaz „niezależnych” obserwowano ponadto w połączeniach synaptycznych (synaptic junction – SJ) [50], w zagęszczeniach postsynaptycznych (postsynaptic density – PSD) [104, 105], we frakcji błonowej [82, 106], we frakcji rybosomalnej [107] i w cytosolu [82, 108]. Poziom aktywności kinaz niezależnych rośnie z wiekiem [82, 107, 108].

W ostatnich latach ukazały się doniesienia o występowaniu w mózgu kinaz aktywowanych w inny sposób niż przez cykliczne nukleotydy i jony wapnia. Są to kinazy aktywowane przez termostabilne białka występujące w surowym preparacie inhibitora kinazy białkowej [109, 110] oraz białko S-100 [111, 112]. Ponieważ naturalne substraty tych kinaz nie są znane, określa się je roboczo jako kinaza S [110] i kinaza X [111]. Kinaza S – eluowana z DEAE celulozy 0,06 mM fosforanem potasu, preferuje histon 2B jako substrat, zaś kinaza X, eluowana z DEAE celulozy 150 mM NaCl, preferuje protaminę jako substrat. Jakkolwiek, oba te enzymy aktywne są jedynie w obecności termostabilnego białka wydaje się, że reaguje ono raczej z substratem niż z enzymem. Kinaza S wykazuje zależny od rozwoju wzrost aktywności [110].

Z mózgu świnki morskiej wyizolowano i oczyszczono do homogenności kinazę białkową, aktywowaną przez fosforylację [113]. Metodą elektroforezy na żelu poliakryloamidowym stwierdzono, że zawiera ona jedną podjednostkę o masie 36 kD. Enzym jest bardzo aktywny wobec białek zasadowych mieliny i histonów (H1, H2A, H2B). Trypsyna całkowicie znosi aktywność enzymatyczną. W stanie niefosforylowanym, kinaza jest nieaktywna, ale staje się w pełni aktywna po fosforylacji w stosunku molowym 1:1. I odwrotnie, stopniowa defosforylacja powoduje obniżenie aktywności enzymu. Kinetyczne, katalityczne i fizykochemiczne własności enzymu wskazują, że jest to enzym odrębny od dotychczas opisanych [113]. Jedną z jego funkcji może być fosforylacja białek mieliny.

III. Aktywność kinaz białkowych – tyrozynowych

Zdolność przenoszenia reszty fosforanowej z ATP na tyrozinę (aktywność kinazy tyrozynowej) wykazują białkowe produkty genów wirusowych (pp60^{v-src}), homologicznych genów normalnych komórek (pp60^{c-src}), a także receptory błonowe różnych czynników wzrostowych [5, 6, 114].

W mózgu, jak i w innych tkankach aktywność kinazy tyrozynowej wykazują receptory insuliny [115, 116], epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF) [117]

oraz innych czynników wzrostowych [118, 119, 120] i neurotransmitterów [5]. A ostatnio, z mózgu zwierząt dojrzałych wyizolowano i oczyszczono kinazę tyrozynową (pp60^{c-src}) [121, 122, 123]. Poziom kinazy tyrozynowej w mózgu kręgowców jest wyższy niż w innych tkankach nieproliferujących [124], co sugeruje możliwość udziału kinazy tyrozynowej w specyficznych funkcjach komórek neuronalnych [123, 125, 126].

Rozmieszczenie regionalne aktywności kinazy tyrozynowej (pp60^{c-src}), jest podobne do rozmieszczenia kinazy C. Wysoką aktywność kinazy tyrozynowej obserwowano w mózdzku, hipokampie i w opuszce węchowej [127, 128]. We wszystkich obszarach mózgu aktywność kinazy tyrozynowej związana jest z sedymentującymi frakcjami komórki [128]. Szczególnie bogata w tę kinazę jest frakcja błon synaptycznych i pęcherzyków synaptycznych [123, 127, 128, 129].

Zgodnie z regionalnym i subkomórkowym rozmieszczeniem aktywności kinazy, rozmieszczone są białka zawierające fosfotyrozynę (substraty endogenne) [127, 128]. W homogenacie całego mózgu, dodatnią reakcją z przeciwciałem dla fosfotyrozyny dają białka w zakresie 26, 38, 87, 96, 114, 135, 164 i 195 kD. Przy czym stężenie białka 87 kD jest wysokie w mózdzku, a białek 26, 38 i 96 kD w błonach i pęcherzykach synaptycznych. Białko 38 kD zidentyfikowane jako synaptofizyna (synaptophysin), jest głównym składnikiem białkowym pęcherzyków synaptycznych i głównym substratem kinazy tyrozynowej [129].

Manes i wsp. badając mózg w różnych etapach rozwoju wykazali, że kinaza tyrozynowa pojawia się w okresie różnicowania, po czym poziom jej wzrasta i pozostaje wysoki u osobników dojrzałych [130, 131, 132].

Wysokie stężenie kinazy tyrozynowej w dojrzałym mózgu, a także regionalne i subkomórkowe rozmieszczenie enzymu oraz jego białkowych substratów wskazują na rolę fosforylacji tyrozyny w funkcji synaps, taką jak uwalnianie neurotransmitterów (sekrecja) i modulowanie receptorów błonowych lub kanałów jonowych. Potwierdzeniem udziału kinazy w sekrecji neurotransmitterów może być fakt występowania dużego jej stężenia również w ziarnistościach chromochłonnych (chromaffin granule) [133].

IV. Regulacja aktywności kinaz białkowych

Intensywność procesów fosforylacji regulowana jest nie tylko przez ilość enzymu, co wykazano w poprzednich rozdziałach [26, 27, 35, 36, 53, 80, 110, 130, 131], ale także przez inne dodatkowe mechanizmy, których dokładne omówienie przekracza ramy tego artykułu. Sygnalizując najważniejsze z nich, należy wymienić regulację poprzez: 1-stężenie właściwych aktywatorów cAMP, cGMP, Ca²⁺, 2-stężenie właściwych białkowych aktywatorów i inhibitorów, w tym podjednostek regulatorowych enzymu, 3-stężenie białkowych substratów, 4-autofosforylację, 5-translokację, 6-ograniczoną proteolizę i inne.

Poziom cAMP zależy od sprawności układu cykloazy adenilowa/fosfodiesteraza i podczas rozwoju w mózgu nie ulega zmianie [134], poziom cyklicznego GMP

wzrasta [37, 134], natomiast odnośnie poziomu wapnia wykazano wszystkie trzy możliwości. W mózgu psa, świnki morskiej i człowieka obserwowano wzrost poziomu, a w mózgu szczura obniżenie lub niezmienny poziom we wszystkich badanych okresach (cyt. wg [135]).

Nadmiar podjednostki regulatorowej, obserwowany w niektórych typach nowotworów mózgu pozwala na utrzymanie niskiego poziomu aktywności kinazy A przy wzroście poziomu cAMP [38].

Odnośnie stężenia substratów w mózgu, podczas ontogenezy najczęściej obserwuje się wzrost ilości białek specyficznych podlegających fosforylacji [3, 30], chociaż w niektórych obszarach (hipokamp), czy strukturach subkomórkowych (synapsy) stężenie niektórych białek ulega obniżeniu [66, 136].

Autofosforylacja kinaz białkowych może mieć charakter katalizy wewnątrz- lub międzycząsteczkowej i wywiera różny wpływ na aktywność katalityczną. Na przykład fosforylacja kinazy C, zwiększa powinowactwo do Ca^{2+} i estrów forbolu [137], natomiast w przypadku kinazy zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny typu II eliminuje zależność od wapnia i kalmoduliny tworząc formy autonomiczne [55, 57, 58]. Aktywność tych form zależy od stopnia ufosforylowania, przy czym ATP działa jako modulator allosteryczny i jego stężenie determinuje miejsce podlegające autofosforylacji [57]. Fosforylacja podjednostki regulatorowej (R_{II}), uniemożliwia reasocjację z podjednostką katalityczną i zwiększa powinowactwo do cAMP [3, 5, 8].

Translokacja nie wywołuje oczywiście zmian w samym enzymie, ale stwarza lepsze warunki kontaktu z substratem lub aktywatorem i jest mechanizmem szczególnie ważnym dla zjawisk zachodzących w błonach [71, 74].

Ograniczona proteoliza prowadzi do powstania aktywnych form enzymów, działających w nieobecności właściwych sobie aktywatorów. Proteoliza kinazy C daje fragment 51 kD zwany kinazą M [58]. Z podjednostki regulatorowej R_{II} powstaje fragment 35 kD, wiążący cAMP, ale nie wiążący podjednostki katalitycznej. W obu wypadkach następuje przedłużenie działania aktywnych form enzymów i ze względu na nieodwracalność procesu proteolizy, regulacja poprzez ten mechanizm może mieć miejsce w zjawiskach długo utrzymujących się w synapsach.

V. Uwagi końcowe

Przedstawiony przegląd informacji odnośnie kinaz białkowych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w ontogenezie wskazuje, że w ostatnich latach dokonano znacznego postępu w tej dziedzinie. Między innymi wykazano, że kinazy mózgowe w przeważającej części są specyficznymi formami kinaz występujących w innych tkankach. Specyficzne kinazy mózgowe, a zwłaszcza zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny kinaza typu II oraz kinaza C, występują w stężeniu 10–100 krotnie wyższym niż odpowiadające im formy w tkankach nienerwowych. Kinazy te wykazują dużą heterogenność strukturalną (różną budowę podjednostkową) i

nierównomierne rozmieszczenie (stężenie) w poszczególnych obszarach, przy czym najwyższe stężenia występują w tzw. górnych piętrach OUN. Wykrywano je we wszystkich częściach neuronów z wyraźnym zagęszczeniem kinazy zależnej od cAMP typu II i kinazy C w zakończeniach presynaptycznych, a zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny kinazy typu II w zagęszczeniach postsynaptycznych.

Wykazano, że heterogenność strukturalna, rozmieszczenie i stężenie w poszczególnych obszarach mózgu, a także w różnych częściach neuronów regulowane są w sposób zależny od wieku. W ontogenezie poziom tych kinaz wzrasta, zwłaszcza w okresie intensywnej synaptogenezy, a ponadto następuje przemieszczanie enzymów z frakcji rozpuszczalnej do frakcji związanych z błonami. Stanowi to przykład molekularno-funkcjonalnego dojrzewania neuronów (plastyczności rozwojowej). Z drugiej strony, ogromna heterogenność strukturalna kinazy zależnej od wapnia i kalmoduliny typu II, może stanowić przykład „adaptacji” enzymu do funkcji jaką ma spełniać w różnych neuronach. Wydaje się, że znalezienie specyficznych substratów dla tych izoenzymów, pozwoli na zrozumienie wielu aspektów synaptycznej transmisji.

Badania takie są prowadzone w wielu pracowniach i należy oczekiwać że będą rozszerzone na nowe rodzaje neuronów. Należy również oczekiwać potwierdzenia powszechnego występowania w OUN kinaz nie wykrywanych w tkankach nienerwowych, a znalezionych dotychczas w mózgowiu pojedynczych gatunków.

Składam serdeczne podziękowanie Pani Dr Barbarze Czartoryskiej za cenne uwagi redakcyjne.

Artykuł otrzymano 5 sierpnia 1988 r.
Zaakceptowano do druku 3 lutego 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Korr H., (1980), Proliferation of Different Cell Types in the Brain, str. 1–72, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
2. Żernicki B., (1988), Od neuronu do psychiki, str. 1–130, Wrocław, Warszawa, Kraków, Gdańsk, Łódź.
3. Nestler E. J., Greengard P., (1984), Protein Phosphorylation in Nervous System, red. Wiley, str. 1–398, New York.
4. Nestler E. J., Greengard P., (1983), *Nature*, **305**, 383–388.
5. Nairn A. C., Hemmings H. C., Greengard P., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 931–976.
6. Hunter T., Cooper J. A., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 897–930.
7. Wasterlain C. G., Farber D. B., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1253–1257.
8. Lachowicz L., (1987), *Post. Bioch.*, **33**, 277–295.
9. Tsuyama S., Bramblett G. J., Huang K-P., Flavin M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 4110–4116.
10. Goldenring J. R., DeLorenzo R. J., (1986), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **466**, 457–459.

11. Erondu N.E., Kennedy M.B., (1985), *J. Neurosci.*, **5**, 3270–3277.
12. Hartl F.T., Roskoski R., (1982), *Biochemistry*, **21**, 5175–5183.
13. Kikkawa U., Takai Y., Minakuchi R., Inohara S., Nishizuka Y., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13341–13348.
14. Kelly P.T., Cotman C.W., Largent M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1564–1575.
15. Rubin C.S., Rangel-Aldao R., Sarkar D., Erlichmann J., Fleischer N., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3797–3805.
16. Lohmann S.M., Walter U., Greengard P., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9985–9992.
17. Walter U., Lohmann S.M., Sieghart W., Greengard P., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 12335–12339.
18. Stein J.C., Rubin Ch.S., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10991–10995.
19. Walter U., Knof P., Schulman H., Greengard P., (1978), *J. Biol. Chem.* **253**, 6275–6280.
20. Dunkley P.R., Jarvie P.E., Rostas J.A.P., (1988), *J. Neurochem.* **51**, 57–68.
21. Walaas S.I., Nairn A.C., Greengard P., (1983), *J. Neurosci.*, **3**, 291–301.
22. Walaas S.I., Nairn A.C., Greengard P., (1983), *J. Neurosci.*, **3**, 302–311.
23. Lohmann S.M., Walter U., Greengard P., (1978), *J. Cyclic Nucl. Res.*, **4**, 445–452.
24. Malkinson A.M., Hogy L., Gharrett A.J., Gunderson T.J., (1978), *J. Exp. Zool.*, **205**, 423–432.
25. Schmidt M.J., Truex L.L., Ghetti B., Routtenberg A., (1980), *J. Neurochem.*, **35**, 261–265.
26. Sanecka-Obacz M., (1988), *Acta Physiol. Pol.*, **39**, 143–150.
27. Cumming R., Krigman M.R., Steiner A.L., (1982), *Neurosci. Lett.*, **28**, 247–252.
28. Holmes H., Rodnight R., (1981), *Dev. Neurosci.*, **4**, 79–88.
29. Kelly P.T., (1983), *Brain Res.*, **247**, 85–96.
30. Aoki C., Siekevitz P., (1985), *J. Neurosci.*, **5**, 2465–2483.
31. Ali S.M., Bullock S., Rose S.P.R., (1988), *J. Neurochem.* **50**, 1579–1587.
32. Schlichter D.J., Detre J.A., Aswad D.W., Chehrazi B., Greengard P., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5537–5541.
33. Schlichter D.J., Casallie J.E., Greengard P., (1978), *Nature*, **273**, 61–62.
34. Takahashi S.Y., Mochida S., Kobayashi H., (1988), *J. Neurochem.*, **51**, 1300–1307.
35. Bandle E., Guidotti A., (1979), *J. Neurochem.*, **32**, 1343–1347.
36. Kuo J.F., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2256–2259.
37. Spano P.F., Kumakura K., Govoni S., Trabucchi M., (1975), *Pharmac. Res. Commun.*, **7**, 223–237.
38. Frattola L., Canal N., Ferrarese C., Tonini C., Tonon G., Villani R., Trabucchi M., (1983), *Cancer Res.* **43**, 1321–1324.
39. Alderson R.F., Sze P.Y., (1986), *J. Neurochem.*, **46**, 594–603.
40. Kennedy M.B., Greengard P., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1293–1297.
41. Nairn A.C., Greengard P., (1984), *Fed. Proc.*, **43**, 1467.
42. Huang C.K., Browning M.D., Greengard P., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 6524–6528.
43. Bennett M.K., Erondu N.E., Kennedy M.B., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12735–12744.
44. McGuinness T.L., Lai Y., Greengard P., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1696–1704.
45. Kuret J., Schulman H., (1984), *Biochemistry* **23**, 5495–5504.
46. Kuret J., Schulman H., (1985), *J. Biol. Chem.* **260**, 6427–6433.
47. Goldenring J.R., Vallano M.L., Lasher R.S., Ueda T., DeLorenzo R.J., (1986), *Prog. Brain Res.*, **69**, 341–354.

48. Kelly P. T., Vernon P., (1985), *Dev. Brain Res.*, **18**, 211–224.
49. Quimet C. C., McGuinness T. L., Greengard P., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5604–5608.
50. Suzuki T., Fujii T., Tanaka R., (1987), *J. Neurochem.*, **48**, 1716–1724.
51. Rostas J. A. P., Weinberger R. P., Dunkley P. R., (1986), *Prog. Brain Res.*, **69**, 355–373.
52. Sahyoun N., LeVine H., III, Cuatrecasas P., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4311–4315.
53. Sahyoun N., LeVine H. III, Burgess S. K., Blanchard S., Chang K.-J., Cuatrecasas P., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 878–884.
54. Sahyoun N., LeVine H. III, Bronson D., Siegel-Greensten F., Cuatrecasas P., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1230–1237.
55. Bronstein J. M., Wasterlain C. G., Farber D. B., (1988), *J. Neurochem.* **50**, 1438–1446.
56. Miller S. G., Kennedy M. B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9039–46.
57. Miller S. G., Kennedy M. B., (1986), *Cell* **44**, 861–870.
58. Lou L. L., Lloyd S. J., Schulman H., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9497–9501.
59. Weinberger R. P., Rostas J. A. P., (1986), *Dev. Brain Res.*, **29**, 37–50.
60. Rostas J. A. P., Secombe M., Weinberger R. P., (1988), *J. Neurochem.*, **50**, 945–953.
61. Shearman M. S., Naor Z., Kikkawa U., Nishizuka Y., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 911–919.
62. Huang K. P., Nakabayashi H., Huang F. L., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8535–8539.
63. Huang F. L., Yoshida Y., Nakabayashi H., Huang K. P., (1987), *J. Biol. Chem.* **262**, 15714–15720.
64. Kikkawa U., Ogita K., Ono Y., Asaoka Y., Sherman M. S., Fujii T., Ase K., Sekiguchi K., Igarashi K., Nishizuka Y., (1987), *FEBS Lett.* **233**, 212–216.
65. Nishizuka Y., (1986), *Science*, **233**, 305–312.
66. Worley P. F., Baraban J. M., Snyder S., (1986), *J. Neurosci.*, **6**, 199–207.
67. Kikkawa U., Ono Y., Ogita K., Fujii T., Asaoka Y., Sekiguchi K., Kosaka K., Igarashi K., Nishizuka Y., (1987), *FEBS Lett.*, **217**, 227–231.
68. Kikkawa U., Takai Y., Minakuchi R., Inohara S., Nishizuka Y., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13341–13348.
69. Girard P. K., Mazzei G. J., Kuo J. F., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 370–375.
70. Wood J. G., Girard P. K., Mazzei G. J., Kuo J. F., (1986), *J. Neurosci.*, **6**, 2571–2577.
71. Adamo S., Caporale C., Aguanno S., Lazdins J., Faggioni A., Belli L., Cortesi E., Nervi C., Gastaldi R., Molinaro M., (1986), *FEBS Lett.*, **195**, 352–356.
72. Wolf M., LeVine H., Strtfort M., Jr, Cuatrecasas P., Sahyoun N., (1985), *Nature*, **301**, 621–633.
73. McArdle C. A., Conn P. M., (1986), *Mol. Pharmacol.* **29**, 570–576.
74. Miller R. J., (1986), *Trends in Neurosci.*, **9**, 538–541.
75. DeGraan P. N. E., Oestreicher A. B., Schrama L. H., Gispen W. H., (1986), *Prog. Brain Res.*, **69**, 37–50.
76. Routtenberg A., Nelson R. B., Akers R., Mukarami K., Chan S., Colley P., Lovinger D., (1985), *J. Neurochem.*, **44**, 135
77. Routtenberg A., (1985), *Ann. NY Acad. Sci.*, **444**, 203–209.
78. Akers R. F., Lovinger D. M., Colley P. A., Linden D. J., Routtenberg A., (1986), *Science*, **231**, 587–589.

79. Pfenninger K.H., Hyman C., Garofalo R.S., (1986), *Prog. Brain Res.*, **69**, 235–244.
80. Wise B.C., Anderson R.G.G., Mackerlova L., Raynor R.L., Solomonsson J., Kuo J.F., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 407–413.
81. Turner R.S., Raynor R.L., Mazzei G.J., Girard P.K., Kuo J.F., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3143–3147.
82. Alkazar A., Fando J.L., Azuara C., Galea E., Salinas M., (1986), *Int. J. Devl. Neuroscience*, **4**, 525–535.
83. Benjamins J. A., McKhann G. M., (1981), *Basic of Neurochemistry*, wyd. Siegel G. J., Albers R. W., Agranoff B. W., Katzman R., 445–469, Little, Brown, Boston.
84. Walinder O., (1973), *Biochim Biophys. Acta*, **293**, 140–149.
85. Rodnight R., Lavin B.E., (1984), *Biochem. J.*, **93**, 84–91.
86. Yutani Y., Tei Y., Yukioka M., Inoue A., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 409–420.
87. Hook V. Y. H., Lee N. M., Loh H. H., (1980), *J. Neurochem.*, **34**, 1274–1279.
88. Hook V. Y. H., Stokes K. B., Lee N. M., Loh H. H., (1981), *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2313–2318.
89. Hathaway G. M., Traugh J. A., (1982), *Curr. Top. Cell Reg.*, **21**, 101–127.
90. Runge M. S., El-Maghrabi M. R., Claus T. H., Pilkis S. J., Williams R. C. Jr, (1981), *Biochemistry*, **20**, 175–180.
91. Shecket G., Lasek R. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4788–4795.
92. Julian J. P., Smoluk G. D., Mushynski W. E., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **755**, 25–31.
93. Torn-Delbauffe D., Pierre M., Osty J., Chantoux F., Francon J., (1986), *Biochem. J.*, **235**, 283–289.
94. Wu N. C., Ahmad F., (1984), *Biochem. J.*, **218**, 923–932.
95. Endo T., Hidaka H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 553–558.
96. Turner R. S., Chou C. H. J., Kibler R. F., Kuo J. F., (1982), *J. Neurochem.*, **39**, 1397–1404.
97. Ulmer J. B., Edwards A. M., McMorris F. A., Braun P. E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1748–1755.
98. Miyamoto E., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 573–577.
99. Miyamoto E., Miyzaki K., Hirose R., Kashiba A., (1978), *J. Neurochem.*, **31**, 269–275.
100. Ulmer J. B., Braun P. E., (1984), *Dev. Neurosci.*, **6**, 345–355.
101. Agrawal H. C., Agrawal D., Jenkins R. P., (1986), *Neurochem. Res.*, **11**, 375–382.
102. Ulmer J. B., Braun P. E., (1986), *Dev. Biol.*, **117**, 493–501.
103. Ulmer J. B., Braun P. E., (1986), *Dev. Biol.*, **117**, 502–510.
104. Gurd J. W., (1985), *Brain Res.*, **333**, 385–388.
105. Grab D. J., Carlin R. K., Siekevitz P., (1981), *J. Cell Biol.* **89**, 440–448.
106. Sorensen R. G., Mahler H. R., (1983), *J. Neurochem.*, **40**, 1349–1365.
107. Sanecka-Obacz M., (1980), XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, wrzesień, 1980. Streszczenia str. 243.
108. Sanecka-Obacz M., (1984), XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, wrzesień, 1984, Olsztyn, Streszczenia str. 256.
109. O'Callaghan J. P., Juskevich J., Levenberg W., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 82–89.
110. Sparkman D. R., (1986), *Brain Res.*, **385**, 51–57.
111. Qi D., Turner R. S., Kuo J. F., (1984), *J. Neurochem.*, **42**, 458–465.
112. Qi D., Kuo J. F., (1984), *J. Neurochem.*, **43**, 256–260.
113. Yang S.-D., Fong Y.-L., You J.-S., Liu J.-S., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 7034–7040.
114. Feige J.-J., Chambaz E. M., (1987), *Biochimie*, **69**, 379–385.

115. Rees-Jones R. W., Hendricks S. A., Quarium M., Roth J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3470–3474.
116. Sara V. R., Hall K., Von Holtz H., Humbel R., Sjogren B., Wetterberg L., (1982), *Neurosci. Lett.*, **34**, 39–44.
117. Fallon J., Serogy K. B., Loughlin S. E., Morrison R. S., Bradshaw R., i.w.s.p., (1984), *Science*, **224**, 1107–1109.
118. Huang S. S., Huang J. S., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9568–9571.
119. Lowe W. L., LeRoith D., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 532–538.
120. Shemer J., Raizada M. K., Masters B. A., Ota A., LeRoith D., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 7693–7699.
121. Neer E. J., Lok J. M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6025–6029.
122. Braum S., Ghany M. A., Lettieri J. A., Racker E., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 424–432.
123. Ellis P. D., Bissoon N., Gurd J. W., (1988), *J. Neurochem.*, **51**, 611–620.
124. Cotton P. C., Brugge J. S., (1983), *Mol. Cell Biol.*, **3**, 1157–1162.
125. Skene J. H. P., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 353–354.
126. Sudol M., Hanafusa H., (1986), *Mol. Cell Biol.*, **6**, 2839–2846.
127. Hirano A. A., Greengard P., Hugamir R. L., (1988), *J. Neurochem.*, **50**, 1447–1455.
128. Walaas S. L., Lustig A., Greengard P., Brugge J. S., (1988), *Mol. Brain. Res.*, **3**, 215–222.
129. Pang D. T., Wang J. K. T., Valtorta F., Benefenati F., Greengard P., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 762–766.
130. Sorge L. K., Levy B. T., Maness P. F., (1984), *Cell*, **36**, 249–257.
131. Fults D. W., Towle A. C., Lauder J. M., Maness P. F., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **5**, 27–32.
132. Maness P. F., Sorge L. K., Fults D. W., (1986), *Dev. Biol.*, **117**, 83–89.
133. Parson S. J., Creutz C. E., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 736–742.
134. Aono S., Kato T., Tanaka R., Sato H., Semba R., Kashiwamata S., (1988), *J. Neurochem.*, **50**, 700–703.
135. Gibson G. E., Peterson Ch., (1987), *Neurobiology of Aging*, **8**, 329–343. Pergamon Journals Ltd., USA
136. Benowitz L. I., Routtenberg A., (1987), *Trends Neurosci.*, **10**, 527–532.
137. Huang K. P., Chan K-F, J., Singh T. J., Nakabayashi H., Huang F. L., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 12134–12140.

EMILIA PALEŃ*

Fosfatazy fosfoproteinowe

Phosphoprotein phosphatases

Wykaz stosowanych skrótów; kinaza białkowa A – kinaza zależna od cyklicznego AMP; GSK-3 – kinaza fosforylująca syntazę glikogenu w miejscu 3; PCS_{H,M,L} – fosfatazy stymulowane przez polikationy: odpowiednio formy: H – ciężka, M – średnia, L – lekka; DARPP-32 – rozpuszczalne w kwasie ciepłotrwałe białko cytosolowe o masie 32 kDa, które w komórkach nerwowych ulega fosforylacji stymulowanej dopaminą i cAMP; pp 60^{v-src} – produkt onkogenu wirusa Rousa; EGF-receptor – receptor naskórkowego czynnika wzrostowego.

Poziom fosforylacji każdej fosfoproteiny *in vivo* zależy od aktywności fosforylujących je kinaz białkowych, jak również odpowiednich fosfataz i jest wypadkową działania tych enzymów. Fosfatazy fosfoproteinowe, podobnie jak kinazy, stanowią istotne ogniwo w mechanizmie regulacji licznych procesów komórkowych. Badania ostatnich lat dostarczyły wiele nowych interesujących faktów odnośnie kinaz białkowych. Ciągle brak jest wyczerpujących wiadomości odnośnie fosfataz fosfoproteinowych. Badania nad fosfatazami fosfoproteinowymi rozpoczęły się od prac nad metabolizmem glikogenu. Zagadnienie to zostało przedstawione wcześniej w *Postęпах Biochemii* [1]. Pierwotnie w pracowni Cohena [2, 3, 4] wyróżniono dwa typy tych fosfataz: typ 1-preferencyjnie defosforyluje podjednostkę β kinazy fosforylazy, typ 2 natomiast -podjednostkę α . Ponadto typ 1 hamowany jest przez dwa ciepłotrwałe białka określone jako inhibitor 1 i 2. Stwierdzono jednak w cytoplazmie obecność czterech aktywności fosfatazowych, defosforylujących zarówno reszty serynowe jak i treoninowe. Przebadano szeroki asortyment 13 substratów fosfoproteinowych zaangażowanych w metabolizm glikogenu, w glikolizę, glikoneogenezę, syntezę kwasów tłuszczowych oraz skurcz mięśni, w których 7 różnych kinaz mogło fosforylować 19 reszt serynowych lub treoninowych. W wyniku tej analizy zidentyfikowano 4 fosfatazy mieszczące się w obrębie wspomnianych wyżej dwu typów. W chwili obecnej podział ten pozostaje w dalszym ciągu aktualny. Wiadomości dotyczące właściwości poszczególnych fosfataz zostały jednak znacznie rozszerzone i pogłębione [4]. Wyizolowano i oczyszczono do stanu homogenności podjednostkę katalityczną fosfatazy 1. Jej masę cząsteczkową określono na około 35 kDa. Stwierdzono, że fosfataza 1 może również występować w formie przejściowo nieaktywnej, w postaci kompleksu podjednostki katalitycznej z inhibitorem 2. Aktywacja tej formy fosfatazy 1

* Dr, Zakład Biologii Molekularnej, UMCS ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

Tabela 1

Właściwości podstawowych typów fosfataz fosfoproteinowych

Typ fosfatazy	Masa cząsteczkowa w kDa			Specyficzność wobec kinazy fosforylasy	Efektory
	podjednostka katalityczna	podjednostka regulatorowa	holoenzym		
Fosfataza I	35—37	103	140	podjednostka β	Inhibitor 1 i 2, GSK-3 + Mg^{2+} — ATP
Fosfataza 2A PCS _H PCS _M PCS _L	35—36	62—65	390 240 200	podjednostka α	polikationy ?
Fosfataza 2B	15—19	60—61	80	podjednostka α	Ca^{2+} + kalmodulina
Fosfataza 2C	42—44	nie wykryto	dimer	podjednostka α	Mg^{2+}

W tabeli nie ujęto fosfataz tyrozynowych, mitochondrialnych, „kwaśnych”, „alkalicznych”, ze względu na brak odpowiednich danych.

następuje podczas preinkubacji z Mg^{2+} -ATP w obecności GSK-3. W mięśniach szkieletowych dominującą formą fosfatazy 1 jest kompleks podjednostki katalitycznej z podjednostką G o masie 103 kDa (ang. glycogen – binding subunit), która jest jej podjednostką regulatorową [4].

Inhibitory białkowe 1 [5] oraz 2 [6] z mięśni szkieletowych królika zostały oczyszczone do stanu homogenności. Określono ich struktury pierwszorzędowe. Inhibitor 1 zawiera 165 aminokwasów; jego masa cząsteczkowa wynosi 18,6 kDa. Inhibitor 2 o masie 22,8 kDa zbudowany jest z 203 aminokwasów. Oba są białkami odpornymi na denaturację cieplną, nie tracą aktywności po precypitacji kwasem trójchlorooctowym, jak również w obecności SDS. Dodatkowe podobieństwa między tymi białkami dotyczą: niskiej zawartości aminokwasów hydrofobowych, braku cysteiny, niskich współczynników sedymentacji; nie są one także białkami globularnymi. Inhibitor 1 hamuje aktywność fosfatazy typu 1 po uprzedniej fosforylacji przez kinazę A reszty treoninowej w pozycji 35. Należy podkreślić, że taka sama fosforylacja zachodzi *in vivo* pod wpływem hormonów działających poprzez powstający cAMP. Bardzo podobne pod względem struktury i funkcji do inhibitora 1 jest białko DARPP-32, występujące obficie w tkance nerwowej. Uważa się je za pewną odmianę inhibitora 1. Białko DARPP-32 ulega również fosforylacji przez kinazę A. Stwierdzono 60% identyczności w sekwencji obu białek w regionie decydującym o biologicznej aktywności inhibitora 1. Inhibitor 2 może oddziaływać na fosfatazę 1 w dwojaki sposób. Przy niskich stężeniach inhibitora ($\sim 0,1$ nM) powstaje wspomniany wcześniej kompleks, który ulega reaktywacji w obecności Mg^{2+} i ATP oraz kinazy GSK-3. Aktywacja kompleksu następuje w wyniku fosforylacji specyficznej reszty treoninowej w inhibitorze 2. Jest to pierwszy i jedyny dotąd znany przykład pośredniej aktywacji fosfatazy fosfoproteinowej przez kinazę. Wyższe ($\sim 0,5$ nM) stężenia inhibitora 2 prowadzą do nieodwracalnego zahamowania aktywności fosfatazy 1, przypuszczalnie w wyniku wiązania inhibitora do dodatkowych miejsc enzymu.

Oprócz wspomnianej wyżej regulacji aktywności fosfatazy 1 poprzez fosforylację i defosforylację inhibitorów istnieje możliwość bezpośredniej jej inaktywacji. Stwierdzono, że *in vitro* fosfataza 1 ulega fosforylacji przez pp 60^{V-stc} w obecności Mg^{2+} i ATP w resztach tyrozynowych [7]. Fosforylacja taka prowadzi do utraty aktywności fosfatazy 1. Fizjologiczna rola tej fosforylacji nie jest jeszcze dokładnie określona. Wiadomo, że fosfataza 1 jest enzymem defosforylującym między innymi rybosomalne białko S6 [8]. Jej inaktywacja może zatem zapewnić utrzymywanie znacznej liczby reszt fosforanowych białka S6, fosforylowanego przez swoiste kinazy indukowane przez czynniki wzrostowe i niektóre hormony.

Typ 2 fosfataz obejmuje trzy różniące się między sobą enzymy: 2A, 2B, 2C. Fosfataza 2A daje się rozdzielić chromatograficznie na trzy frakcje. Każda z nich posiada identyczną podjednostkę katalityczną o masie 36 kDa (C) oraz podjednostki (B) o masach 60 kDa lub 54–55 kDa. Typ 2A fosfataz fosfoproteinowych odpowiada fosfatazom PCS_H, PCS_M, PCS_L (ang. polycation – stimulated), wyizolowanym przez grupę M e r l e v e d e [9, 10]. Aktywatorami tych fosfataz są histon H1, protamina, polilizyna oraz spermina.

Fosfataza fosfoproteinowa 2B [11] jest aktywowana przez wapń i kalmodulinę. Stwierdzono jej identyczność z kalcineuryną, która została odkryta wcześniej jako inhibitor fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów. Składa się z dwu podjednostek: α -o masie 60–61 kDa oraz β -o masie 15–19 kDa połączonych w stosunku 1:1. Podjednostka α zawiera domenę wiążącą kalmodulinę; w jej obrębie znajduje się centrum katalityczne. Podjednostka β zawiera cztery domeny wiążące Ca^{2+} homologiczne do regionu wiążącego wapń w kalmodulinie czy troponinie C. N-koniec podjednostki β jest zablokowany przez kwas mirystynowy. Istnieją sugestie, że ta zmiana odgrywa istotną rolę w interakcji enzymu z substratem lub błonami. Kalcineurynę wykryto w wielu różnych tkankach i nie jest ona jak przypuszczano, białkiem występującym jedynie w mózgu. Początkowo sądzono, że kalcineuryna posiada wąską specyficzność substratową. Defosforyluje: inhibitor I, ufosforylowany przez kinazę A, podjednostkę α kinazy fosforylazy oraz łańcuch lekki miozyny. Obecnie wiadomo, że kalcineuryna defosforyluje również podjednostkę regulatorową zależnej od cAMP kinazy typu II. Fosfoproteiny mózgowe: DARPP-32, synapsyna, fosforylowane przez różne kinazy zarówno w resztach serynowych jak i treoninowych są również defosforylowane przez kalcineurynę w obecności Ca^{2+} i kalmoduliny. Kalcineuryna wykazuje również specyficzność w stosunku do reszt fosfotyrozynowych, defosforylując całkowicie receptor naskórkowego czynnika wzrostowego ufosforylowany w resztach serynowych i tyrozynowych. Wykazuje ponadto wysoką aktywność w stosunku do wolnej fosfotyrozyny, podczas gdy fosfoseryna i fosfotreonina są defosforylowane w znacznie mniejszym stopniu. Kalcineuryna jest enzymem wrażliwym na jony metali. Jest metaloenzymem zawierającym dwa typy mocno związanych kationów – Zn^{2+} i Fe^{3+} . Aktywność fosfatazowa kalcineuryny może być regulowana przez jony: Ni^{2+} , Mn^{2+} ; Co^{2+} w różnym stopniu w zależności od substratu. Nie znany jest jednak sposób wiązania tych jonów z enzymem. Kalcineuryna może występować w licznych konformacjach w zależności od rodzaju związanego jonu metalu. Właściwość taka stwarza możliwość regulacji aktywności enzymu w stosunku do różnych substratów. Fosfataza 2B uważana jest obecnie za wielofunkcyjną fosfatazę zależną od wapnia i kalmoduliny. Nie znane są jednak dotąd mechanizmy regulacji oraz jej specyficzności *in vivo*.

Fosfataza fosfoproteinowa 2C [2, 4] jest enzymem wymagającym Mg^{2+} . Jej masa cząsteczkowa wynosi 45 kDa, występuje w postaci dimeru. Wykazuje szeroką specyficzność substratową. Ostatnio fosfataza 2C została wyizolowana zarówno z mięśni jak i z wątroby w postaci izozymów: 2C_1 i 2C_2 o masach cząsteczkowych odpowiednio 44 kDa i 42 kDa [12]. Obie te formy nie są wynikiem proteolitycznej degradacji jednej z nich. Dowodzi tego porównanie map fosfopeptydowych obu izoenzymów. Fosfataza 2C defosforyluje liczne białka, które są również substratami dla fosfatazy 1 oraz 2A. Fosfatazy te różnią się jednak stopniem zapotrzebowania na jony Mg^{2+} oraz szybkością z jaką defosforylują poszczególne substraty.

Omawiane tutaj fosfatazy 2A, 2B i 2C wykrywane są głównie w cytoplazmie. Natomiast 50–60% fosfatazy 1 z mięśni szkieletowych występuje w formie

skompleksowanej głównie z glikoproteinami, fragmentami retikulum oraz w mniejszej ilości z aktyną i miozyną [13]. Istnieje ponadto zróżnicowanie ilościowe poszczególnych fosfatyz w zależności od tkanki. W mięśniach szkieletowych dominuje fosfataza 1; fosfatazy 2A i 2C wykrywane są w znikomych ilościach. Najbogatszym źródłem fosfatazy 2B jest tkanka mózgowa a następnie mięśnie szkieletowe [11, 13]. Fosfatazy: 1, 2A i 2C izolowane z mięśni, mózgu, wątroby i tkanki tłuszczowej różnią się też znacznie swoistą aktywnością [13].

Wyizolowane i oczyszczone zostały również trzy fosfatazy mitochondrialne [14, 15]. Różnią się one znacznie, zarówno strukturą jak również sposobem regulacji, od ich cytoplazmatycznych odpowiedników. Charakteryzują się wysoką specyficznością w stosunku do określonych, właściwych im substratów. Mitochondrialna fosfataza dehydrogenazy pirogronianowej o masie 150 kDa [14] składa się z dwu podjednostek: o masach 97 kDa i 50 kDa. Podjednostka większa jest flawoproteiną i zawiera jeden mol FAD na cząsteczkę. Funkcja FAD nie jest jeszcze określona. Centrum katalityczne zlokalizowane jest w obrębie podjednostki mniejszej wrażliwej na proteolizę. Fosfataza ta jest wysoce specyficzna w stosunku do dehydrogenazy pirogronianowej. Jest niewrażliwa na cytosolowe inhibitory białkowe 1 i 2 oraz kalmodulinę. Fosfataza dehydrogenazy rozgałęzionego 2-ketokwasu (ang. branched-chain 2-oxoacid) występuje w dwu formach: o masie cząsteczkowej 460 kDa oraz 230 kDa [14]. Zawiera podjednostkę katalityczną o masie 33 kDa. Nie defosforyluje fosforylasy a, aktywność jej nie zależy od obecności jonów dwuwartościowych, jest natomiast hamowana przez dwu- i trójfosfonukleotydy, podczas gdy monofosfonukleotydy pozostają bez wpływu. Wyizolowano również mitochondrialny ciepłotrwały inhibitor białkowy o masie 33–36 kDa wysoce specyficzny dla tej fosfatazy. Inhibitor ten nie hamuje cytosolowych fosfatyz 1 oraz 2A. Hamujący wpływ mitochondrialnego inhibitora białkowego może być odwracany przez poliaminy w obecności Mg^{2+} . Z mitochondriów nerki wołu wyizolowano również aktywność fosfatyzową o masie 140–170 kDa [15]. Fosfataza ta jest niezależna od jonów dwuwartościowych, ulega stymulacji pod wpływem sperminy i wykazuje specyficzność w stosunku do dwu wyżej omawianych substratów dla fosfatyz mitochondrialnych. Wykazuje pewne podobieństwo do fosfatazy 2A.

Fosfatazy fosfoproteinowe można też pogrupować ze względu na defosforylowaną resztę aminokwasową w następujący sposób [16]:

- a) defosforylujące fosfoserynę/fosfotreoninę,
- b) defosforylujące fosfotyrozynę,
- c) defosforylujące fosfotyrozynę i / lub fosfoserynę,

Do grupy defosforylującej fosfoserynę/fosfotreoninę należą fosfatazy wcześniej przedstawione: fosfataza 1, 2A, 2B, 2C. Informacje o fosfatyzach specyficznych w stosunku do fosfotyrozyny są ciągle niewystarczające ażeby je klasyfikować. Obecność ich stwierdzono w cytoplazmie jak również we frakcji błonowej, skąd mogą być uwalniane w wyniku proteolizy. Jest to interesująca grupa fosfatyz, a ich lokalizacja w błonach wskazuje na możliwość udziału tych enzymów w defosforylacji receptorów *in vivo* [17].

Ostatnia z wymienionych grup obejmuje „kwaśne” i „alkaliczne” fosfatazy, które w świetle ostatnich badań defosforylują również wydajnie substraty białkowe [16, 18].

Fosfatazy fosfoproteinowe defosforylujące reszty serynowo/treoninowe w naturalnych substratach komórek organizmów wyższych wykazują optimum aktywności w odczynie obojętnym [13]. Fosfatazy fosfotyrozynowe natomiast preferują odczyn lekko alkaliczny (pH 8,5–9,0) [19].

Specyficzność substratową fosfataz (podobnie jak kinaz), można rozpatrywać na różnych poziomach [16]. Może być ona determinowana już przez kompartmentację subkomórkową. Zmiany konformacji substratów mogą też prowadzić do wyekspozowania bądź maskowania specyficznych miejsc rozpoznawanych przez odpowiednie fosfatazy. O specyficzności fosfataz może również decydować struktura pierwszorzędowa substratu oraz rodzaj fosfoaminokwasu. Badania specyficzności fosfataz przy użyciu odpowiednich fosfopochodnych syntetycznych peptydów podjęto w pracowni P i n n y [16]. Ogólne informacje jakie uzyskano można przedstawić następująco:

1. Inne determinanty struktury pierwszorzędowej decydują o specyficzności fosfataz fosfoproteinowych a inne kinaz.

2. Potwierdziła się generalna zasada, że fosfatazy fosfoproteinowe są enzymami o szerszej specyficzności aniżeli kinazy białkowe.

3. Zaobserwowano, że w przypadku fosfataz 1 i 2A najkrótszym rozpoznawanym fosfopeptydem jest tetrapeptyd z seryną w pozycji drugiej (X-Ser (P)-Y-Z); świadczyło to, iż pewne strukturalne właściwości w sąsiedztwie miejsca defosforylacji odgrywają istotną rolę.

Badania te [16] doprowadziły do ogólnej konkluzji, że o specyficzności fosfataz fosfoproteinowych mogą decydować struktury wyższych rzędów, i to zarówno substratu jak i enzymu. W przypadku fosfataz fosfoproteinowych, fakt ten wydaje się odgrywać rolę bardziej istotną aniżeli dla kinaz.

Liczba zidentyfikowanych fosfataz fosfoproteinowych jest znikoma w porównaniu z ilością kinaz. Jednak pozornie mało specyficzne, wielofunkcyjne fosfatazy fosfoproteinowe są w stanie zapewnić przeciwwagę dla różnorodnych procesów fosforylacji dzięki złożonym procesom regulacji. Mechanizm regulacji fosfataz fosfoproteinowych w dalszym ciągu wymaga badań.

Artykuł przygotowano w ramach prac finansowanych przez CPBR 3.13. RB-II-13.

Artykuł otrzymano 15 sierpnia 1988 r.
Zaakceptowano do druku 12 stycznia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Kuźnicki J., Famulski K. S., (1986), *Post Biochem.*, **32**, 285–299.
2. Ingebritsen T. S., Cohen P., (1983), *Science*, **221**, 331–338.
3. Cohen P., (1982), *Nature*, **296**, 613–620.
4. Cohen P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **151**, 439–448.
5. Aitken A., Bilham T., Cohen P., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **126**, 235–246.

6. Holmes Ch. F. B., Campbell D. G., Caudwell F. B., Aitken A., Cohen P., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **155**, 173–182.
7. Johansen J. W., Ingebridsen T. S., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 207–211.
8. Andres J. L., Johansen J. W., Maller J. L., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 14389–14393.
9. Waelkens E., Goris J., Merlevede W., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1049–1059.
10. Waelkens E., Goris J., Merlevede W., (1987), *Biochem. Int.* **15**, 385–393.
11. Pallen C. J., Wang J. H., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 281–291.
12. Mc Gowan C. H., Cohen P., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **166**, 713–722.
13. Ingebritsen T. S., Stewart A. A., Cohen P., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **132**, 297–307.
14. Bradford A. P., Yeaman S. J., (1986), *Adv. Prot. Phosphatases*, **3**, 73–106.
15. Damuni Z., Reed L. J., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 5133–5138.
16. Pinna L. A., Agostinis P., Ferrari S., (1986), *Adv. Prot. Phosphatases*, **3**, 327–368.
17. Rotenberg S. A., Brautigan D. L., (1987), *Biochem. J.*, **243**, 747–754.
18. Holzer H., (1987), *Adv. Prot. Phosphatases*, **4**, 153–164.
19. Li H.-C., (1982), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **21**, 129–174.

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE
 THE JOURNAL OF THE

DISCUSSION

- 1. K. J. ...
- 2. ...
- 3. ...
- 4. ...
- 5. ...

WŁODZIMIERZ S. OSTROWSKI*

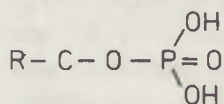
Mechanizm transfosforylacji w katalizie niespecyficznych fosfomonoesteraz

Mechanism of transphosphorylation in the reaction catalysed by nonspecific phosphomonoesterases.

Ortofosforan występuje we wszystkich żywych komórkach. Jego swoiste własności chemiczne wykorzystywane są przez wszystkie organizmy dla wytwarzania związków o różnej reaktywności, stabilności i biologicznej funkcji. Dlatego estry, bezwodniki fosforanowe i połączenia fosfoamidowe dominują we wszystkich ustrojach żywych. Estry fosforanowe są istotnymi pośrednikami w biologicznych syntezach i w procesach degradacji, posiadają zasadnicze znaczenie we wszystkich praktycznie procesach metabolicznych. Czym można uzasadnić tę dominującą rolę fosforanów w procesach biologicznych?

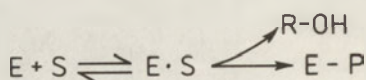
Jedną z przyczyn, dla której natura wybrała fosforan do pełnienia tak ważnych funkcji biologicznych jest fakt, że pK_1 kwasu fosforowego, a także fosfomono- i fosfodwuestrów ma wartość ok. 2,0 co powoduje, że wszystkie związki fosforanowe w pH fizjologicznym są zjonizowane [1]. Dzięki temu są utrzymywane w obrębie komórki i nie mogą swobodnie dyfundować poprzez błony komórkowe. Związki elektrycznie obojętne posiadają stosunkowo znaczną rozpuszczalność w tłuszczach i łatwo dyfundują poprzez błony komórkowe.

Transport, szybkość przemian oraz efektywność metaboliczna fosforanu i jego pochodnych ściśle zależy od aktywności między innymi fosfomono- i fosfodwuestrów, enzymów, które potocznie nazywamy kwaśnymi i alkalicznymi fosfatazami. Obie grupy enzymów posiadają zdolność rozszczepiania wiązania fosforanowego niskodrobinowych estrów, w fosfoproteinach, w oligo- i polinukleotydach (Wzór I). Stąd fosfatazy są szeroko rozpowszechnione w świecie żywym i występują we wszystkich organizmach.

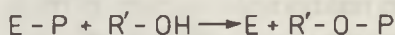


* Prof. dr med. hab., Instytut Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej im. M. Kopernika, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków

Prawie wszystkie niespecyficzne fosfomonoesterazy wykazują zdolność przenoszenia reszt fosforanowych z substratu na odpowiedni akceptor a zatem katalizują reakcje transfosforylacji oprócz reakcji hydrolizy. Natomiast fosfomonoesterazy o wąskiej specyficzności substratowej tej właściwości nie posiadają [2]. Analizując wyniki kinetycznych badań nad alkaliczną fosfatazą *E. coli*, L a z d u n - s k i i w s p. [3] przedstawili koncepcję duw etapowej reakcji hydrolizy estrów fosforanowych katalizowanej przez ten enzym. W pierwszym etapie zachodzi uwolnienie części alkoholowej substratu i utworzenie fosforyloenzymu jako przejściowego pośrednika, który w drugim etapie reakcji ulega hydrolizie w obecności cząsteczki wody lub stosowanego akceptora (Reakcja 1 i 2):



Reakcja 1. Powstawanie fosforylo-enzymu.



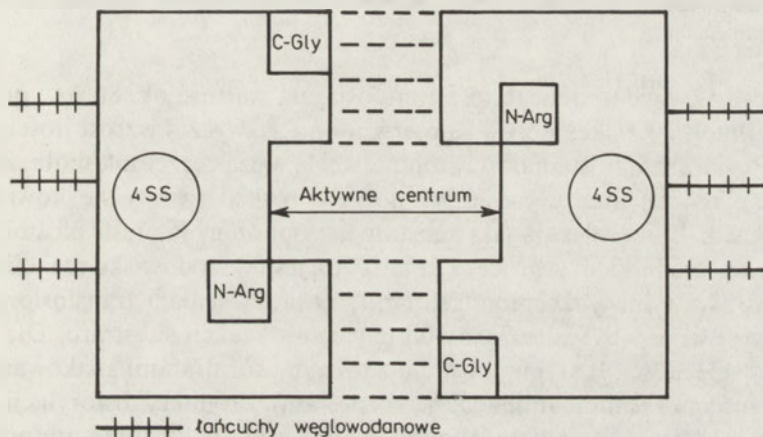
Reakcja 2. Przeniesienie ortofosforanu na zewnętrzny akceptor.

Powyższy schemat reakcji postuluje zatem udział kowalencyjnego pośrednika E-P, który ulega następnie hydrolizie w drugim etapie, co prowadzi do powstania ortofosforanu względnie nowego estru, kiedy akceptorem fosforanu jest alkohol. Jak to zobaczymy później zaproponowany schemat reakcji okazał się słuszny zarówno w przypadku alkalicznych jak i kwaśnych fosfomonoesteraz charakteryzujących się szeroką swoistością substratową.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się poznaniu mechanizmu katalizy kwaśnych fosfataz, które w aspekcie transfosforylacji różnią się istotnie od analogicznych enzymów działających w pH zasadowym. Jako enzymy modelowe do badań w tym zakresie wykorzystywano kwaśną fosfatazę kielków pszenicy, wątroby szczura [4] oraz ludzkiego gruczołu krokowego [5].

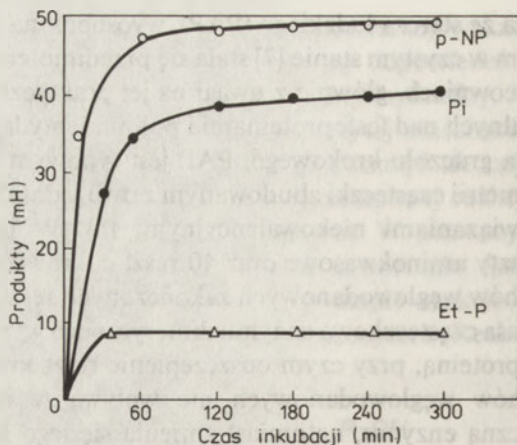
W ludzkich tkankach występują kwaśne fosfatazy różniące się lokalizacją, właściwościami fizykochemicznymi i katalitycznymi. Są to kw. fosfataza erytrocytów, lizosomalna fosfataza, fosfataza związana z błonami plazmatycznymi oraz fosfataza prostatowa. Każdy powyższy typ kwaśnej fosfatazy posiada charakterystyczne spektrum izoenzymowe, odmienne właściwości immunologiczne i jest kodowany przez odrębny gen. Pośród wszystkich fosfataz kwaśnych z ludzkich tkanek tylko fosfataza ze stercza jest enzymem sekrecyjnym, wydzielanym do płynu nasiennego. Jest produkowana przez gruczołowe komórki nabłonkowe i może być łatwo wykazana metodami immunohistochemicznymi. Stężenie enzymu w gruczole krokowym i w płynie nasiennym jest bardzo wysokie, ok. 1000 razy wyższe niż stężenie innych kwaśnych fosfataz w pozostałych tkankach ludzkich [6].

Kwaśna fosfataza ze sterca ludzkiego (PAP), wyosobniona po raz pierwszy w naszym laboratorium w czystym stanie [7] stała się przedmiotem licznych studiów także w innych pracowniach, głównie z uwagi na jej praktyczne zastosowanie w badaniach strukturalnych nad fosfoproteinami i polinukleotydami oraz w klinicznej diagnostyce raka gruczołu krokowego. PAP jest typowym białkiem globularnym o miernej asymetrii cząsteczki zbudowanym z dwu jednakowych podjednostek powiązanych wiązaniami niekowalencyjnymi [8]. W podjednostce PAP znajdują się 382 reszty aminokwasowe oraz 40 reszt cukrowych wchodzących w skład trzech łańcuchów węglowodanowych zakończonych resztą kwasu neuraminowego (Ryc. 1). Masa cząsteczkowa enzymu dimerycznego wynosi 100 kDa. PAP jest więc sjaloglikoproteiną, przy czym odszczepienie reszt kwasu sjalowego lub wszystkich łańcuchów węglowodanowych nie wpływa w istotny sposób na aktywność katalityczną enzymu, natomiast zmienia się jego konformacja przez wzrost formy helikalnej cząsteczki białka.



Ryc. 1. Schematyczny obraz dimerycznej cząsteczki kwaśnej fosfatazy sterca ludzkiego; linie przekreślone oznaczają łańcuchy oligosacharydowe.

W naszych badaniach nad reakcją transfosforylacji istotne było poznanie sekwencji poszczególnych etapów w procesie przeniesienia fosforanu z substratu na stosowny akceptor i w przypadku powstawania kowalencyjnego intermedyatu E-P, wyodrębnienie go. Ilość przeniesionego fosforanu można m.in. określić na podstawie różnicy uwolnionego nieograniczonego fosforanu i części alkoholowej substratu podczas jego hydrolizy w obecności zewnętrznego akceptora fosforanu. W przypadku, kiedy nie zachodzi proces transfosforylacji, ilość Pi i uwolnionego alkoholu w różnych czasach inkubacji enzymu z substratem i akceptorem winna być taka sama. Jednak w naszych doświadczeniach z p-nitrofenylofosforanem jako substratem i etanolem jako akceptorem Pi, ilość p-nitrofenolu uwalnianego podczas reakcji była systematycznie wyższa niż ilość uwalnianego do roztworu Pi (Rys. 2). Stwierdzono także, że zakres transfosforylacji nie zależy od rodzaju donora fosforanu, natomiast w istotny sposób zależy od przejmującego fosforan



Ryc. 2. Analiza produktów reakcji kwaśnej fosfatazy sterca ludzkiego podczas inkubacji enzymu z p-nitrofenylofosforanem (p-NP) jako substratem i etanolem jako zewnętrznym akceptorem fosforanu. Et-P, fosforan etanolu [5].

alkoholu. Ilość przeniesionego fosforanu osiągała wartość ok. 80% w przypadku różnych glikoli jako akceptorów i obserwowano zazwyczaj wzrost ilości przeniesionego Pi wraz ze wzrostem ilości atomów węgla w cząsteczce alkoholu. Powyższe obserwacje można interpretować, że podczas reakcji tworzy się kowalencyjny intermediat E-P, niezależnie jaki substrat jest donorem Pi. Jeśli ufosforylowany enzym jest pośrednikiem w procesie katalizy to, jeśli w środowisku reakcji znajduje się oprócz wody inny akceptor fosforanu, stosunek reakcji transfosforylacji do hydrolizy powinien być niezależny od użytego w reakcji substratu. Dla prześledzenia tej zależności, PAP inkubowano z różnymi substratami znakowanymi ^{32}P , oraz z etanolem i etanoloaminą jako akceptorami. Produkty fosforylacji analizowano za pomocą chromatografii jonowymiennej w analizatorze aminokwasów, dzięki czemu etylofosforan względnie O-fosforyloetanolamina mogły być całkowicie oddzielone od nadmiaru substratu i nieograniczonego fosforanu. Analizę produktów reakcji przeprowadzono po osiągnięciu stałego stosunku reakcji transfosforylacji do reakcji hydrolizy (tj. ilości ufosforylowanego akceptora do zhydrolizowanego substratu), co osiągnęto po czasie 30–60 min. Z tabeli 1 widać, że w przypadku etanolu stosunek ten wynosi ok. 0,25, a w przypadku etanoloaminy 0,044 niezależnie od użytego substratu. Stały stosunek alkohololizy do hydrolizy sugeruje, że w reakcji bierze udział wspólny intermediat i że grupa chemicznie różnych substratów daje takie same wyniki z akceptorami (etanol, etanoloamina) o całkowicie różnej wydajności reakcji transfosforylacji. Z powyższych danych wynika również, że PAP dyskryminuje wodę jako akceptor fosforanu, gdyż zakres transfosforylacji jest stosunkowo wysoki mimo, że woda wielokrotnie przewyższa molarne stężenie akceptora w środowisku reakcji. Wskazywało to również na hydrofobowy charakter aktywnego centrum PAP, o czym będzie mowa później.

Celem wykazania udziału pośrednika E-P w reakcji katalitycznej PAP podjęto szereg prób nad chemiczną modyfikacją enzymu oraz jego fosforylacją w odmienn-

Tabela 1

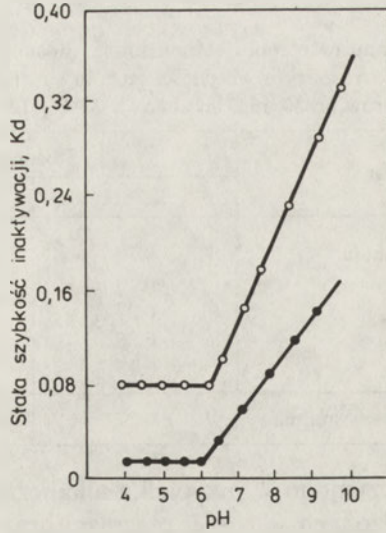
Przeniesienie fosforanu na etanol i etanoloaminę. Stosunek molowy reakcji transfosforylacji do hydrolizy w obecności etanolu i etanoloaminy jako zewnętrznych akceptorów po 30 min. inkubacji w 37°C [5].

Substrat	Stosunek	
	Etanol	Etanoloamina
Fosforan p-nitrofenolu	0.30	0.044
Fosforan fenolu	0.26	0.044
3'-UMP	0.27	—
3'-AMP	0.30	0.046
β -Glicerofosforan	0.23	0.041
średnia	0.27	0.044

nych warunkach niż to czyniono w przypadku alkalicznych fosfatyz. Z szeregu doświadczeń przeprowadzonych w naszej pracowni oraz w innych można było wnosić, że takie aminokwasy jak tyrozyna, tryptofan, cysteina, lizyna i seryna nie biorą bezpośredniego udziału w mechanizmie katalizy. Inaktywacja PAP przez działanie monochlorku jodu względnie N-bromobursztynimidu była związana z modyfikacją reszt tyrozynowych i tryptofanowych [9, 10], lecz te aminokwasy przypuszczalnie raczej tworzą środowisko hydrofobowe wokół aktywnego centrum, dzięki czemu może tworzyć się łatwiej kompleks enzym-substrat, natomiast nie biorą bezpośredniego udziału w reakcji katalitycznej. Traktowanie PAP JCl lub N-bromobursztynimidem prowadziło także do modyfikacji reszt histydynowych, co sugerowało ew. udział tego aminokwasu w katalitycznej reakcji enzymu. Przeważało w dalszych naszych pracach nad strukturą aktywnego centrum PAP skoncentrowano uwagę nad rolą tego aminokwasu w mechanizmie reakcji.

Najpierw podjęto badania nad fotooksydacją enzymu w obecności błękitu metylenowego i różu bengalskiego jako uczulaczy. Oba barwniki w stężeniu ok. 0.1 mg/ml przy naświetleniu powodowały nieodwracalną inaktywację PAP. Obecność substratu lub kompetytywnego inhibitora chroniła enzym przed inaktywacją. Przebieg fotooksydacji w zależności od pH wykazywał charakterystyczne załamanie krzywej przy pH ok. 6.0, (Ryc. 3) co jest zgodne z wartością pK_A 6.5 reszt histydylowych znajdowaną w innych białkach [11]. Analiza składu aminokwasowego fotolitycznie zmodyfikowanego enzymu wskazywała jednoznacznie, że głównie reszty histydynowe ulegały w tych warunkach modyfikacji, średnio 19 reszt na mol białka enzymu. Podobne wyniki uzyskano kiedy PAP inkubowano z dwuetylopyrokarbonianem w roztworze o pH 6.0. Charakterystyczna zmiana widma przy 242 nm karbetoksylovanego enzymu wskazywała na modyfikację reszt histydynowych, której towarzyszył równoległy spadek aktywności katalitycznej.

Dalszym potwierdzeniem istotnej funkcji reszt histydynowych w reakcji katalitycznej PAP było działanie żelazianu na aktywność enzymu. Żelazian, K₂FeO₄, jest strukturalnym analogiem ortofosforanu i równocześnie silnie działa-



Ryc. 3. Przebieg fotooksydacji kwaśnej fosfatazy sterca ludzkiego w zależności od pH [11], w obecności rózu bengalskiego (kółka jasne) i błękitu metylowego (kółka ciemne).

jącym utleniaczem reszt aminokwasowych zaangażowanych w wiązanie substratu z enzymem [12]. Potraktowanie PAP żelazianem przy pH 5.0 prowadziło do natychmiastowej i nieodwracalnej utraty aktywności enzymu. Inaktywacji towarzyszyła modyfikacja dwóch reszt histydynowych, czterech lizynowych i czterech metioninowych. Utlenienie reszt histydynowych było blokowane przez molibdenian jako kompetytywny inhibitor, podczas gdy pozostałe aminokwasy były ochraniane tylko częściowo (lizyna) względnie, jak w przypadku metioniny, wpływ inhibitora jest niewidoczny (Tab. 2).

Tabela 2

Utlenianie PAP żelazianem potasu. Porównanie składu aminokwasowego PAP przed i po utlenieniu żelazianem, w obecności i nieobecności inhibitora kompetytywnego [12].

Aminokwas	Enzym natywny	Enzym utleniony żelazianem	Enzym utleniony żelazianem w obecności molibdenianu
	Ilość reszt aminokwasowych na mol PAP		
Metionina	19.7	15.3	15.8
Lizyna	44.3	40.3	42.0
Histydyna	28.0	26.2	27.8

Celem potwierdzenia powyższych obserwacji wskazujących na istotny udział reszt histydynowych w katalitycznej funkcji PAP, enzym fosforylowano w środowisku alkalicznym za pomocą [^{32}P]-p-nitrofenylofosforanu a następnie hydrolizowano w roztworze 3 M KOH [13]. W środowisku kwaśnym szybkość

defosforylacji przewyższa znacznie szybkości fosforylacji enzymu, przeto fosforyloenzym w takich warunkach nie daje się uchwycić. Alkaliczny hydrolyzaty fosforyloenzymu rozdzielano na kolumnie z Dowex 1 × 8 i wydzielony radioaktywny produkt zidentyfikowano jako 3-fosfohistydynę.

Z doświadczeń z radioaktywnym substratem wynikają następujące stwierdzenia:

a) Fosforylacja enzymu zachodzi tylko w środowisku zasadowym, przy pH 8,0 lub wyższym i fosforyloenzym można wyizolować po zatrzymaniu reakcji za pomocą roztworu silnie alkalicznego.

b) W powyższych warunkach ok. 1 mol ^{32}P wiąże się z 1 molem enzymu. (Tab. 3).

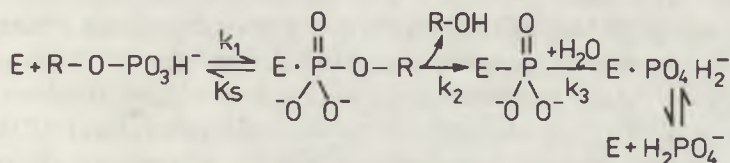
c) Po hydrolyzie [^{32}P]-enzymu w 3 M KOH, jedynym radioaktywnym aminokwasem, który można wykryć i wyizolować jest fosfohistydyna.

Tabela 3

Fosforylacja PAP w zależności od pH. Inkorporacja ^{32}P do PAP po inkubacji enzymu z p-nitrofenylo- ^{32}P -fosforanem, przy pH 7.5 oraz pH 8.5 [13].

pH	^{32}P wbudowany (moli/mol enzymu)
7.5	0.60
8.5	0.71

Mc Tigue i van Etten [14] wykazali, że cykloheksanedion modyfikuje reszty arginyłowe PAP i kiedy dwie grupy arginyliny na cząsteczkę dimeru są zablokowane, enzym traci całkowicie aktywność katalityczną. Autorzy sugerują przeto, że, podobnie jak i w przypadku alkalicznej fosfatazy wyosobnionej z różnych źródeł, pozytywnie naładowane reszty arginyłowe stanowią miejsce wiązania negatywnie naładowanych grup fosforanowych cząsteczki substratu. Tego typu oddziaływania elektrostatyczne ulegają aktywacji w środowisku o niższej stałej dielektrycznej, co obserwowano przy badaniu aktywności PAP w obecności rozpuszczalników organicznych [15]. Biorąc powyższe dane pod uwagę przebieg reakcji katalizowanej przez PAP można przedstawić następująco (Reakcja 3):

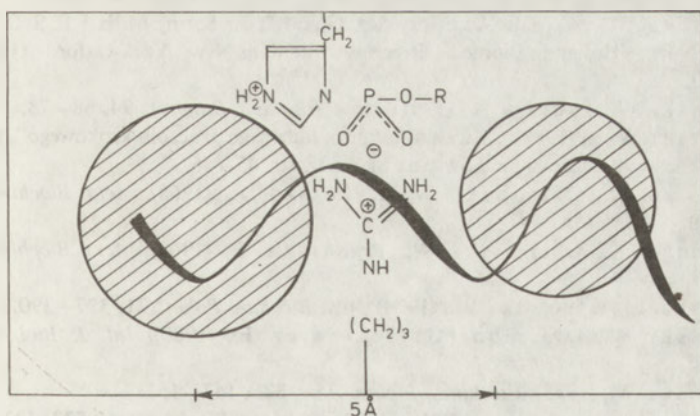


Reakcja 3. Schemat fosforylacji enzymu i przeniesienia fosforanu na cząsteczkę wody.

Z powyższym zagadnieniem wiąże się także zmiana konfiguracji atomu fosforu podczas reakcji transfosforylacji. Saini i wsp. [16] rozwiązali ten problem stosując znakowanie tlenu fosforanowej części cząsteczki substratu różnymi izotopami tlenu, tj. ^{16}O , ^{17}O i ^{18}O . Z ich badań wynika, że atom fosforu podczas reakcji katalitycznej podlega parzystej ilości przemieszczeń, z równoczesnym odwróceniem, co oznacza dwukrotne odwrócenie atomu P i utworzenie pojedynczego pośrednika P-E. Zatem przy całkowitym przebiegu reakcji atom fosforu zachowuje ostatecznie wyjściową konfigurację.

PAP defosforyluje wszystkie znane nukleotydy, jakkolwiek z różną szybkością. Najszybciej defosforyluje pirymidynowe nukleotydy, przy czym dezoksy- są defosforylowane szybciej niż rybonukleotydy oraz 3'-fosfonukleozydy szybciej niż 5'-fosfonukleozydy [17]. Ponieważ nukleotydy występują w konformacji **anti** i **syn** istotnym było sprawdzenie zachowania się enzymu w stosunku do obu form konformacyjnych nukleotydów. W tym celu użyto 5'-fosfonukleozydów purynowych i ich pochodnych jako substratów. Z badań tych wynika, że PAP nie rozpoznaje konformacji anti i syn i obie formy izomeryczne nukleotydów są defosforylowane jednakowo aktywnie [18].

Jak wspomniano wcześniej przy omawianiu własności transfosforylacyjnej, w obecności zewnętrznego akceptora fosforanu, PAP dyskryminuje w znacznym stopniu wodę mimo molarnej przewagi tego odbiorcy rodnika fosforanowego w środowisku reakcji. Wskazywało to na hydrofobowy charakter powierzchni cząsteczki w pobliżu aktywnego centrum enzymu. Celem wykazania centrów hydrofobowych w PAP zastosowano sondy hydrofobowe, kwas 1-anilino-8-naftalenosulfonowy (ANS) oraz zielen indocyjaninową (ING) w stosowanych warunkach [19]. Interakcję enzymu z wymienionymi substratami można śledzić przez wzrost natężenia fluorescencji i przesunięcia maksimum widma emisyjnego (ANS), względnie przez zmianę absorpcji przy 780 nm (ING). W obu przypadkach enzym był hamowany kompetytywnie, przy czym charakter kompetytywny



Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie przypuszczalnej struktury aktywnego centrum kwaśnej fosfatazy stercza ludzkiego. Pola zakreślowane oznaczają regiony hydrofobowe.

hamowania obserwowano zarówno w stosunku do substratów jak i kompetywnych inhibitorów, tj. winianu, fluorku i molibdenianu. Na podstawie analizy krzywych Scatcharda ustalono, że enzym posiada dwa odrębne centra hydrofobowe na powierzchni cząsteczki białka, jedno o wartości $K_d = 6.7 \times 10^{-6}$ M i drugie o wartości $K_d = 1.0 \times 10^{-5}$ M. Stanowią one jeden z elementów strukturalnych mikrośrodowiska otaczającego aktywne centrum, którego obraz wyłania się z licznych badań kinetycznych, spektralnych i różnych danych fizykochemicznych.

Fragment polipeptydu stanowiący aktywne centrum posiada konformację helikalną z silnie pozytywnym ładunkiem pochodzącym od reszty argininowej. Ładunek pozytywny dominuje w zakresie pH 4.6–5.0, tj. w punkcie izoelektrycznym i optymalnej aktywności enzymu. Przy tym pH PAP wykazuje również najwyższą termostabilność. W pobliżu reszty argininowej zlokalizowany jest pierścień imidazyłowy histydyny, (Ryc. 4) który, jak wykazano, pełni zasadniczą funkcję w mechanizmie reakcji katalitycznej. Obraz struktury aktywnego centrum PAP uzupełniają dwa regiony hydrofobowe o różnej sile wiązania zlokalizowane w pobliżu aktywnego centrum, które pełnią istotną rolę przy właściwym dopasowaniu się części rodnikowej substratu z aktywnym centrum enzymu.

Artykuł otrzymano 30 czerwca 1988 r.
Zaakceptowano do druku 3 stycznia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Westheimer F. H., (1987), *Science*, **235**, 1173–1178.
2. Hollander V. P., w „The Enzymes”, P. D. Boyer (wyd.), wyd. III, 1971, t.4, str. 449–498.
3. Lazdunski C., Peticlerc C., Chappellet D., Lazdunski M., (1969), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 744–751.
4. Reid T. W., Wilson I. B. w „The Enzymes”, P. D. Boyer (wyd.), wyd. III, 1971, t.4, str. 373–415.
5. Ostrowski W., Barnard E. A., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3893–3898.
6. Ostrowski W., w „Male Accessory Sex Glands”, E. Spring-Mills i E. S. E. Hafez (wyd.), Elsevier-North Holland Biomed. Press, Amsterdam-New York-Oxford (1980), t.4, str. 197–213.
7. Ostrowski W., Tsugita A., (1961), *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 68–78.
8. Ostrowski W. S., (1988), „Kwaśna fosfataza ludzkiego gruczołu krokowego”, Ossolineum – PAN, Wrocław-Warszawa-Kraków-Gdańsk-Łódź, str. 45–46.
9. Bobrzecka K., Ostrowski W., Rybarska J., (1968), *Acta Biochim. Polon.*, **15**, 369–379.
10. Bobrzecka K., Ostrowski W., Rybarska J., (1969), *Acta Biochim. Polon.*, **16**, 11–15.
11. Rybarska J., Ostrowski W., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21**, 377–390.
12. Ostrowski W., Dziembor-Gryszkiewicz E., (1980), *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 241–244.
13. Ostrowski W., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 147–153.
14. Mc Tigue J. J., van Etten R. L., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 422–429.
15. Ostrowski W. S., (1983), *Progr. Clin. Enzymol.*, **2**, 141–155.

16. Saini M. S., Buchwald S. L., van Etten R. L., Knowles J. R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10453–10455.
17. Dziembor E., Ostrowski W., (1971), *Acta Biochim. Polon.*, **18**, 249–260.
18. Dziembor-Gryszkiewicz E., Fikus M., Kazimierczuk Z., Ostrowski W., (1978), *Bull. Acad. Polon. Sci.*, Cl. II, 26, 815–821.
19. Dziembor-Gryszkiewicz E., (1981), *Bull. Acad. Polon. Sci.*, Cl. II, **28**, 427–432.

GRAŻYNA MUSZYŃSKA*

Rozdział fosfoprotein na unieruchomionych jonach żelazowych

Separation of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate

Spis treści:

- I. Chromatografia powinowactwa na unieruchomionych jonach metali, wprowadzenie
- II. Powinowactwo białek do unieruchomionych dwuwartościowych jonów metali
- III. Powinowactwo białek do unieruchomionych jonów żelazowych
 - III-1. Selektywny rozdział enzymatycznie fosforylowanych form białek
 - III-2. Zróżnicowany rozdział fosfoprotein z kompleksów lipidowo-białkowych
 - III-3. Możliwość izolacji fosfoprotein i kwasów nukleinowych z homogenatów tkanek zwierzęcych i roślinnych
 - III-4. Oddziaływania odpowiedzialne za wiązanie białek z unieruchomionymi jonami żelazowymi
- IV. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Immobilized metal affinity chromatography
- II. Affinity of proteins to immobilized divalent metal ions
- III. Affinity of proteins to gel-immobilized ferric chelate
 - III-1. Selective separation of enzymatically phosphorylated proteins
 - III-2. Differential separation of phosphoproteins from lipoprotein complexes
 - III-3. Possibility of isolation phosphoproteins and nucleic acids from crude extracts of animal and plant tissues
 - III-4. Interactions responsible for binding of proteins on gel-immobilized ferric chelate
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: IMAC – chromatografia powinowactwa na unieruchomionych jonach metalu, IDA – kwas iminodwuoctowy, TED – tris (karboksymetyl) etylenodwuamina.

I. Chromatografia powinowactwa na unieruchomionych jonach metali (IMAC)

Metale grupy przejściowej tworzą względnie trwałe kompleksy z niektórymi wolnymi aminokwasami oraz ich reaktywnymi ugrupowaniami w białkach [1].

* Doc. dr hab., Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

Wykorzystując te właściwości P o r a t h i w s p. [2] opracowali technikę chromatograficznego rozdziału zarówno białek jak i innych makrocząsteczek. Zasadą tej metody jest unieruchomienie określonego jonu metalu na nierozpuszczalnym podłożu poprzez związek chelatujący metal. Metoda ta została nazwana [3] chromatografią powinowactwa* na unieruchomionych jonach metalu (z ang. Immobilized Metal Affinity Chromatography – IMAC). Warunki, których spełnienie jest niezbędne do prawidłowej adsorpcji białek na IMAC są następujące:

- właściwy, obojętny, hydrofilny, trwały nośnik;
- odpowiednia metoda aktywacji nośnika;
- stabilne i selektywne ligandy wiążące jony metalu;
- możliwość odwracalnego kompleksowania białek z unieruchomionymi jonami metalu w warunkach uniemożliwiających ich oddysocjowanie z nośnika;
- częściowa lub całkowita eliminacja przeszkód przestrzennych w oddziaływaniach jonów metalu z białkiem [4, 5].

Najczęściej stosowaną matrycą w chromatografii powinowactwa, podobnie jak w sączeniu na żelu, jest paciorkowa agaroz a i syntetyczne polisacharydowe pochodne typu Sephadex i Sepharose [6, 7]. Porowatość tych matryc umożliwia tworzenie otwartej, usieciowanej struktury. Ten typ żelu, o wystarczająco dużej porowatości, ogranicza w wysokim stopniu tworzenie przeszkód przestrzennych w oddziaływaniach między aktywnym ligandem a biopolimerem.

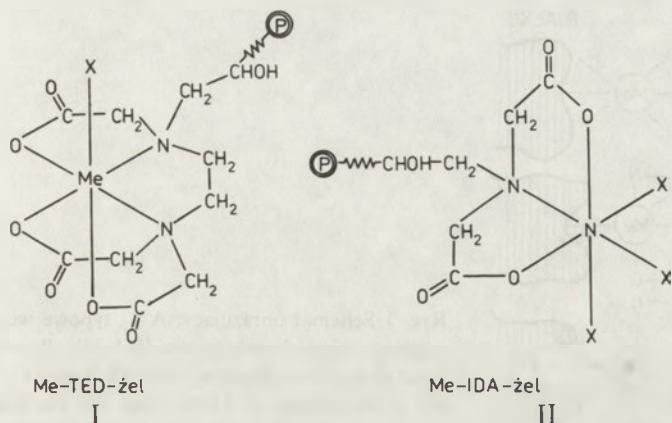
Jedyną dotychczas znaną metodą aktywacji złoża do unieruchamiania jonów metali jest aktywacja epichlorohydryną [3]. Zaktywowana matryca umożliwia łączenie chelatujących adsorbentów. Dwa następujące adsorbenty, uprzednio związane z łańcuchem bocznym odstępniaka (z ang. spacer), znalazły praktyczne zastosowanie:

- iminodwuoctano-Sepharose 6B (IDA-Sepharose 6B); oraz
- tris (karboksymetyl) etylenodwuamino-Sepharose 6B (TED-Sepharose 6B).

Hipotetyczną strukturę unieruchomionych kompleksów metali z adsorbentami typu IDA i TED ilustruje wzór I i II.

W porównaniu z IDA-żelem, TED-żel tworzy bardziej stabilne kompleksy z jonami metali, aniżeli z białkami. Prawdopodobnie, w TED-żelu tylko jedno miejsce wiązania jest dostępne dla białka. TED-żel wiąże metale praktycznie nieodwracalnie, natomiast IDA-żel tworzy z metalem kompleksy odwracalne. IDA-żel zawierający unieruchomiony jon metalu wykazuje zdolność wiązania znacznie większej ilości białek, niż TED-żel, ponieważ prawdopodobnie w tym

** Powinowactwo jest unikalną właściwością biologiczną makrocząsteczek, polegającą na selektywnym rozpoznawaniu i oddziaływaniu z innymi ugrupowaniami. Oddziaływania te mogą być fizyczne i chemiczne, uczestniczą w nich siły van der Waalsa oraz wiązania jonowe, hydrofobowe i wodorowe. Powinowactwo chromatograficzne jest powszechnie stosowaną techniką oczyszczania makrocząsteczek a szczególnie białek. Technika ta wykorzystuje odwracalne oddziaływania makrocząsteczek z innymi cząsteczkami.



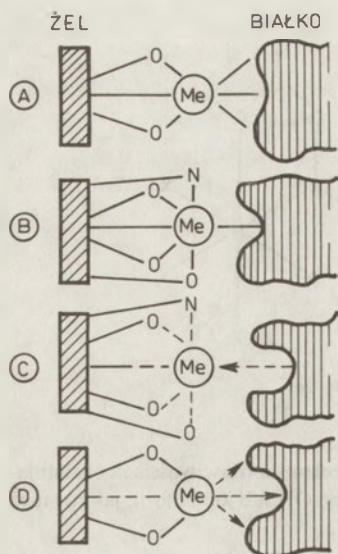
Wzory I i II. Hipotetyczna struktura kompleksów jonów metali z żelami o właściwościach chelatujących, gdzie P oznacza żel, X oznaczać może cząsteczki wody, grupę OH lub jon buforu, jak również ligand białkowy [3].

żelu są dostępne trzy miejsca wiązania białek. Z tego powodu dotychczas jedynie IDA-żel znalazł powszechne zastosowanie w technikach rozdzielania białek i jest dostępny handlowo w firmach Pharmacia („Chelating-Sepharose”) i Pierce („Immobilized Iminodiacetic Acid”).

II. Powinowactwo białek do unieruchomionych dwuwartościowych jonów metali

Przeważająca większość zastosowań IMAC dotyczy oczyszczania białek na unieruchomionych dwuwartościowych jonach metali (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) [1, 8]. Do 1986r. oczyszczono tą techniką ponad 200 białek, niektóre z nich o wysokim stopniu oczyszczenia otrzymano przy zastosowaniu tylko IMAC. Jednakże, zastosowanie IMAC nie ogranicza się do oczyszczania białek. Sulkowski i w s.p. [8, 9, 10] wykorzystali unieruchomione jony jako komplementarną sondę do badania rozmieszczenia reaktywnych ugrupowań na powierzchni białek. Powyższe badania wykazały, że za łączenie z unieruchomionymi jonami metalu są, w przeważającej mierze, odpowiedzialne pierścienie imidazolowe histydyny. Znalazło to bezpośrednie potwierdzenie w wynikach badań nad oddziaływaniem unieruchomionych jonów metali z dwiema resztami histydyny w centrum aktywnym apokarboksypeptydazy A [11].

Odmiernym zastosowaniem jest „odwrotna” (z ang. „reversed”) IMAC gdzie metal jest strukturalnym komponentem białek [12]. Metal w metaloproteinach wykazuje zróżnicowane powinowactwo do wyżej opisanych unieruchomionych chelatorów. Rycina 1 obrazuje możliwość interakcji białek z IDA- i TED-żelami zarówno zawierających jony metalu jak i wolnych od tych jonów (Ryc. 1). Wolny



Ryc. 1 Schemat obrazujący: A – typowe wiązanie białek z metalem unieruchomionym na IDA-żelu; B – wiązanie białek z metalem unieruchomionym na TED-żelu; C – oddziaływanie metaloprotein z TED-żelem nie zawierającym jonów metali, w wyniku którego metal zostaje przekazany z białka do żelu; D – oddziaływanie apoprotein z metalem związanym na IDA-żelu, w wyniku którego metal zostaje przekazany z żelu do białka. Strzałki wskazują kierunek przekazywania jonów metalu.

od jonów metalu TED-żel silnie chelatuje jony metali. Muszyńska i wsp. [11, 13] wykorzystali to powinowactwo do chromatograficznego usuwania jonów cynku z centrum aktywnego metaloenzymów. Natomiast wolne od jonów metali metaloproteiny mogą „odbierać” metal unieruchomiony na IDA-żelu [12, 14].

III. Powinowactwo białek do unieruchomionych jonów żelazowych

Porath i Belew [12] wykazali, że adsorpcja białek na unieruchomionych jonach metali jest wysoce zależna od pH. Jon żelazowy silnie wiąże białka w roztworach o niskiej sile jonowej i lekko kwaśnym środowisku (pH około 5). Dlatego też, w tych warunkach Fe^{3+} -adsorbent może wykazywać właściwości jonowymiennie. Przypuszczenie to uzyskało potwierdzenie doświadczalne. Białka nieufosforylowane, o bardzo niskich punktach izoelektrycznych nie wiążą się w pH 6 z unieruchomionymi jonami żelazowymi, podczas gdy białka lekko kwaśne o $pI > 4$ wiążą się ze złożem. Białka zasadowe związane z Fe^{3+} -IDA-agarose w pH 6, mogą być eluowane ze złoża gradientem NaCl i pH [14, 15].

W przeciwieństwie do dwuwartościowych jonów Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Cu^{2+} – jony żelazowe tworzą słabe wiązania koordynacyjne z parą elektronów atomów azotu, natomiast silnie kompleksują z tlenem. W tym przypadku możliwa jest interakcja między Fe^{3+} a tlenem grupy fosforanowej. I tak dane literaturowe wykazały, że stała wiązania fosfoseryny do Fe^{3+} jest powyżej 10^{13} [16]. Z tego powodu wydawało się celowym wykorzystanie Fe^{3+} -żelu jako adsorbentu do rozdzielenia białek ufosforylowanych. I tak wstępne badania wykazały [17], że albumina z jaja kurzego (ovoalbumina) i pepsyna po chromatografii na kolumnie z unieruchomionymi jonami żelazowymi (Fe^{3+} – IDA-żel) rozdzielają się na frakcje różniące się zawartością fosforu.

III-1. Selektynywny rozdział enzymatycznie fosforylowalnych form białek

Celem określenia wpływu ilości reszt fosforanowych w białkach na ich wiązanie przez unieruchomione jony żelazowe podjęto badania modelowe. W tych badaniach użyto dwa białka: histon H2a i foswitynę, białka krańcowo różniące się stopniem fosforylacji [18]. Foswityna, najbardziej ufosforylowana ze znanych dotychczas białek, jest złożona z około 220 aminokwasów, z których ponad połowę stanowi fosfoseryna [19, 20]. Fosfowityna z żółtka jaja kurzego silnie wiąże się w Fe^{3+} -IDA-złożem. Defosforylacja foswityny alkaliczną fosfatazą zmienia zasadniczo obraz elucji. Najsilniej zdefosforylowane frakcje foswityny wymywają się z kolumny przy znacznie niższych wartościach pH. Wyniki te potwierdziły uprzednie przypuszczenia, że siła wiązania fosfobiałek ze złożem jest skorelowana z ich zawartością fosforu, co najmniej w zakresie 5 – 33 moli PO_4 /mol białka (Tabela 1). Do bardziej szczegółowej charakterystyki wiązania grup fosforanowych z Fe^{3+} -IDA-złożem, wybrano białko o znanej strukturze, w którym fosforylacja jest ograniczona do pojedynczych reszt aminokwasowych. W histonie H2a jest

Tabela 1

Desorpcja białek z Fe^{3+} -IDA-złoża

Lp.	białko	Ilość grup fosforanowych w cząsteczce białka	Warunki desorpcji	Piśmiennictwo
1.	Owoalbumina	0	pH 5,0	[17]
2.	„	1,1*)	pH 6,3	
3.	„	2,1*)	pH 6,7	
4.	Pepsyna	0	pH 5,0	[17]
5.	„ Foswityna po defosforylacji	1	pH 5,0 + 20mM NaH_2PO_4	
6.	fr. 1	5	pH 6,0	[18]
7.	fr. 2	8	pH 8,0	
8.	fr. 3	33	pH 8,9	
9.	Histon H2a	0*)	pH 7,2	[18]
10.	„	1,4*)	pH 8,0	
11.	„	1,4*)	pH 7,2 + 25mM fosfoseryna	
12.	„ fr. 1	0,9*)	pH 7,2 + 0,4M $MgCl_2$	
13.	„ fr. 2	1,9*)	pH 7,2 + 0,75M $MgCl_2$	
14.	Heksozodifosfatasa	0*)	pH 8,2	[22]
15.	„	8,0*)	pH 8,2 + 0,38M $MgCl_2$	
	Białka z siewek kukurydzy			
16.	fr. 1	12,7***)	pH 6,8	[29]
17.	fr. 2	46,2***)	pH 8,0	
18.	fr. 3	81,1***)	pH 9 + 1M $MgCl_2$	

*) wartości pochodzą z przeliczenia zawartości fosforu oznaczanego spektrofotometrycznie (Lp. 1—8, 16—18) lub poprzez pomiar radioaktywności enzymatycznie fosforylowanych białek w obecności ^{32}P ATP (Lp. 9—15).

**) przeliczono na c. cz. 67.000. Jest to główna frakcja białek w preparacie z siewek kukurydzy.

fosforylowana seryna 18 i/lub seryna 19 przez kinazę białkową zależną od cAMP, w obecności ATP jako donora fosforu [18, 21]. Fosforylacja 1 – 2 reszt serynowych histonu zwiększa siłę wiązania zmodyfikowanego białka ze złożem, czego efektem jest konieczność użycia eluentu o wyższym pH (z pH 7,2 do pH 8,0) (Tabela 1). Ufosforylowalne białka można eluować ze złoża po wprowadzeniu do buforu fosfoseryny lub chlorku magnezu. Elucja histonów w obecności jonów magnezowych umożliwiła otrzymanie dwu frakcji (fr. 1 i fr. 2) różniących się stopniem fosforylacji, a także ilościowy rozdział enzymatycznie ufosforylowanej formy heksozodifosfatazy (EC 3.1.3.11) od enzymu niezmodyfikowanego (Tabela 1).

Fosforylacja reguluje aktywność zarówno heksozodifosfatazy [23] jak i wielu innych enzymów [24]. Odwracalne zmiany w aktywności enzymów powodowane przez specyficzne procesy fosforylacji są trudne do śledzenia z powodu obecności w materiale fosfataz i proteaz degradujących fosfoproteiny. Dlatego też, prosta i szybka metoda rozdziału ufosforylowalnych form enzymów może być precyzyjnym narzędziem w poznaniu roli jaką pełnią poszczególne fosfoenzymy w regulacji metabolizmu.

III-2. Zróżnicowany rozdział fosfoprotein z kompleksów lipidowobiałkowych

Rozdział białek modelowych na żelu zawierającym schelatowane jony żelaza zasugerował możliwość izolowania fosfoprotein bezpośrednio pochodzących ze źródeł biologicznych.

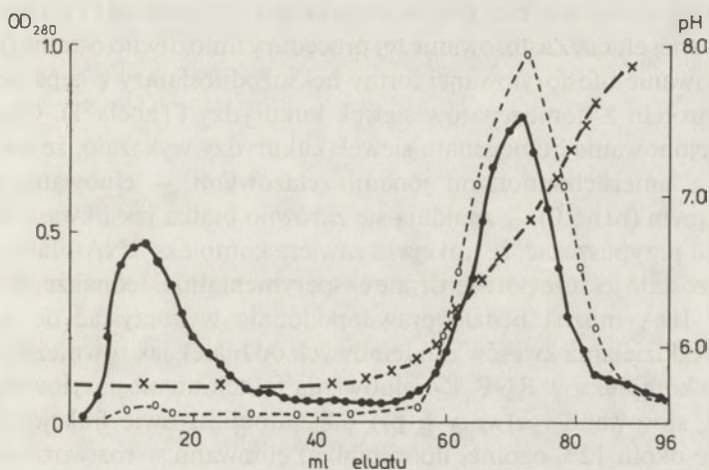
Szczególnie ważnym wydawało się podjęcie próby frakcjonowania składników błonowych składających się z lipo- i fosfoprotein. Lipowiteliny, zasadniczy składnik granuli żółtka [25], są sferycznymi cząsteczkami o m. cz. około 400 000 [26]. Składają się one z około 80% białka, 12% fosfolipidów i 8% lipidów obojętnych [25]. Lipowiteliny jaja kurzego, a mianowicie α - i β -lipowiteliny mają bardzo podobny skład aminokwasowy i lipidowy, a różnią się jedynie zawartością fosforu; α -lipowiteliny zawierają około 0,5% PO_4 , zaś β -lipowiteliny o połowę mniej fosforu [25]. Dlatego też, frakcja lipowitelin z żółtka jaja kurzego wydawała się odpowiednim materiałem do badań oddziaływań z unieruchomionymi jonami żelazowymi. Lipowiteliny silnie wiążą się z Fe^{3+} -IDA-agarozą. Wiązanie to jest znacznie silniejsze aniżeli należałoby się spodziewać z zawartości fosforu w porównaniu z foswityną. Lipowiteliny w odróżnieniu od foswityny, tylko częściowo wymywają się z Fe^{3+} -IDA-złoża elucją w roztworze o wysokim pH w obecności 1M NaCl. Świadczy to, że nie tylko oddziaływania metal-fosfor są odpowiedzialne za wiązanie się ze złożem [27]. Dlatego więc, w celu ograniczenia oddziaływań białko-adsorbent zastosowano matrycę TED blokującą większą ilość wiązań unieruchomionego metalu (patrz wzór I). Różnice w oddziaływaniach lipowitelin z Fe^{3+} -IDA- i Fe^{3+} -TED-agarozą obrazuje tabela 2. W obecności 1M NaCl lipowiteliny wymywane są z Fe^{3+} -TED-żelu przy pH 7 w pojedynczym, symetrycznym szczycie. Dodatek jonów magnezu do buforu wymywającego powoduje rozdział materiału na dwie frakcje znacznie różniące się zawartością

Tabela 2

Porównanie desorpcji fosfoprotein z żółtka jaja kurzego z Fe^{3+} -IDA-złoża i z Fe^{3+} -TED-złoża (27, zmodyfikowane)

Białko	pH desorpcji		odzysk białka %	
	Fe^{3+} -IDA-żel	Fe^{3+} -TED-żel	Fe^{3+} -IDA-żel	Fe^{3+} -TED-żel
Foswityna	8,6	6,1	100	100
Lipowiteliny	> 8,9	7,0	17	100

Próby nanoszono na kolumnę w buforze o pH 5,7 zawierającym 1M NaCl. Do elucji białek stosowano liniowy gradient pH (5,7–8,9) w obecności 1M NaCl.



Ryc. 2 Profile elucji lipowitelin z Fe^{3+} -TED-żelu w gradiencie pH (x) przy użyciu buforu zawierającego 1M NaCl (linia przerywana ○) oraz 1M $MgCl_2$ (linia ciągła ●).

Tabela 3

Zawartość fosforu w lipowitelinach wymywanych z Fe^{3+} -TED-żelu roztworem zawierającym wzrastające stężenia jonów magnezowych

Stężenie $MgCl_2$ (M) w eluowanej frakcji lipowitelin	% grup fosforanowych w lipowitelinach
0,20	1,0
0,50	2,5
0,62	6,1
0,66	9,8

fosforu (Rycina 2). Elucję lipowitelin o wyższym stopniu ufosforylowania można uzyskać stosując eluent zawierający jony magnezowe w wyższym stężeniu. Tabela 3 przedstawia zależność między wymaganym stężeniem $MgCl_2$ a stopniem fosforylacji eluowanych białek.

III-3. Możliwość izolowania fosfoprotein i kwasów nukleinowych z homogenatów tkanek zwierzęcych i roślinnych

Do izolowania określonych białek konieczne są duże ilości wyjściowego materiału biologicznego. W tym celu zalecane jest stosowanie wydajnych etapów oczyszczania białek. Jednymi z najbardziej zdumiewających właściwości kolumn z unieruchomionymi jonami żelazowymi jest zarówno ich preferencyjnie selektywna zdolność wiązania fosfoprotein jak i ich wysoka pojemność wiązania. Właściwości te zaczyna się wykorzystywać do wyodrębniania ufosforylowanych białek nawet z surowych nieoczyszczonych preparatów białkowych. Większość nieufosforylowanych białek można rozdzielać na kolumnach z unieruchomionymi jonami żelazowymi stosując wzrastający gradient pH (w zakresie pH 6,0–7,5), desorpcja fosfobiałek jest możliwa w roztworze o wyższym pH i po zastosowaniu biospecyficznej elucji. Zastosowanie tej procedury umożliwiło ostatnio bezpośrednio wyizolowanie ufosforylowanej formy heksozodifosfatazy z hepatocytów [28], oraz fosfoprotein z homogenatów siewek kukurydzy (Tabela 1). Chromatograficzne frakcjonowanie homogenatu siewek kukurydzy wykazało, że we frakcji nie związanej z unieruchomionymi jonami żelazowymi – eluowanej w buforze równoważącym (pH 6,0) – znajdują się zarówno białka jak i kwasy nukleinowe [29]. Można przypuszczać, że frakcja ta zawiera kompleks RNA-białko (RNP), co jednak nie zostało jeszcze potwierdzone eksperymentalnie. Jednakże, wydaje się, że złoże Fe^{3+} -IDA można będzie prawdopodobnie wykorzystać do szybkiego i wydajnego oddzielania kwasów nukleinowych od białek jak również do ewentualnej izolacji kompleksów RNP. Do eluowania frakcji nieufosforylowanych białek roślinnych, stosowano roztwory o pH 6,8 natomiast dwie frakcje fosfoprotein (stanowiące około 12% ogólnej ilości białka) eluowano w roztworze o pH 8 i w roztworze o pH 9 zawierającym chlorek magnezu. Frakcję fosfoprotein wymywaną w roztworze o pH 9 zawierającym Mg^{2+} cechuje prawie dwukrotnie wyższa ilość grup fosforanowych w porównaniu z frakcją eluowaną w roztworze o pH 8. Chociaż przeliczenia ilości grup fosforanowych obecnych w cząsteczce białka mają charakter szacunkowy (patrz wyjaśnienie w Tabeli 1), rozdział fosfoprotein roślinnych jest kolejnym dowodem wysokiej zdolności rozdzielczej złoża z unieruchomionymi jonami żelazowymi, gdzie zasadniczym czynnikiem odpowiedzialnym za rozdział jest zawartość ufosforylowanych reszt aminokwasowych w białku. Stwarza to nowe możliwości metodyczne śledzenia dynamiki oraz zmian ilościowych i jakościowych zachodzących w procesie fosforylacji/defosforylacji białek.

III-4. Oddziaływania odpowiedzialne za wiązanie białek z unieruchomionymi jonami żelazowymi

Desorpcja białek ze złoża z unieruchomionymi jonami żelazowymi dostarczyła danych wskazujących, że oddziaływania Fe^{3+} z grupą fosforanową białek można sklasyfikować jako powinowactwo. Wiązanie fosfoprotein z unieruchomionym ligandem jest znacznie silniejsze aniżeli typowe wiązanie jonowymienne.

Klasycznym sposobem elucji białek ze złoża jonowymiennego jest stosowanie

eluentów o wzrastającej sile jonowej. Rozdział fosfoprotein na kolumnach zawierających unieruchomione jony żelazowe przeprowadzano w obecności 0,5M KCl [22, 29] lub 1M NaCl [18, 27]. Te stężenia soli uniemożliwiały tworzenie typowych wiązań jonowymiennych między białkami a unieruchomionym ligandem. Przekonywującym przykładem świadczącym o powinowactwie jonów żelaza do fosfoprotein jest desorpcja histonu z kolumny Fe^{3+} -IDA-żel. Nieufosforylowany histon wymywa się ze złoża w pH 7,2. Po fosforylacji 1 – 2 reszt serynowych w cząsteczce tego białka nawet zwiększenie stężenia chlorku sodu do 4M nie wystarcza do elucji [18]. O selektywnym powinowactwie ufosforylowanych białek do unieruchomionych jonów żelaza świadczy efektywność zastosowania biospecyficznego elucji. Obecność w eluencie fosforanu lub fosfoseryny umożliwia desorpcję fosfoprotein ze złoża. Ilościowa elucja ufosforylowanego histonu z Fe^{3+} -IDA-żelu przez 25 mM fosfoserynę w pH 7,2, bezpośrednio wskazuje na specyficzność interakcji między fosfobiałkiem a adsorbentem powinowactwa (z ang. „affinity adsorbent”).

Zakładając, że podczas fosforylacji tworzy się kompleks pomiędzy jonami Mg^{2+} a grupami fosforanowymi, logicznym było zastosowanie eluentu zawierającego jony tego metalu do specyficznej elucji fosfoprotein. Wyniki zawarte w tabeli 1, dotyczące rozdziału ufosforylowanych białek z Fe^{3+} -IDA-żelu świadczą, że jony magnezowe są niezwykle istotnym składnikiem eluentu, ich obecność umożliwia rozdział nawet mono- i dwufosfopochodnych histonów oraz lipowitelin na frakcje różniące się zawartością fosforu.

Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują na specyficzność interakcji między fosfoproteinami i unieruchomionymi jonami żelazowymi. Jest faktem dobrze znanym, że jony magnezowe tworzą kompleksy chelatujące z grupami fosforanowymi. Mg^{2+} i Fe^{3+} mają podobny promień jonowy i oba te metale posiadają zdolność tworzenia struktur oktameru. Jednakże, z powodu niższej zdolności odciągania elektronów, jony magnezowe wykazują mniejszą aniżeli jony żelazowe tendencję do tworzenia wiązań koordynacyjnych z tlenem. Cecha ta może wyjaśniać dlaczego do oddysocjowania fosfoprotein z kompleksu z unieruchomionymi jonami żelazowymi potrzebne są roztwory o wysokim stężeniu chlorku magnezu (0,3 – 1,0 M). Należy zaznaczyć, że powinowactwo grup fosforanowych do Fe^{3+} wykazują głównie ufosforylowane reszty aminokwasowe w białkach, podczas gdy DNA [30] jak i RNA [29] nie wiążą się (w pH 6,0) z Fe^{3+} -IDA-żelem. Jest to prawdopodobnie wynikiem znacznie mniejszej przestrzennej dostępności grup fosforanowych kwasów nukleinowych, niż reszt fosfoaminokwasów w białkach.

IV. Uwagi końcowe

Wzrastające zainteresowanie procesami fosforylacji – regulującymi wielorakie procesy komórkowe – spowodowało konieczność opracowania nowych wysoce selektywnych metod badawczych, między innymi do izolowania fosfoprotein.

Powyżej opisano zastosowanie chromatografii powinowactwa na żelu ze schelatowanymi jonami żelazowymi, do frakcjonowania fosfoprotein i ich rozdziału od kwasów nukleinowych. Ponieważ siła wiązania białek ze złożem jest proporcjonalna do ilości ufosforylowanych reszt aminokwasowych w białkach, zróżnicowany rozdział białek zawierających pojedyncze reszty fosforanowe staje się możliwy. Na zakończenie warto podkreślić, że zastosowanie chromatografii na unieruchomionych jonach żelazowych umożliwia:

- rozdział fosfoprotein i kwasów nukleinowych nawet z „surowego” cytosolowego materiału;
- rozdział białek zawierających różne ilości reszt ufosforylowanych;
- ilościowe izolowanie ufosforylowanych form enzymów;
- zróżnicowany rozdział fosfoprotein z kompleksów lipofosfoproteinowych;

Oprócz selektywności zaletą tej metody jest szybkość, co chronić może izolowane fosfoproteiny przed degradującym działaniem endogennych fosfataz i proteaz, a wysoka pojemność złoża z unieruchomionymi jonami żelazowymi umożliwia wyodrębnienie fosfoprotein nawet z homogenatów tkanek.

Należy zaznaczyć, że unieruchomione jony żelazowe działają zarówno jako anionowy wymieniacz, jak i wykazują preferencyjne powinowactwo do fosfoprotein. Mechanizm tych oddziaływań nie jest jeszcze wystarczająco poznany.

Artykuł otrzymano 12 września 1988 r.

Zaakceptowano do druku 7 stycznia 1989 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Fatiadi A. J., (1987), *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **18**, 1–44.
2. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., (1975), *Nature*, **285**, 598–599.
3. Porath J., Olin B., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1621–1630.
4. Porath J., (1985), w *Modern Methods in Protein Chemistry*, (red. Tschesche H.), t.2, str. 85–95, Walter de Gruyter, Berlin-New York.
5. Parikh I., Cuatrecasas P., (1985), *Chem. Eng. News*, **63**, 17–32.
6. Axén R., Porath J., Ernback S., (1967) *Nature (London)*, **214**, 1302–1304.
7. Porath J., Axén R., Ernback S., (1967), *Nature (London)*, **215**, 1491–1492.
8. Sulkowski E., (1985), *Trends in Biotechnology*, **3**, 1–7.
9. Sulkowski E., Vastola K., Oleszek D., von Muenchhausen W., (1982), w *Affinity Chromatography and Related Techniques*, (red. Gribnau T. C. J., Visser J.), str. 313–322, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
10. Hemdan E. S., Zhao Y. J., Sulkowski E., Porath J., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1811–1815.
11. Muszyńska G., Zhao Y.-J., Porath J., (1986), *J. Inorganic Biochemistry*, **26**, 127–135.
12. Porath J., Belew M., (1983), w *Affinity Chromatography and Biological Recognition*, (red. Chaiken I., Wilchek M., Parikh I.), str. 173–189, Academic Press, Orlando Fla.
13. Lubińska V. K., Muszyńska G., *Int. Symp. on Enzyme Engineering*, str. 9, Smolenice, Czechosłowacja.
14. Sulkowski E., (1988) *Macromol. Chem. Macromol. Symp.*, **17**, 335–348.
15. Sulkowski E., (1987), *7th Int. Symp. on Affinity Chromatography and Interfacial Macromolecular Interactions*, (red. Decker K., Stoffel W., Zachau H. G.), str. 776, Hoppe Seylor Biol. Chem.

16. Österberg R., (1957), *Nature (London)*, **179**, 476–477.
17. Andersson L., Porath J., (1986), *Anal. Biochem.*, **154**, 250–254.
18. Muszyńska G., Andersson L., Porath J., (1986), *Biochemistry*, **22**, 6850–6853.
19. Taborsky G., (1974), *Adv. Protein Chem.*, **28**, 1–210.
20. Byrne B. M., van het Schip A. D., van der Kunder J. A. M., Arnberg A. C., Gruber M., Ab. G., (1984), *Biochemistry*, **23**, 4275–4279.
21. Shlyapnikov S. V., Arutyunyan A. A., Kurochki S. N., Memelova L. V., Nestorova M. V., Sashchenko L. P., Severin E. S., (1975), *FEBS Lett.*, **53**, 316–319.
22. Nilsson-Ekdahl K., Muszyńska G., dane nie opublikowane.
23. Nilsson-Ekdahl K., Ekman P., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 14173–14179.
24. Cohen P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **151**, 439–448.
25. Burley R. W., Cook W., H., (1961), *Can J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1295–1307.
26. Franzén J. S., Bobik C. M., Stuchell R. N., Lee L. D., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 127–132.
27. Muszyńska G., Sleigh R., Andersson L., Porath J., (1988), *J. Chromatography*, wysłane do druku.
28. Nilsson-Ekdahl K., dane nie opublikowane.
29. Szczegielniak J., Dobrowolska G., Muszyńska G., (1988), XXVI Zjazd Pol. Tow. Biochem., Poznań.
30. Muszyńska G., Porath J., dane nie opublikowane.

190. ...
 191. ...
 192. ...
 193. ...
 194. ...
 195. ...
 196. ...
 197. ...
 198. ...
 199. ...
 200. ...

SPRAWOZDANIE Z KONFERENCJI

II Konferencja n.t.:

„Regulacyjne funkcje procesów fosforylacji białek”

– Lublin, 14–15 czerwca, 1988.

W dniach 14 i 15 czerwca b.r. odbyła się w Lublinie konferencja poświęcona problematyce fosforylacji białek. Inicjatorem konferencji był Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, organizatorami zaś pracownicy Zakładu Biologii Molekularnej UMCS.

Liczba nowo-odkrytych i częściowo scharakteryzowanych kinaz białkowych wzrosła w ostatnim dziesięcioleciu bardzo wyraźnie. Wykazano udział tych enzymów, a także fosfataz białkowych w regulacji kilkudziesięciu szlaków metabolicznych komórki. Ilość nowych informacji odnoszących się do wspomnianej problematyki wzrasta nadal niemal lawinowo. W takiej sytuacji próba omówienia i przedyskutowania nowych danych wydała się organizatorom konferencji w pełni uzasadniona. Ze względu na ogrom materiału program konferencji nie mógł objąć całości problematyki. Ominięto np. zagadnienia związane z charakterystyką i funkcją kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów. Były one bowiem przedmiotem kilku opracowań przeglądowych opublikowanych w ostatnich latach w języku polskim. Położono natomiast nacisk na sprawy uczestnictwa niektórych kinaz białkowych w transmisji sygnałów do komórki, przedstawiono w miarę pełną charakterystykę szeregu klas kinaz białkowych i ich znaną bądź prawdopodobną rolę biologiczną. W niewielkim zakresie uwzględniono także właściwości, klasyfikację oraz funkcję fosfataz białkowych.

Ogółem przedstawiono na konferencji 17 wykładów, większość z nich miała charakter przeglądowy. Niektóre były oparte także o własny materiał doświadczalny. A oto szczegółowa tematyka:

- Wpływ postsyntetycznych fosforylacji na strukturę histonu H1 i jego funkcji w chromosomach, Andrzej Jerzmanowski (Warszawa),
- Rola fosforylacji białek w organizacji cytoszkieletu komórek nerwowych, Barbara Baryłko (Warszawa),
- Kinazy białkowe w ontogenezie mózgu, Maria Sanecka-Obacz (Lublin),
- Fosforylacja miozyny – fakty i hipotezy, Jacek Kuźnicki (Warszawa),
- Wpływ tyroksyny na fosforylację białek i transport wapnia przez błonę komórkową, Anna Wojteczak i Konrad Famulski (Warszawa),
- Mechanizm transfosforylacji w katalizie niespecyficznych fosfomonoesteraz, Włodzimierz Ostrowski (Kraków)
- Właściwości kinaz tyrozynowych, Bożena Kamińska (Warszawa),

- Ogólne właściwości kinaz białkowych C, Józef Zając (Lublin),
- Kinaza C a transmisja sygnałów w komórce, Janina Kwiatkowska-Korczak (Wrocław),
- Wpływ estrów forbolu na funkcje komórek, Jerzy Kawiak (Warszawa),
- Rozdział fosfobiałek na unieruchomionych jonach metali, Grażyna Muszyńska (Warszawa),
- Kinazy białkowe a aktywność fotosyntetyczna chloroplastów, Joanna Gemel (Warszawa),
- Struktura i właściwości kinaz kazeinowych, Grażyna Dobrowolska, (Warszawa)
- Fosforylacja białek rybosomowych, Teresa Jakubowicz (Lublin),
- Udział frakcji spektrynowej w regulacji inicjacji syntezy białek w retikulocytach królika, Wiesław Kudlicki (Lublin),
- Kinazy białkowe – strukturalne i funkcjonalne podobieństwa i różnice, Eugeniusz Gąsior (Lublin),
- Ogólna charakterystyka fosfataz fosfobiałkowych, Emilia Paleń (Lublin).

Konferencja zgromadziła ponad 50-ciu uczestników obrad z różnych ośrodków akademickich Kraju. Była okazją do osobistego kontaktu osób zajmujących się różnymi aspektami problematyki fosforylacji białek.

Eugeniusz Gąsior

ARTYKUŁY

EDWARD BAŃKOWSKI,* JERZY PAŁKA,**

Polimorfizm molekularny kolagenu: kolageny typów VI–XII

Molecular polymorphism of collagen: type VI–XII collagens

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wspólne cechy kolagenów różnego typu
- III. Specyficzne cechy kolagenów poszczególnych typów
 - III-1. Kolagen typu VI
 - III-2. Kolagen typu VII
 - III-3. Kolagen typu VIII
 - III-4. Kolagen typu IX
 - III-5. Kolagen typu X
 - III-6. Kolagen typu XI
 - III-7. Kolagen typu XII
- IV. Patofizjologiczne znaczenie polimorfizmu molekularnego kolagenu.

Contents:

- I. Introduction
- II. Common features of different collagen types
- III. Specific features of the individual types of collagen
 - III-1. Type VI collagen
 - III-2. Type VII collagen
 - III-3. Type VIII collagen
 - III-4. Type IX collagen
 - III-5. Type X collagen
 - III-6. Type XI collagen
 - III-7. Type XII collagen
- IV. Pathophysiological significance of collagen molecular polymorphism

Wykaz stosowanych skrótów: Gal – galaktoza, Glc – glukoza, LC – (long chain collagen) – kolagen długołańcuchowy, SC – (short chain collagen) – kolagen krótkołańcuchowy, EC – (endothelial collagen) – kolagen endotelialny, NC – (non – collagen fragment) – fragment „niekolagenowy,” kDa – kilodalton.

* Prof. dr hab.,

** Dr, Zakład Biochemii, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok-8

I. Wstęp

Kolagen, podstawowe białko strukturalne tkanki łącznej (występuje także w innych tkankach), do końca lat sześćdziesiątych był uważany za białko jednorodne. Drobne różnice gatunkowe i narządowe w składzie i sekwencji aminokwasowej przypisywano mutacjom punktowym lub zmiennym warunkom jego potranslacyjnej modyfikacji.

Badania lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych wykazały, że kolagen jest grupą co najmniej 12 różnych białek, różniących się składem podjednostkowym, masą cząsteczkową, składem i sekwencją aminokwasową, stopniem hydroksylacji reszt prolilowych i lizyloowych stopniem glikozylacji reszt hydroksylizyloowych, strukturą przestrzenną, lokalizacją tkankową, specyfiką biosyntezy i potranslacyjnej modyfikacji. Wykaz poznanych dotychczas typów kolagenu ich skład podjednostkowy oraz główne miejsca ich występowania przedstawia tabela 1.

Tabela 1

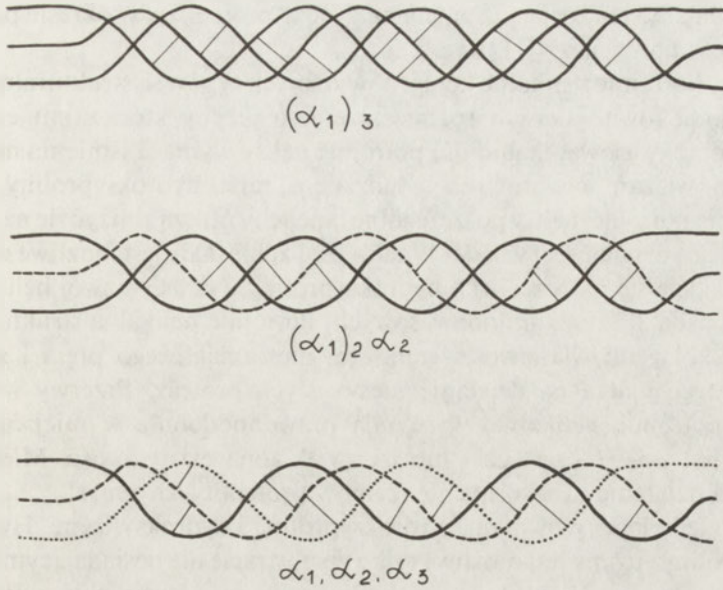
Skład podjednostkowy i główne miejsca występowania różnych typów kolagenu.

Typ kolagenu	Skład podjednostkowy	Główne miejsca występowania
Typ I	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$	skóra, kości, ścięgna, ściany tętnic, macica
Typ II	$[\alpha_1(II)]_3$	chrząstka
Typ III	$[\alpha_1(III)]_3$	skóra, ściany tętnic, macica
Typ IV	$[\alpha_1(IV)]_3; [\alpha_2(IV)]_3$	blony podstawne
Typ V	$\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$	łożysko, rogówka, skóra, kości
Typ VI	$\alpha_1(VI)\alpha_2(VI)\alpha_3(VI)$	ściany tętnic, macica, łożysko, rogówka
Typ VII	$[\alpha_1(VII)]_3$	blony płodowe, skóra
Typ VIII	$[\alpha_1(VIII)]_3$	śródbłonki naczyniowe, błona Descemeta, niektóre nowotwory
Typ IX	$\alpha_1(IX)\alpha_2(IX)\alpha_3(IX)$	chrząstka
Typ X	$[\alpha_1(X)]_3$	chrząstka
Typ XI	$1\alpha\ 2\alpha\ 3\alpha$	chrząstka
Typ XII	nieznany	ścięgna embrionalne

II. Wspólne cechy kolagenów różnego typu

Cząsteczki kolagenów wszystkich typów są złożone z trzech łańcuchów polipeptydowych, zwanych podjednostkami α . Cząsteczki te mogą być homotrimerami, złożonymi z 3 identycznych podjednostek $(\alpha_1)_3$ lub heterotrimerami, zawierającymi 2 jednakowe podjednostki i jedną inną, np. $(\alpha_1)_2$ i α_2 albo 3 różne podjednostki: $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ (Ryc. 1)

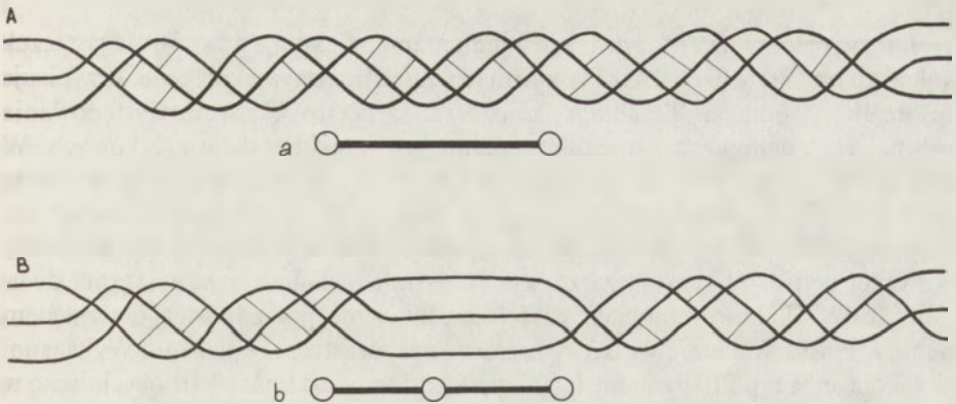
We wszystkich kolagenach znaczny fragment cząsteczki ma strukturę potrójnie helikalną, pozostała część (lub części) stanowią obszary globularne („globular domains”). Obszary globularne występują najczęściej na końcu aminowym i karboksylowym cząsteczki. W niektórych kolagenach znajdują się one w głębi



Ryc. 1. Potrójnie helikalna struktura cząsteczki kolagenu, możliwość występowania jednakowych bądź różnych łańcuchów α .

Linie poprzeczne oznaczają międzyłańcuchowe wiązania wodorowe.

cząsteczki, rozdzielając obszar potrójnie helikalny na kilka części. Obydwa obszary (potrójnie helikalny i globularny) różnią się strukturą pierwszorzędową, wielkością i funkcją zależnie od typu kolagenu. Obszary potrójnie helikalne istniejące w prekursorowej formie kolagenu (prokolagen) zachowują się w dojrzałej, włóknistej jego postaci, podczas gdy obszary globularne albo uczestniczą w tworzeniu form



Ryc. 2. Różne rozmieszczenie obszarów globularnych w cząsteczkach kolagenu: A – na końcach cząsteczki, B – na końcach i w środku cząsteczki. Rysunki „a” i „b” przedstawiają uproszczone schematy tych cząsteczek. Grube linie ciągłe przedstawiają obszary potrójnie helikalne, a koła obszary globularne.

włóknistych, albo też zostają usunięte na drodze proteolizy, w okresie poprzedzającym proces fibrogenезy [1] (Ryc. 2).

Obszary potrójnie helikalne kolagenów różnych typów są strukturalnie podobne. Cechują się równomiernym rozmieszczeniem glicyny, która zajmuje co trzecią pozycję aminokwasową. Stabilność potrójnej helisy wymaga istnienia międzyłańcuchowych wiązań wodorowych z udziałem reszt hydroksyproliny. W celu wytworzenia potrójnej helisy poszczególne łańcuchy muszą zbliżyć się na odległość umożliwiającą działanie sił van der Waalsa. Zbliżenie takie jest możliwe wtedy, gdy glicyna znajdzie się na przeciwko hydroksyproliny. Na jeden zwój helisy kolagenowej przypada 3,2 reszt aminokwasowych. Potrójnie helikalna struktura nadaje cząsteczce kolagenu właściwości giętkiego, nierozciągliwego pręta i stanowi o oporności tego białka na działanie nieswoistych proteaz. Przerwy w ciągłości struktury potrójnie helikalnej występują prawdopodobnie w miejscach, gdzie pożądanе jest zgięcie cząsteczki lub jej zwiększona elastyczność. Miejsca te są podatne na działanie nieswoistych enzymów proteolitycznych [1].

Wszystkie kolageny zawierają hydroksyprolinę i hydroksylizynę. Hydroksylacja reszt proliny i lizyny jest możliwa tylko w substracie nie posiadającym struktury potrójnie helikalnej. Niektóre reszty hydroksylizyny ulegają glikozylacji. Mogą wiązać Gal lub Gal-Glc. Rola składnika cukrowego jest nieznaną, a stopień glikozylacji waha się w szerokim zakresie zależnie od typu kolagenu [1].

Stopień glikozylacji zależy od aktywności enzymów glikozylujących i czasu pozostawania kolagenu w komórce. Na przykład kolagen typu I jest szybko syntetyzowany i szybko wydzielany, stąd zawartość składników cukrowych w kolagenie tego typu jest niewielka. Kolageny typu IV, V, VI i VII są syntetyzowane i wydzielane wolniej, a w konsekwencji są w wyższym stopniu glikozylowane. Kolagen typu II, powstający w chrząstce jest szybko syntetyzowany i szybko wydzielany, lecz stopień jego glikozylacji jest wysoki. Prawdopodobnie jest to spowodowane wysoką aktywnością enzymów glikozylujących w chondrocytach [1].

Obszary globularne (zwane także fragmentami „niekolagenowymi”) cząsteczek kolagenu różnią się wielkością i konformacją zależnie od typu kolagenu. Przypisuje się im liczne funkcje. Te obszary cząsteczki są często miejscem występowania wewnątrzłańcuchowych i międzyłańcuchowych mostków dwusiarczkowych. W niektórych kolagenach, np. w kolagenie typu IX, są one miejscem wiązania polisacharydu. Ogólnie przyjmuje się, że C-końcowy fragment globularny jest odpowiedzialny za specyficzną agregację łańcuchów α i wytwarzanie struktury potrójnej helisy. W tym obszarze występują międzyłańcuchowe wiązania dwusiarczkowe [1], które ułatwiają właściwe ustawienie podjednostek α względem siebie w czasie tworzenia struktury przestrzennej cząsteczki kolagenu. Wykazano, że w kolagenie typu III zwijanie łańcuchów postępuje od końca karboksylowego w kierunku końca aminowego [2]. Przypuszcza się, że w podobny sposób zwijają się łańcuchy kolagenów innych typów [1]. Po utworzeniu struktury potrójnej helisy C-końcowy i N-końcowy fragment globularny ulega proteolitycznemu odłączeniu (przynajmniej w kolagenie typu I, II i III) lub może być zachowany, wbudowując się

wraz z fragmentem potrójnie helikalnym do włókna kolagenowego [1]. N-końcowym fragmentem globularnym, uwalnianym w trakcie konwersji prokolagenu w kolagen, przypisuje się udział w zwrotnym hamowaniu biosyntezy kolagenu [3] i w regulacji procesu fibrogenezy [4].

III. Specyficzne cechy kolagenów poszczególnych typów

Kolageny typu I – V zostały szczegółowo omówione w poprzednim artykule na temat polimorfizmu molekularnego kolagenu [5], dlatego w niniejszej pracy koncentrujemy się na omówieniu kolagenów typu VI do XII.

III-1. Kolagen typu VI

Kolagen typu VI występuje w podścielisku wielu narządów. Został wykryty w łożysku ludzkim [6, 7], w żołądku kurzym [8], macicy, tętnicy głównej [9], rogówce [10] oraz hodowlach fibroblastów [11 – 13].

Cząsteczka kolagenu typu VI jest heterotrimerem złożonym z trzech podjednostek α_1 (VI), α_2 (VI) i α_3 (VI) [14]. Są one połączone licznymi mostkami dwusiarczkowymi. Prawdopodobnie mostki S-S wiążą ten kolagen również z białkami niekolagenowymi [6, 15].

Istnieje pewna rozbieżność opinii co do wielkości tych łańcuchów i ich mas cząsteczkowych. Zastosowanie ograniczonej proteolizy tkanek do izolacji kolagenu typu VI prowadzi do daleko posuniętej degradacji tego białka, a uzyskany produkt zawiera podjednostki mniejsze od występujących w tkankach [15, 16].

Z produktów proteolizy łożyska ludzkiego i bydłęcego wyizolowano kolagen typu VI o krótkich łańcuchach α . Ich masa cząsteczkowa zawarta jest w przedziale 37 – 48 kDa. Łańcuchy te są więc ponad dwukrotnie mniejsze od podjednostek kolagenu typu I, II i III. Z tego powodu kolagen typu VI nazwano „kolagenem krótkołańcuchowym” (short-chain collagen, SC – collagen). Poszczególne łańcuchy określano symbolami SC-1, SC-2 i SC-3. Odpowiadają one symbolom α_1 (VI), α_2 (VI) i α_3 (VI). Skład aminokwasowy tych podjednostek charakteryzuje się stosunkowo niską zawartością hydroksyproliny oraz dużą ilością hydroksylizyny, cysteiny, kwasu asparaginowego i tyrozyny [7, 9].

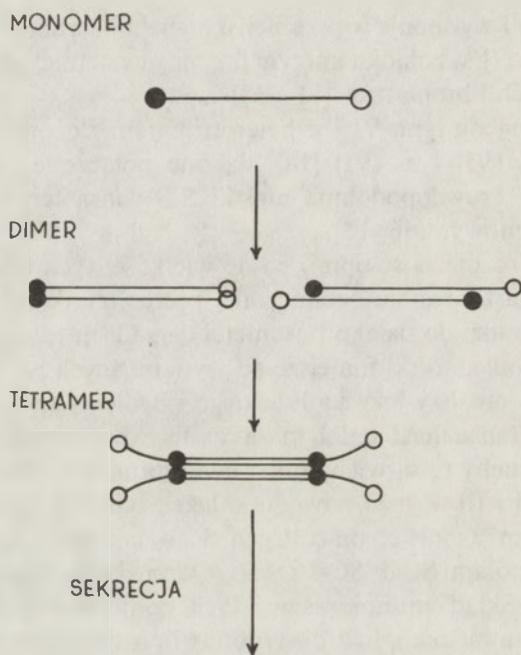
Późniejsze badania wykazały, że kolagen typu VI nie zasługuje na nazwę „kolagenu krótkołańcuchowego”. Udało się wyizolować to białko z pominięciem trawienia pepsyną. Schreier i wsp. wyizolowali z żołądka kurzego niezdegradowany kolagen typu VI [8] i potwierdzili jego trójłańcuchową strukturę. Jednakże masa cząsteczkowa tych łańcuchów okazała się znacznie większa niż przypuszczano. Łańcuch α_1 (VI) wykazywał masę cząsteczkową 140 kDa, łańcuch α_2 (VI) 130 kDa, a łańcuch α_3 (VI) około 180 kDa.

Cząsteczka kolagenu typu VI ma unikalną strukturę przestrzenną. Potrójnie helikalny („kolagenowy”) fragment stanowi zaledwie 1/3 molekuly i jest zlokalizowany w jej centralnej części [11]. Od strony N-końcowej i C-końcowej występują

obszary globularne („niekolagenowe”). Tworzą one kuliste zakończenia, przy czym każdy z łańcuchów wytwarza swoją odrębną globularną strukturę [11, 14].

Cząsteczka kolagenu typu VI ma długość około 150 nm. Część centralna ma kształt pałeczkowaty, o długości około 60 nm. Po obu stronach zakończona jest tworami kulistymi [15]. Te duże „niekolagenowe” obszary globularne są usuwane przez pepsynę w trakcie preparatyki tego białka [9]. Stopień degradacji tych fragmentów jest różny, w zależności od tkanki i warunków proteolizy. Jest to źródłem różnic w ocenie masy cząsteczkowej tego białka.

Kolagen typu VI powstaje w komórce syntetyzującej w ostatecznej formie. W odróżnieniu od innych kolagenów a podobnie jak kolagen typu IV, nie ulega on pozakomórkowej, ograniczonej proteolizie przed wbudowaniem do włókna kolagenowego. Wewnątrzkomórkowa i pozakomórkowa forma tego białka wykazuje tą



Ryc. 3. Wewnątrzkomórkowa agregacja cząsteczek kolagenu typu VI prowadząca do powstania tetrametrów [15].

samą masę cząsteczkową [11, 15]. Pogląd ten nie jest podzielony przez Trüb i wsp. [17]. Uważają oni, że podjednostka α_1 (VI) powstaje w formie dużego prekursora i podlega pozakomórkowej proteolizie. W przeciwieństwie do kolagenu innych typów, cząsteczki kolagenu typu VI ulegają wewnątrzkomórkowej agregacji i są wydzielane do przestrzeni pozakomórkowej w postaci tetrameru (Ryc. 3) [15].

Kolagen typu VI cechuje się wysokim stopniem glikozylacji [6]. Zawiera glukozaminę [6, 7]. Pomimo niskiej zawartości hydroksyproliny, temperatura denaturacji cieplnej kolagenu typu VI jest bliska tejże kolagenu typu I. Wynika to z obecności licznych mostków dwusiarczkowych zespalaających podjednostki tego białka. Redukcja mostków S-S powoduje spadek temperatury denaturacji cieplnej do wartości 31 – 35 °C [14, 17].

Zawartość kolagenu typu VI w tkankach jest trudna do oceny. Trüb i w s p. [14] uważają, że stosowane dotychczas metody izolowania kolagenu typu VI dają znikomy odzysk. Z 1 kg tkanki odzyskuje się około 10–60 mg kolagenu [18]. Zastosowanie ekstrakcji tkanek 6 M roztworem chlorowodoru guanidyny pozwala na zwielokrotnienie odzysku do 500 mg/kg tkanki. Kolagen typu VI jest więc, przynajmniej w niektórych tkankach (np. w rogówce), jednym z głównych typów kolagenu [10].

Otrzymano swoiste przeciwciała przeciwko kolagenowi typu VI. Nie reagują one krzyżowo z kolagenami innych typów. Pozwoliły one na ścisłą lokalizację tego białka. Powstaje ono w fibroblastach i w komórkach mięśni gładkich. Wykazano jego obecność w ścianach dużych naczyń, w nerkach, w skórze, w wątrobie i w mięśniach. Nie występuje w chrząstce ani w błonach podstawnych. Tworzy cienkie „bezpostaciowe” filamenty bez poprzecznego prążkowania [11].

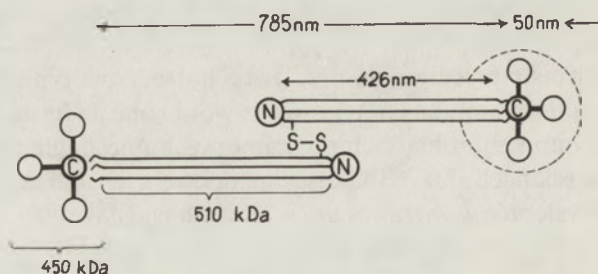
III-2. Kolagen typu VII

Kolagen typu VII został wyizolowany po raz pierwszy z produktów proteolizy ludzkich błon płodowych [19]. Jego względna masa cząsteczkowa wynosi około 510 000, jest więc najwyższa w porównaniu z kolagenami innych typów. Składa się z trzech jednakowych łańcuchów $\alpha_1(\text{VII})$, z których każdy wykazuje względną masę cząsteczkową 170 000 [20]. Są one połączone mostkami dwusiarczkowymi. Kolagen typu VII stanowi około 2 – 3% całkowitej ilości kolagenu błon płodowych. Z powodu dużej masy cząsteczkowej, nazwano to białko kolagenem LC („long chain collagen”). Długość cząsteczki wynosi około 450 nm. Około 90% długości cząsteczki jest objęte strukturą potrójnie helikalną. W środku cząsteczki występuje miejsce podatne na działanie pepsyny. Pod działaniem tego enzymu cząsteczka kolagenu typu VII rozpada się na dwa fragmenty podobnej wielkości [19].

Skład aminokwasowy kolagenu typu VII wykazuje pewne odrębności. W porównaniu z najlepiej poznanym kolagenem typu I, zawiera mniej glicyny, sporo cysteiny. Zawartość waliny jest dwukrotnie wyższa, a alaniny dwukrotnie niższa niż w łańcuchu $\alpha_1(\text{I})$. Zawiera dużo hydroksyproliny [19].

Późniejsze badania wykazały, że cząsteczki kolagenu typu VII są większe od tych, które izolowano z produktów proteolizy tkanek. Pod działaniem pepsyny dochodzi bowiem do strawiania znacznych fragmentów cząsteczki, nie objętych strukturą potrójnej helisy. Białko to jest syntetyzowane przez komórki nabłonkowe [21, 22]. Jego prekursorowa forma (prokolagen typu VII) jest białkiem o ogromnej masie cząsteczkowej. Ocenia się ją na około 1 000 000. Oprócz fragmentu potrójnie

helikalnego (omówiono wyżej), od strony końca karboksylowego i aminowego występują „niekolagenowe” obszary globularne, NC-1 i NC-2 [22]. W odróżnieniu od części potrójnie helikalnej fragmenty te są odporne na działanie kolagenazy bakteryjnej. Enzym ten trawi obszar potrójnie helikalny i uwalnia fragmenty NC-1 i NC-2 [22]. Fragment NC-1 ma masę cząsteczkową 450 kDa i składa się z trzech identycznych łańcuchów o masie cząsteczkowej 150 kDa, połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Badania mikroskopowe wykazały, że fragment NC-1 ma kształt kuli, od której odchodzą 3 ramiona. Prawdopodobnie każde z tych ramion jest utworzone przez oddzielny łańcuch [22] (Ryc. 4). Masa cząsteczkowa NC-2 jest oceniana na około 96-102 kDa [21].



Ryc. 4. Schemat dimeru kolagenu typu VII [22]. Linie równoległe przedstawiają potrójnie helikalne fragmenty cząsteczek. Fragmenty globularne NC - 1 obydwu cząsteczek oznaczono symbolem C. Fragmenty globularne NC - 2 oznaczono symbolem N.

Fragment NC-1 występuje zarówno w prekursorowej formie kolagenu typu VII (w prokolagenie), jak i w jego formie tkankowej. Ta ostatnia nie zawiera fragmentu NC-2. Należy sądzić, że przemiana prokolagenu typu VII w kolagen typu VII polega na proteolitycznym odłączeniu fragmentu NC-2. Fragment NC-1 w całości, lub jego znaczna część, przechodzi z formy prekursorowej do ostatecznej [21].

Cząsteczki prokolagenu typu VII ulegają pozakomórkowej dimeryzacji. Biorą w tym udział wiązania dwusiarczkowe. Powstanie dimerów ułatwiają fragmenty NC-2 (Ryc. 4). Po wytworzeniu dimerów fragmenty te ulegają odłączeniu [21]. Po redukcji mostków dwusiarczkowych dimery rozpadają się do monomerów, a odtworzenie dimerów jest niemożliwe nawet po usunięciu czynnika redukującego. Pozwala to sądzić, że fragmenty NC-2 są niezbędne do procesu dimeryzacji [21].

Lunstrum i wsp. [21] uważają, że tkankowa forma kolagenu typu VII ma masę cząsteczkową około 960 000. W trakcie preparatyki kolagenu typu VII z udziałem pepsyny fragment NC-1 ulega proteolizie, pozostaje jedynie człon potrójnie helikalny. Wielocząsteczkowy produkt proteolizy staje się rozpuszczalny w rozcieńczonym kwasie octowym.

Wykazano, że kolagen typu VII jest głównym składnikiem oddzielnych elementów ultrastrukturalnych, tzw. „włókien kotwiczących” („anchoring fibrils”). Włókna te są prążkowanymi strukturami o długości około 800 nm

zlokalizowanymi w warstwie podpodstawnej (lamina subbasalis) niektórych tkanek. Stabilizują one przyleganie błony podstawnej do leżącego pod nią podścieliska poprzez tworzenie włóknistej sieci, która „usidla” różne elementy tkanki łącznej i wnika bezpośrednio do „lamina densa” [22, 23].

III-3. Kolagen typu VIII

Kolagen typu VIII został wyizolowany po raz pierwszy z hodowli komórek śródbłonkowych aorty bydłowej, stąd wywodzi się jego nazwa „kolagen endotelialny” („endothelial collagen”, w skrócie EC) [24]. Jego obecność wykazano także w błonie Descemeta [25] oraz w hodowlach komórek pochodzących z ludzkich nowotworów, jak gwiaździak (astrocytoma) [26], mięsak Ewinga, gruczolakorak (adenocarcinoma) i rak pierwotny wątroby (carcinoma hepatocellulare) [27].

Cząsteczka tego kolagenu składa się z trzech jednakowych łańcuchów $\alpha_1(\text{VIII})$. Masa cząsteczkowa kolagenu typu VIII jest trudna do oznaczenia. Z materiału biologicznego wyizolowano 3 łańcuchy: EC-1 (m.c.z. 177 000) EC-2 (m.c.z. 125 000) oraz EC-3 (m.c.z. 100 000) [24, 28]. Produktem biosyntezy jest prawdopodobnie łańcuch EC-1, a pozostałe są produktami częściowej proteolizy tego łańcucha [29]. Łańcuch EC-1 uważa się za identyczny z podjednostką $\alpha_1(\text{VIII})$ [29].

Potrójnie helikalna struktura przestrzenna kolagenu typu VIII nie jest ciągła. Na przemian występują fragmenty o strukturze kolagenowej i „niekolagenowej” [29, 30]. Białko to zawiera cysteinę, lecz nie posiada mostków dwusiarczkowych [4].

Cząsteczka kolagenu typu VIII, o masie cząsteczkowej około 500 000 składa się z trzech równych fragmentów trójspiralnych rozdzielonych dwoma fragmentami o innej strukturze przestrzennej [29]. Trawienie pepsyną uwalnia z kolagenu typu VIII fragmenty potrójnie helikalne, złożone z łańcuchów o masie cząsteczkowej około 50 000, natomiast trawienie kolagenazą bakteryjną powoduje degradację fragmentów kolagenowych (potrójnie helikalnych) i uwalnia fragmenty „niekolagenowe” o masie cząsteczkowej około 10 000 [28, 29].

Potrójnie helikalne („kolagenowe”) fragmenty kolagenu typu VIII, pomimo równych mas cząsteczkowych, są niejednakowe. Z produktów ograniczonej proteolizy błon Descemeta pepsyną, wyizolowano 2 polipeptydy o masie cząsteczkowej 50 000. Różnią się one znacznie składem i sekwencją aminokwasową [4].

Potrójnie helikalne fragmenty kolagenu typu VIII są odporne na działanie kolagenazy tkankowej, podczas gdy kolagenaza bakteryjna trawi je do produktów drobnocząsteczkowych. Są one częściowo trawione przez trypsynę, chymotrypsynę i proteazę wyizolowaną z komórek tucznych [28]. Przemawia to za odmiennością ich struktury w porównaniu z kolagenami innych typów [28].

Odmienny pogląd na temat struktury kolagenu typu VIII reprezentują Beny i Padilla [31]. Uważają oni, że cząsteczka tego białka składa się z 3 łańcuchów $\alpha_1(\text{VIII})$ o masie cząsteczkowej 61 000. Produkty o masie 120 000 (EC-2) i 180 000 (EC-1) miałyby być dimerami i trimerami podjednostek $\alpha_1(\text{VIII})$. Tworzą one

ciągłą, potrójnie helikalną strukturę, a obszary globularne znajdują się na obu końcach cząsteczki [31]. Podjednostki te są zespolone dość trwałymi wiązaniami niekowalencyjnymi, odpornymi na działanie SDS, lecz rozpadającymi się w kwaśnym środowisku. Oprócz nich występują międzylańcuchowe wiązania kowalencyjne. Ten pogląd na strukturę kolagenu typu VIII jest jednak odosobniony. Powszechnie uważa się, że kolagen typu VIII jest białkiem o wysokiej masie cząsteczkowej [11, 32].

III-4. Kolagen typu IX

Kolagen typu IX występuje wyłącznie w chrząstce [33 – 35]. Jego cząsteczka jest heterotrimerem o składzie $\alpha_1(\text{IX})$, $\alpha_2(\text{IX})$, $\alpha_3(\text{IX})$. Poszczególne łańcuchy są zespolone mostkami dwusiarczkowymi [34].

Izolowanie nienaruszonej cząsteczki kolagenu typu IX jest bardzo trudne, ponieważ zastosowanie ograniczonej proteolizy chrząstki pepsyną prowadzi do jego częściowej degradacji [36]. Kolagen typu IX został wyizolowany po raz pierwszy w postaci wielocząsteczkowych produktów degradacji, to jest fragmentów: HMW (high molecular weight) i LMW (low molecular weight) [37 – 40], określonych też symbolami M_1 i M_2 [41].

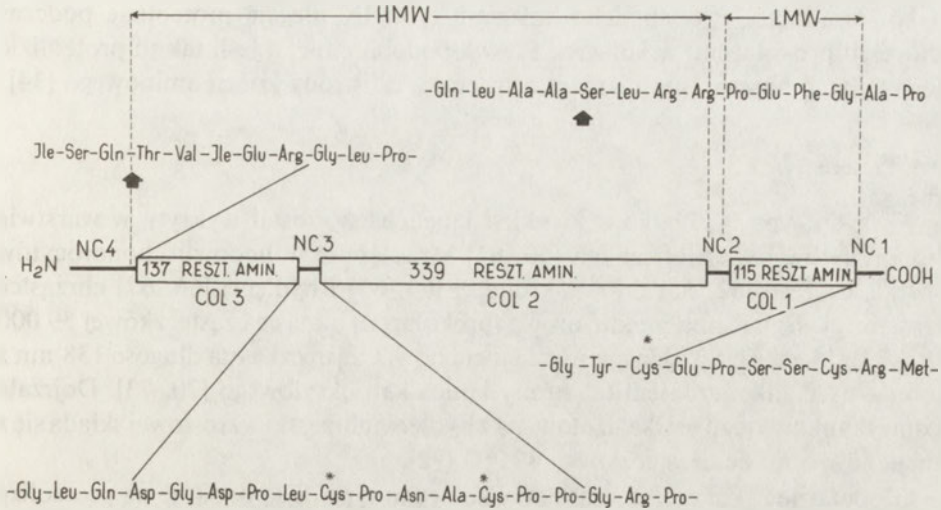
Jest to spowodowane faktem, iż potrójnie helikalna struktura kolagenu typu IX nie jest ciągła. Fragmenty o strukturze kolagenowej „Col” są przerwane fragmentami „NC”, o strukturze „niekolagenowej”. Zrekonstruowano model łańcucha $\alpha_1(\text{IX})$. Jak wynika z Ryc. 5, łańcuch $\alpha_1(\text{IX})$ zawiera 4 fragmenty niekolagenowe: NC-1, NC-2, NC-3, NC-4. Między nimi znajdują się 3 fragmenty kolagenowe: Col-1, Col-2, i Col-3 [34, 42]. Pod działaniem pepsyny zostają „wycięte” fragmenty HMW i LMW.

Łańcuch $\alpha_2(\text{IX})$ wiąże kowalencyjnie jeden lub dwa łańcuchy siarczanu chondroityny lub siarczanu dermatanu [43, 44]. Miejscem wiązania łańcucha cukrowego jest fragment NC-3 łańcucha $\alpha_2(\text{IX})$ [45]. Kolagen typu IX jest więc proteoglikanem. Okazał się substancją identyczną z opisanym wcześniej proteoglikanem PG-Lt [46 – 48].

Łańcuch glikoaminoglikanowy jest odłączany od kolagenu typu IX pod działaniem chondroitynazy [48]. Oprócz łańcucha glikoaminoglikanowego białko to zawiera inny łańcuch wielocukrowy, znakujący się radioaktywną mannozą (nie występującą w glikoaminoglikanach). Wiąże się on z białkiem poprzez asparaginę [48].

Aminokwasem wiążącym łańcuch glikoaminoglikanowy jest seryna występująca w sekwencji Val-Glu-Gly-Ser-Ala-Asp [49, 50]. W innych proteoglikanach glikozylacji podlega reszta Ser w sekwencji Ser-Gly. Pierwszym cukrem wiążącym się z Ser jest ksyloza. Proces ten jest katalizowany przez ksylozylotransferazę [49]. Następnym cukrem jest galaktoza włączona przez galaktozylotransferazę [51].

β -ksylozydy są inhibitorami kompetycyjnymi reakcji wiązania galaktozy przez ksylozowany rdzeń białkowy proteoglikanów. Wykazano, iż β -ksylozydy nie



Ryc. 5. Schemat łańcucha α_1 (IX). Rozmieszczenie obszarów potrójnie helikalnych „Col” i globularnych „NC”. Przedstawiono sekwencję aminokwasową fragmentów NC. Strzałki wskazują miejsca podatne na proteolityczne działanie pepsyny. Gwiazdkami oznaczono reszty cysteiny uczestniczące w tworzeniu międzyłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych [34].

hamują reakcji syntezy łańcucha glikoaminoglikanowego kolagenu typu IX. Pozwala to sądzić, że wiązanie składników cukrowych przez kolagen typu IX zachodzi inaczej, niż w innych proteoglikanach [51].

Masa cząsteczkowa kolagenu typu IX wynosi około 300 kDa i jest większa od sumy mas cząsteczkowych poszczególnych podjednostek. Wynoszą one α_1 (IX) – 84 kDa, α_2 (IX) – 115 kDa i α_3 (IX) – 68 kDa. Wynika to z faktu, iż łańcuch α_2 (IX) wiąże glikoaminoglikan. Pozbawiony tego składnika wykazuje masę cząsteczkową 68 kDa [43, 48, 52 – 54].

Kolagen typu IX wykazuje skłonność do wiązania się z różnymi powierzchniami, jak szkło, plastik, materiały stosowane w chromatografii. Ma to prawdopodobnie istotne znaczenie fizjologiczne. Zdolność tę wykazuje przede wszystkim łańcuch α_1 (IX) [43].

Kolagen typu IX towarzyszy kolagenowi typu II. Ten ostatni tworzy sieć przestrzenną krzyżujących się włókien. Kolagen typu IX występuje w miejscu krzyżowania się włókien kolagenu typu II [55]. Przypisuje się mu rolę czynnika zespalającego włókna kolagenu typu II i zapobiegającego jego nadmiernej, bocznej agregacji [55]. Eyre i wsp. [56] wykazali, że kolageny wymienionych typów łączą się ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi. „In vitro” kolagen typu II, pozbawiony kolagenu typu IX, tworzy inne niż w chrząstce, grube włókniste agregaty [57]. Ponadto kolagenowi typu IX przypisuje się rolę czynnika zespalającego kolagen z proteoglikanami chrząstki. W chrząstce embrionów kurzych, białko to jest rozmieszczone równomiernie [55], natomiast w chrząstce ssaków występuje głównie w przestrzeni okołokomórkowej chondrocytów [58, 59].

Nie wiadomo, czy łańcuchy kolagenu typu IX ulegają proteolizie podczas konwersji prokolagenu w kolagen. Prawdopodobnie nie, a jeśli tak to proteolizie ulega jedynie nieznaczny fragment cząsteczki, od strony końca aminowego [34].

III-5. Kolagen typu X

Kolagen typu X, białko o krótkich łańcuchach, został wykryty w warstwie chondrocytów hipertroficznycych [60, 61] a następnie w hodowli chondrocytów mostka kurzego [62, 63] oraz w króliczej [64, 65] i bydłowej [66, 67] chrząstce wzrostowej. Jego forma prekursorowa (prokolagen) o masie cząsteczkowej 59 000 [68–72] składa się z 3 identycznych łańcuchów. Cząsteczka ma długość 138 nm z globularnym zakończeniem od strony końca karboksylowego [70, 73]. Dojrzała postać tkankowa tego białka, izolowana z bydłowej chrząstki wzrostowej składa się z łańcuchów o masie cząsteczkowej 49 000 [72].

Globularne zakończenia cząsteczki kolagenu typu X są podatne na proteolizę pepsyną. Pod jej działaniem uwalnia się fragment potrójnie helikalny złożony z łańcuchów o masie cząsteczkowej 45 000 [74]. Kolagen typu X jest trawiony przez kolagenazę tkankową inaczej, niż kolageny innych typów. Cząsteczka tego białka zawiera 2 miejsca podatne na działanie kolagenazy tkankowej (kolageny innych typów mają 1 takie miejsce). Pod działaniem tego enzymu kolagen typu X rozpada się na 3 fragmenty wielkocząsteczkowe [70]. Kolagen typu X wykazuje znaczną termostabilność. Temperatura denaturacji termicznej tego białka jest około 7–10° wyższa niż kolagenów typu II i IV. Przyczyny tego zjawiska nie są znane [75, 76].

Kolagenowi typu X przypisuje się skład podjednostkowy $[\alpha_1(X)]_3$. Istnieją wątpliwości, czy w potrójnie helikalnym obszarze cząsteczki kolagenu typu X występują międzyłańcuchowe wiązania dwusiarczkowe. Ich obecność wykryto jedynie w chrząstce bydłowej [66, 67, 72]. Nie ma ich natomiast w kolagenie chrząstki kurczęcia i królika [64, 71]. Łańcuch $\alpha_1(X)$ prokolagenu typu X składa się z 680 reszt aminokwasowych o poznanej sekwencji [77]. Obszar potrójnie helikalny obejmuje 460 reszt aminokwasowych. Duży, C-końcowy fragment „niekolagenowy” obejmuje 170 a mały N-końcowy obszar „niekolagenowy” obejmuje 50 reszt aminokwasowych [77].

Przeciwciała monoklonalne pozwoliły na poszukiwania kolagenu typu X w różnych tkankach i narządach. Obecność tego białka wykazano jedynie w kostniejących obszarach chrząstki mostka [78], okolicy stawu skokowego, kręgow i struny grzbietowej [58, 79]. W chrząstce mostkowej 19-dniowego kurczęcia kolagen typu X jest obecny w dogłowej części mostka (części kostniejącej), nie występuje w części ogonowej, która pozostaje chrząstkowa [80–83].

Chondrocyty po transformacji wirusowej tracą zdolność do syntezy kolagenu typu X [66, 74, 84]. Podobne zjawisko obserwowano w starzejących się hodowlach chondrocytów oraz w hodowlach tych komórek poddanych działaniu bromodezoksyurydyny [85]. Chondrocyty hodowane *in vitro* zawsze syntetyzują kolagen

typu II i tylko niekiedy (zależnie od składu podłoża) kolagen typu X [86]. Zdolność chrząstki do produkcji kolagenu typu X zmienia się w trakcie rozwoju osobniczego [74, 83]. Nie jest on syntetyzowany przez wczesne formy rozwojowe chrząstki. Występuje jedynie w miejscu i w okresie kostnienia chrząstki [74, 83]. W chrząstce 17 dniowego embrionu kurzego, kolagen typu X jest najobficiej syntetyzowanym kolagenem. Poziom odpowiedniego m RNA jest wtedy najwyższy. W późniejszym okresie zawartość tego białka w chrząstce mostka maleje. Przewagę uzyskuje kolagen typu II. Stosunek kolagenu typu X do II ustala się osiągając wartość 1:15 [74]. Kolagen typu X pojawia się także w bliznach kostnych w przebiegu gojenia się złamań [87].

III-6. Kolagen typu XI

Białko to zostało wykryte w ludzkiej chrząstce szklistej [88, 89], a następnie w kurzej chrząstce mostkowej [90]. Dla odróżnienia od kolagenów innego typu łańcuchom tego białka przypisano symbole 1α , 2α i 3α [88, 90]. Ich masy cząsteczkowe, właściwości chromatograficzne oraz skład aminokwasowy wskazują na podobieństwo kolagenu typu XI do innych kolagenów. Podjednostka 1α jest podobna do łańcucha $\alpha_1(V)$, a podjednostka 2α do łańcucha $\alpha_2(V)$. Podjednostka 3α jest natomiast zbliżona składem aminokwasowym i właściwościami chromatograficznymi do łańcucha $\alpha_1(II)$ [90]. W chrząstce ludzkiej podjednostki 1α , 2α i 3α , występują w relacjach ilościowych 1:1:1 [88].

Pozwala to sądzić, że cząsteczka kolagenu typu XI składa się z trzech wyżej wymienionych podjednostek [91–95]. Nie jest jednak wykluczone, że podjednostki kolagenu typu XI mogą występować w innych kombinacjach [90–95].

Wszystkie trzy podjednostki kolagenu typu XI są odporne na działanie kolagenazy tkankowej [93].

Z hodowli chondrocytów wyizolowano prekursorową postać kolagenu typu XI. Składa się on z 3 podjednostek pro 1α , pro 2α , pro 3α , zespolonych mostkami dwusiarczkowymi. Ich masa cząsteczkowa waha się w granicach od 170 000 do 200 000. Są więc one większe od podjednostek pro $\alpha_1(II)$ [94]. Pod działaniem chymotrypsyny uwalniają się podjednostki 1α , 2α , 3α wolne od mostków dwusiarczkowych. Morris i Bachinger [95] proponują określenie tych podjednostek symbolami $\alpha_1(XI)$, $\alpha_2(XI)$, $\alpha_3(XI)$.

Kolagen typu XI występuje w bezpośrednim sąsiedztwie chondrocytów [96, 97]. Białko to wykazuje zdolność interakcji z substancjami wielkocząsteczkowymi o charakterze polianionowym np. z heparyną [98] a także z proteoglikanami chrząstki [99, 100]. Ma to prawdopodobnie istotne znaczenie w konstrukcji substancji międzykomórkowej chrząstki. Około komórkowe rozmieszczenie kolagenu typu XI sprzyja więc wiązaniu proteoglikanów w sąsiedztwie chondrocytów. Nie jest wykluczony mechanizm odwrotny. W obu przypadkach efekt końcowy byłby ten sam. Wokół chondrocyta wytwarza się substancja międzykomórkowa zbudowana z kompleksu proteoglikanów z kolagenem typu XI [98].

III-7. Kolagen typu XII

Z produktów trawienia ścięgien embrionów kurzych pepsyną wyizolowano dwa kolagenowe produkty o masie cząsteczkowej 32 000 i 46 000. Pierwszy z nich rozpadał się w wyniku redukcji i alkilacji na podjednostki o masie cząsteczkowej 10 kDa. Produkty te stanowią około 0,5% kolagenu ścięgien embrionu kurzego. Ich właściwości fizykochemiczne nie odpowiadają żadnemu ze znanych typów kolagenu. Uznano je za produkty degradacji nieznanego dotąd białka kolagenowego, któremu przypisano nazwę kolagenu typu XII. Nie jest znany skład podjednostkowy ani masa cząsteczkowa tego białka. Wykazuje ono pewne podobieństwo do kolagenu typu IX. Nie jest wiadomo, czy wiąże ono łańcuchy proteoglikanowe [101, 102].

IV. Patofizjologiczne znaczenie polimorfizmu molekularnego kolagenu

Jak wynika z powyższego kolagen stanowi dość liczną rodzinę genetycznie odmiennych białek. Prawdopodobnie kolagen każdego typu pełni inną funkcję. Przemawia za tym obecność kolagenu różnych typów w różnych strukturach pozakomórkowych. Zależnie od rodzaju tworzonych przez kolageny struktur histologicznych *Burgeson* [1] wyróżnia 4 ich grupy. Pierwsza z nich (kolageny typu I i III, a w chrząstce kolagen typu II) tworzy system dużych, prążkowanych włókien. Druga grupa to kolageny tworzące system małych włókien, bez charakterystycznego dla poprzednich prążkowania. Zalicza się do niej kolageny typu V i VI, a w chrząstce kolagen typu XI. Trzecią grupę stanowią kolageny uczestniczące w budowie struktur specjalnych, jak: błony podstawne (kolagen typu IV) lub włókienka kotwiczące (kolagen typu VII). Czwartą grupę stanowią kolageny, które nie mają odpowiednika strukturalnego. Zalicza się tu: kolagen typu VIII, a w chrząstce kolagen typu IX i X.

Dla prawidłowego funkcjonowania narządów, zawierających tkankę łączną, potrzebna jest nie tylko odpowiednia zawartość kolagenu, lecz także określone relacje ilościowe poszczególnych kolagenów. W przebiegu niektórych procesów chorobowych (np. zwłóknienie płuca, marskość wątroby, zwyrodnienie kostnowstawowe) dochodzi nie tylko do wzrostu zawartości kolagenu, lecz także do naruszenia wzajemnych relacji ilościowych pomiędzy różnymi kolagenami.

*Artykuł otrzymano 5 listopada 1988 r.
Zaakceptowano do druku 20 stycznia 1989 r.*

PIŚMIENNICTWO

1. *Burgeson R. E.*, (1987), *Current Problems in Dermatology*, **17**, 61–75.
2. *Bachinger H. P.*, *Fessler L. I.*, *Timpl R.*, *Fessler J. H.*, (1981), *J. Biol. Chem.*, **17**, 13193–13199.
3. *Krieg T.*, *Horlein D.*, *Wiestner M.*, *Muller P. K.*, (1978), *Archs. Derm. Res.*, **263**, 171–180.

4. Miyahara M., Hayashi K., Berger J., Tanzawa K., Njieha F.K., Trelstad R. L., Prockop D. J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9891–9898.
5. Bańkowski E., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, 301–330.
6. Furuto D. K., Miller E. J., (1980), *J. Biol. Chem.* **255**, 290–295.
7. Jander R., Rauterberg J., Glanville R. W., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **133**, 39–46.
8. Schreier T., Winterhalter K. H., Trueb B., (1987), *FEBS Letters*, **213** (2), 319–323.
9. Trüeb B., Bornstein P., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8597–8604.
10. Zimmermann D. R., Trüeb B., Winterhalter K. H., Witmer R., Fisher R. W., (1986), *FEBS Letters*, **197**, 55–58.
11. Von der Mark H., Aumailley M., Wick G., Fleischmajer R., Timpl R., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **142**, 493–502.
12. Heller-Harrison R. A., Carter W. G., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6858–6864.
13. Ayad S., Chambers C. A., Berry L., Shuttleworth C. A., Grant M. E., (1986), *Biochem. J.*, **236**, 299–302.
14. Trüeb B., Schreier T., Bruckner P., Winterhalter K. H., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **166**, 699–703.
15. Engvall E., Hessle H., Klier G., (1986), *J. Cell Biol.*, **102**, 703–710.
16. Hessle H., Engvall E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3955–3961.
17. Trüeb B., Winterhalter K., (1986), *EMBO J.*, **5**, 2815–2819.
28. Odermatt E., Risteli J., van Delden V., Timpl R., (1983), *Biochem. J.*, **211**, 295–302.
19. Bentz H., Morris N. P., Murray L. W., Sakai L. Y., Hollister D. W., Burgeson R. E., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3168–3172.
20. Burgeson R. E., Morris N. P., Murray L. W., Duncan K. G., Keene D. R., Sakai L. Y., (1986), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **460**, 47–57.
21. Lunstrum G. P., Kuo H. J., Rosenbaum L. M., Keene D. R., Glanville R. W., Sakai L. Y., Burgeson R. E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 13706–13712.
22. Lunstrum G. P., Sakai L. Y., Keene D. R., Morris N. P., Burgeson R. E., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9042–9048.
23. Keene D. R., Sakai L. Y., Lunstrum G. P., Morris N. P., Burgeson R. E., (1987), *J. Cell Biol.*, **104**, 611–621.
24. Sage H., Pritzl P., Bornstein P., (1980), *Biochemistry*, **19**, 5747–5755.
25. Labermeier U., Kenney M. C., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 619–625.
26. Alitalo K., Bornstein P., Vaheri A., Sage H., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2653–2661.
27. Sage H., Balian G., Vogel A. M., Bornstein P., (1984), *Lab. Invest.*, **50**, 219–231.
28. Kopoor R., Bornstein P., Sage H., (1986), *Biochemistry*, **25**, 3930–3937.
29. Sage H., Trüeb B., Bornstein P., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 13391–13401.
30. Sage H., Pritzl P., Bornstein P., (1981), *Arteriosclerosis*, **1**, 427–442.
31. Benya P. D., Padilla S. R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 4160–4169.
32. Uitto J., Murray L. W., Blumberg B., Shamban A., (1986), *Ann. Intern. Med.*, **105**, 740–756.
33. Morris N. P., Keene D. R., Glanville R. W., Bentz H., Burgeson R. E., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 5638–5644.
34. Van der Rest M., Mayne R., Ninomiya Y., Seidah N. G., Chretien M., Olsen B. R., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 220–225.
35. Mayne R., van der Rest M., Weaver D. C., Butler W. T., (1985), *J. Cell. Biochem.*, **27**, 133–141.
36. Yasui N., Benya P. D., Nimni M. E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14175–14179.
37. Reese C. A., Mayne R., (1981), *Biochemistry*, **20**, 5443–5448.

38. Reese C.A., Wiedemann H., Kuhn K., Mayne R., (1982), *Biochemistry*, **21**, 826–830.
39. Mayne R., van der Rest M., Ninomiya Y., Olsen W.R., (1987), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **450**, 38–46.
40. Irwin M.H., Silvers S.H., Mayne R., (1985), *J. Cell. Biol.*, **101**, 814–823.
41. Von der Mark K., van Menxel M., Wiedemann H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 57–62.
42. Ninomiya Y., Olsen B.R., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3014–3018.
43. Huber S., van der Rest M., Bruckner P., Rodriguez E., Winterhalter K.H., Vaughan L., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 5965–5968.
44. Konomi H., Seyer J.M., Ninomiya Y., Olsen B.R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 6742–6746.
45. Irwin M.H., Mayne R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 16281–16283.
46. Noro A., Kimata K., Oike Y., Shinomura T., Maeda N., Yano S., Takahashi N., Suzuki S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9323–9331.
47. Vaughan L., Winterhalter K.H., Bruckner P., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 4758–4763.
48. Bruckner P., Vaughan L., Winterhalter K.H., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2608–2612.
49. Mc Cormick D., van der Rest M., Goodship J., Lozano G., Ninomiya Y., Olsen B.R., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4044–4048.
50. Huber S., Winterhalter K.H., Vaughan L., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 752–756.
51. Chandrasekhar S., Harvey A.K., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 1040–1046.
52. Bruckner P., Mayne R., Tuderman L., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **136**, 333–339.
53. Gibson G.J., Kielty C.M., Carner C., Schor S.L., Grant M.E., (1983), *Biochem. J.*, **211**, 417–426.
54. Von der Mark K., van Menxel M., Wiedeman H., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **138**, 629–633.
55. Muller-Glauser W., Humbel B., Glatt M., Strauli P., Winterhalter K.H., Bruckner P., (1983), *J. Cell. Biol.*, **102**, 1931–1939.
56. Eyre D.R., Apon S., Wu J.J., Ericsson L.H., Walsh K.A., (1987), *FEBS Letters*, **220**, 337–341.
57. Lee S.L., Piez K.A., (1983), *Collagen Relat. Res.*, **3**, 89–103.
58. Hartmann D.J., Magloire H., Ricard-Blum S., Joffre A., Couble M.L., Ville G., Herbage D., (1983), *Collagen Relat. Res.*, **3**, 349–357.
59. Ricard-Blum S., Hartmann D.J., Herbage D., Payen-Meyran C., Ville G., (1982), *FEBS Letters*, **146**, 343–347.
60. Kwan A.P.L., (1986), *Biosci. Rep.*, **6**, 155–162.
61. Kielty C.M., Kwan A.P.L., Holmes D.F., Schor S.L., Grant M.E., (1985), *Biochem. J.*, **27**, 545–554.
62. Gibson G.J., Schor S.L., Grant M.E., (1982), *J. Cell. Biol.*, **93**, 767–774.
63. Castagnola P., Torella G., Cancedda R., (1987), *Devel. Biol.*, **123**, 332–337.
64. Remington M.C., Bashey R.I., Brighton C.T., Jimenez S.A., (1983), *Collagen Relat. Res.*, **3**, 271–278.
65. Sussman M.D., Ogle R.C., Balian G., (1984), *J. Orthop. Res.*, **2**, 134–142.
66. Grant W.T., Sussman M.D., Balian G., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 3798–3803.
67. Remington M.C., Bashey R.I., Brighton C.T., Jimenez S.A., (1984), *Biochem. J.*, **224**, 227–233.
68. Schmid T.M., Conrad H.E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12444–12450.
69. Schmid T.M., Conrad H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12451–12457.
70. Schmid T.M., Mayne R., Jeffrey J.J., Linsenmayer T.F., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 4184–4189.

71. Schmid T. M., Linsenmayer T. F., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9504–9509.
72. Ayad S., Kwan A. P. L., Grant M. E., (1987), *FEBS Letters*, **220**, 181–186.
73. Schmid T. M., Mayne R., Bruns R. R., Linsenmayer T. F., (1984), *J. Ultrastruct. Res.*, **86**, 186–191.
74. Cancedda R., Capasso O., Castagnola P., Descaizi-Cancedda F., Quarto N., (1985), *J. Cell. Biochem.*, **28**, 7–14.
75. Schmid T. M., Linsenmayer T. F., (1984), *Biochemistry*, **23**, 553–558.
76. Linsenmayer T., Gibney E., Schmid T. M., (1986), *Exp. Cell. Res.*, **166**, 15–22.
77. Ninomiya Y., Gordon M., van der Rest M., Schmid T., Linsenmayer T., Olsen B. R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 5041–5050.
78. Reginato A. M., Lash J. W., Jimenez S. A., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 2897–2904.
79. Schmid T. M., Linsenmayer T. F., (1985), *J. Cell. Biol.*, **100**, 598–605.
80. Gibson G. J., Beaumont B. W., Flint M. H., (1984), *J. Cell. Biol.*, **99**, 208–216.
81. Gibson G. J., Flint M. H., (1985), *J. Cell. Biol.*, **101**, 277–284.
82. Capasso O., Gionti E., Pontarelli G., Ambesi-Impiombato F., Nitsch S., Tajana G., Cancedda R., (1982), *Exp. Cell. Res.*, **142**, 197–206.
83. Capasso O., Tajana G., Cancedda R., (1984), *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1163–1168.
84. Gionti E., Capasso O., Cancedda R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7190–7194.
85. Mayne R., Elrod B. W., Mayne P. M., Sanderson R. D., Linsenmayer T. F., (1984), *Exp. Cell. Res.*, **151**, 171–182.
86. Solursh M., Jensen K. L., Reiter R. S., Schmid T. M., Linsenmayer T. F., (1986), *Develop. Biol.*, **117**, 90–101.
87. Grant W. T., Wang G. J., Balian G., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 9844–9849.
88. Burgeson R. E., Hollister D. W., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 1124–1131.
89. Burgeson R. E., Hebda P. A., Morris N. P., Hollister D. W., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7852–7865.
90. Von der Mark K., van Menxel M., Wiedemann H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 57–62.
91. Furuto D. K., Miller E. J., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **226**, 604–611.
92. Ayad S., Weiss J. B., (1984), *Biochem. J.*, **218**, 835–840.
93. Eyre D. R., Wu J. J., Woolley D. E., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 724–729.
94. Clark Ch. C., Richards Ch. F., (1985), *Collagen Rel. Res.*, **5**, 205–223.
95. Morris N. P., Bachinger H. P., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 11345–11350.
96. Shimokamaki M., Duance V. C., Bailey A. J., (1980), *Biosci. Rep.*, **1**, 561–570.
97. Duance V. C., Shimokomaki M., Bailey A. J., (1982), *Biosci. Rep.*, **2**, 223–227.
98. Smith G. N., Brandt K. D., (1987), *Collagen Rel. Res.*, **7**, 315–321.
99. Smith G. N., Williams J. M., Brandt K. D., (1985), *J. Biol. Chem.* **260**, 10761–10768.
100. Smith G. N., Williams J. M., Brandt K. D., (1987), *Collagen Rel. Res.*, **7**, 17–25.
101. Gordon M. K., Gerecke D. R., Olsen B. R., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6040–6044.
102. Dublet B., van der Rest M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 17724–17727.

1. ...
 2. ...
 3. ...
 4. ...
 5. ...
 6. ...
 7. ...
 8. ...
 9. ...
 10. ...
 11. ...
 12. ...
 13. ...
 14. ...
 15. ...
 16. ...
 17. ...
 18. ...
 19. ...
 20. ...
 21. ...
 22. ...
 23. ...
 24. ...
 25. ...
 26. ...
 27. ...
 28. ...
 29. ...
 30. ...
 31. ...
 32. ...
 33. ...
 34. ...
 35. ...
 36. ...
 37. ...
 38. ...
 39. ...
 40. ...
 41. ...
 42. ...
 43. ...
 44. ...
 45. ...
 46. ...
 47. ...
 48. ...
 49. ...
 50. ...
 51. ...
 52. ...
 53. ...
 54. ...
 55. ...
 56. ...
 57. ...
 58. ...
 59. ...
 60. ...
 61. ...
 62. ...
 63. ...
 64. ...
 65. ...
 66. ...
 67. ...
 68. ...
 69. ...
 70. ...
 71. ...
 72. ...
 73. ...
 74. ...
 75. ...
 76. ...
 77. ...
 78. ...
 79. ...
 80. ...
 81. ...
 82. ...
 83. ...
 84. ...
 85. ...
 86. ...
 87. ...
 88. ...
 89. ...
 90. ...
 91. ...
 92. ...
 93. ...
 94. ...
 95. ...
 96. ...
 97. ...
 98. ...
 99. ...
 100. ...

Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Chronicle of the Polish Biochemical Society

W dniach od 13 do 16 września odbył się w Toruniu XXV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Podczas Zjazdu w dniu 14 września odbyło się XIII Walne Zebranie Członków Towarzystwa, na którym sprawozdanie z działalności w okresie XII kadencji złożył prezes doc. dr Zofia Poremska. Walne zebranie wybrało nowe władze Towarzystwa.

Sprawozdanie ustępującego Zarządu oraz skład nowych Władz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w załączeniu.

Sprawozdanie z działalności Zarządu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w XII Kadencji 1987—1989

W XII Kadencji Polskie Towarzystwo Biochemiczne liczyło około 1400 członków, zgrupowanych w 12 Oddziałach. 150 członków, którzy z różnych powodów zalegali ze składkami zostało przeniesionych w poczet tzw. członków biernych, tracąc jednocześnie część przywilejów jak ulgi w prenumeracie *Postępów Biochemii*, opłatach za uczestnictwo w zjazdach itp. Pozostali 1250 osób płaci składkę regularnie, jej wysokość w minionej kadencji wynosiła 500 zł. Podjęto wstępne prace w celu przygotowania elektronicznej listy członków naszego Towarzystwa.

Budżet finansowy Towarzystwa w obecnej chwili jest równy około 800.000 zł i jest całkowicie dotowany przez Polską Akademię Nauk. Dotacje PAN wpływają regularnie, jednak ich wysokość z trudem pokrywa najniezbędniejsze wydatki Zarządu (wynagrodzenia dwóch urzędniczek, roczne nagrody, delegacje i przesyłki).

Zarząd Główny urzędował stale, dyżurując w lokalu Towarzystwa Chemicznego przy ul. Freta 16, raz na tydzień, we wtorki. Plenarne zebrania Zarządu Głównego odbywały się raz na kwartał. Uczestniczyli w nich oprócz członków Zarządu pełnomocnicy, przewodniczący Oddziałów oraz organizatorzy dorocznych Zjazdów.

W bieżącej kadencji ważniejszymi uchwałami dotyczącymi zadań statutowych było:

— uchwalenie reguł powoływania pełnomocników oraz określenie zakresu ich działania. Dotyczyło to funkcji redaktora *Postępów Biochemii*, redaktora *Monografii*, redaktora *Listów do członków Towarzystwa* oraz przewodniczącego Komisji do spraw nomenklatury i sekcji historycznej.

— sformułowania i uchwalenia zmian w regulaminie nadawania nagrody im. J. Parnasa, zobowiązującej laureata do przedstawienia nagrodzonej pracy przynajmniej w dwóch ośrodkach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

— ustalenie reguł nadawania tytułu członka Honorowego Towarzystwa.

— podwyższenie składki członkowskiej z 200 zł na 500 zł oraz uzależnienie jej wysokości od wartości bieżącego kursu dolara.

Głównym celem Towarzystwa, określonym przez Statut jest popieranie rozwoju biochemii, popularyzacja jej osiągnięć oraz integracja środowiska biochemicznego.

Zarząd Główny XII Kadencji starał się realizować te cele poprzez:

— Działalność wydawniczą: *Postępy Biochemii* i *Monografie*

- Premiowanie najwartościowszych osiągnięć naukowych w postaci nagród im. prof. Jakuba Parnasa, im. prof. Bolesława Skarżyńskiego, im. prof. Włodzimierza Mozołowskiego;
- Popularyzację staży naukowych krajowych i zagranicznych fundowanych przez FEBS;
- Integrację środowiska biochemicznego poprzez redakcję Listów do Członków;
- Organizację doroczných zjazdów Towarzystwa;
- Inspirowanie i popieranie organizacji monotematycznych sesji;
- Popularyzację zebrań oddziałowych;
- Inspirowanie i wspomaganie organizacji spotkań dydaktycznych;

Działalność wydawnicza: Kwartalnik „Postępy Biochemii”, dzięki prof. Zofii Zielińskiej naczelnemu redaktorowi, doc. Grażynie Palamarczyk i doc. Andrzejowi Jerzmanowskiemu oraz mgr Małgorzacie Szyszko sekretarzowi redakcji, rozwijał się pomyślnie. W czasie ostatniej kadencji przygotowano tom 33 (1987), 34 (1988), 35 (1989) oraz opracowano artykuły do dwóch pierwszych numerów tomu 36 (1990 r.). Niestety zlecenia wydawnicze są wykonywane opieszale. W okresie stanu wojennego cykl wydawniczy przedłużył się do 13 miesięcy, obecnie trwa około 10 miesięcy. W związku z tym ukazał się ostatnio 3 zeszyt tomu 34 (1988 r.) podczas gdy kolejne pozostają wciąż w drukarni. Z inicjatywy redakcji udało się przygotować kilka numerów monotematycznych, tworzących następujące serie wydawnicze: proteinazy, peptydowe czynniki wzrostu, aktywne formy tlenu w metabolizmie komórkowym, regulacyjna forma fosforylacji białek, transport przez błony biologiczne. Dwa zeszyty tomu 35 (1989 r.) rozpoczynają serię publikacji przygotowanych dla uczczenia jubileuszu Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego. Redakcja nie narzeka na brak artykułów, nadchodzą sukcesywnie, a Warszawa, Poznań i Lublin przodują w ilości dostarczonych prac. Na podkreślenie zasługuje wzrost honorarium autorskiego, w 1988 roku osiągnęło ono wartość 80.000 zł za arkusz. Bolączką redakcji jest brak sekretarki, nawet na kilkanaście godzin miesięcznie. Podejmowane przez Redakcję i Zarząd Główny starania rozwiązania tej sprawy nie dały pozytywnych rezultatów. Załatwianie korespondencji, poczty oraz sporządzanie autorskich list płac w dużym stopniu obciąża redaktora naczelnego i sekretarza oraz redakcję naukową pisma, zabierając czas przeznaczony na właściwą pracę redakcyjną.

Monografie Biochemiczne nie były przedmiotem zainteresowania autorów w bieżącej kadencji. Udało się wznowić II wydanie Elementów Enzymologii, wydawnictwa poszukiwanego, jako materiał seminaryjny dla studentów. Monografia pt. „Glikoproteidy” jest już po recenzjach i czeka na druk.

Komisja Słownictwa Biochemicznego pracująca w ramach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego kierowana przez prof. Janinę Kwiatkowską, kontynuowała działalność rozpoczętą w poprzednich kadencjach. Jej celem jest popularyzacja zaleceń IUPAC-IUB. Obecnie przetłumaczono, skonsultowano z Polskim Towarzystwem Chemicznym i przekazano do druku w Postęпах Biochemii cztery dokumenty dotyczące słownictwa: tokoferoli, prenoli, retinoidów oraz folianów. Opracowywane są również dokumenty dotyczące konformacji polinukleotydów oraz glikoprotein. Ponadto komisja zweryfikowała słownictwo używane w artykułach drukowanych w Postęпах Biochemii. Z dużą satysfakcją należy podkreślić, że zarówno autorzy jak i redakcja uwzględniają zalecenia komisji.

Nagrody im. prof. JAKUBA PARNASA oraz im. prof. BOLESŁAWA SKARŻYŃSKIEGO za najciekawszą pracę doświadczalną oraz najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w kwartalniku „Postępy Biochemii” są przyznawane regularnie. Pięć nagród im. prof. WŁODZIMIERZA MOZOŁOWSKIEGO otrzymują każdego roku młodzi biochemicy, którzy na dorocznym Zjeździe Towarzystwa najlepiej prezentowali swe prace.

Staże naukowe są gorąco popierane przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Z prawdziwą satysfakcją należy podkreślić, że członkowie naszego Towarzystwa brali udział w wielu krajowych i zagranicznych zjazdach, sympozjach, kilkumiesięcznych lub rocznych pobytach naukowych w placówkach zagranicznych. Nadsyłane do Zarządu Głównego

sprawozdania dowodziły celowości tych wyjazdów, a jednocześnie informowały o zainteresowaniach i dokonaniach osób odbywających szkolenie. Współpraca z FEBS rozwijała się zadowalająco. Około 6 do 10 osób corocznie korzystało ze stypendium FEBS dla przeprowadzenia określonych badań lub zapoznania się z nowymi technikami badawczymi. Dzięki pomocy FEBS kontynuowane jest rozprowadzanie bezpłatnej prenumeraty Biochemical Education, które otrzymują ośrodki akademickie.

Biuletyn Towarzystwa pod nazwą „Listy do członków Towarzystwa” redagowany jest przez dr Wesołowską i wydawany w Szczecinie. Przekazano członkom 10 Listów informujących o działalności naszego i innych Towarzystw. Biuletyn ten przekazuje aktualne wiadomości dotyczące członków naszej społeczności, informacje o naukowych imprezach w kraju i zagranicą. Jest trybuną porozumienia między Zarządem, Oddziałami i poszczególnymi członkami. Biuletyn otwarty jest na wszystkie informacje z Oddziałów i nieustannie oczekuje na listy korespondentów.

Doroczne Zjazdy Towarzystwa w bieżącej kadencji odbyły się w Białymstoku (1987 r.), w Poznaniu (1988 r.) i w Toruniu (1989 r.). Spotkania te cieszyły się dużym zainteresowaniem, czego dowodem była wysoka frekwencja (500—600 osób) oraz ilość i różnorodność nadsyłanych referatów i komunikatów. Coraz liczniejszy udział osób nie będących członkami naszego Towarzystwa, stwarza okazję do szerokiej wymiany poglądów między przedstawicielami różnych pokrewnych dyscyplin naukowych. Organizowane zwykle imprezy towarzyszące sprzyjały nawiązywaniu kontaktów osobistych i naukowych. Po raz pierwszy w Toruniu zorganizowano sesję poświęconą nauczaniu biochemii na wyższych uczelniach oraz prezentację pomocy dydaktycznych, ułatwiających ten proces.

Monotematyczne sesje naukowe zyskują coraz większe powodzenie i są organizowane coraz systematyczniej. W bieżącej kadencji sesje takie odbyły się:

W Szczecinie, na terenie Akademii Medycznej, zorganizowana przez dr Wesołowską, pt. „Patogeneza miażdżycy”. W spotkaniu udział wzięli biochemicy, lekarze i biolodzy. Ta świetnie zorganizowana sesja potwierdziła znaczenie i konieczność integracji pokrewnych dyscyplin.

W Szczecinie, zorganizowana przez prof. Machoya w ramach działalności Szczecińskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego pt. „Metabolizm fluoru”. Było to czwarte spotkanie z tego cyklu.

W Szczecinie pt. „Biochemia stosowana w naukach rolniczych”, zorganizowana przez Zakład Biochemii A.M. oraz Zakład Biochemii Instytutu Przechowalnictwa.

W Lublinie II Konferencja pt. „Regulacja Funkcji procesów foforylacji białek”, zorganizowana przez prof. Gąsiora i kierowany przez niego Zakład Biologii Molekularnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej. Spotkanie było świetnie przygotowane tak pod względem organizacyjnym jak i merytorycznym, stworzyła wspaniałe forum do dyskusji i wymiany poglądów, zacieśniając kontakty między biochemikami i biologami, zainteresowanymi mechanizmami regulacji.

W Warszawie, na terenie Instytutu Matki i Dziecka, przygotowana przez prof. Lorenca, prezesa sekcji Metabolizmu fosforowo-wapniowego. Transport fosforanów był tematem dyskusji. W spotkaniu udział wzięli goście z Gdańska i z Warszawy.

Z inicjatywy Zakładu Biochemii A.M. oraz Oddziału Towarzystwa w Gdańsku zorganizowano trzykrotnie międzywydziałowe sesje naukowe związane z uroczystościami w Gdańsku dla uczczenia pamięci prof. Mozołowskiego. Spotkania te stały się już tradycją, uczestniczą w nich uczniowie i przyjaciele profesora, goście z kraju i ze świata.

Sekcje Polskiego Towarzystwa Biochemicznego mają na celu integrowanie biochemików zainteresowanych podobnymi specjalnościami. W ramach towarzystwa są powołane cztery sekcje: Tkanki Łączne, Metabolizmu wapniowego, Glikokoniuatów oraz Biotechnologii. Dwie pierwsze pracują bardzo aktywnie, organizują coroczne spotkania, manifestują swoją obecność na corocznych Zjazdach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz międzynarodowych imprezach zbliżonych tematycznie. Członkowie sekcji Tkanki Łącznej biorą czynny udział w pracy międzynarodowej Unii

Tkanki Łącznej, wchodzi w skład zarządu, a w lipcu 1990 roku organizują w Białymstoku Międzynarodowy Zjazd Unii Tkanki Łącznej. Sekcja trzecia, glikokoniuatów planuje organizację własnych sesji co dwa lata w ramach Zjazdów PTBioch.

Sesje dydaktyczne odbywały się każdego roku i poświęcone są nauczaniu biochemii na Akademiach Medycznych w Polsce. Biorą w nich udział kierownicy zakładów oraz osoby odpowiedzialne za organizację dydaktyki. Podczas tych spotkań dyskutowane są merytoryczne i metodologiczne sposoby realizacji programów oraz formowane postulaty do władz uczelni oraz Ministerstwa Zdrowia. Takie pierwsze spotkanie odbyło się z inicjatywy prof. Żydowo w Gdańsku, od tego czasu miało miejsce 5 sesji, w bieżącej kadencji we Wrocławiu, Szczecinie i Krakowie. Ostatnio Zarząd Główny nawiązał kontakt z dydaktykami nauczającymi biochemię na wydziałach lekarskich Uniwersytetu Paryskiego. Wymieniono programy, skrypty i pytania testowe. Nawiązano współpracę mającą na celu wymianę doświadczeń, pomocy naukowych a w przyszłości organizowanie wspólnych spotkań. Zarząd Główny otrzymał zaproszenie na organizowaną przez Francuzów w marcu 1990 r. w Arle sesję pt. „Przekazywanie sygnałów” a grupującą dydaktyków wykładających w języku francuskim.

W trosce o nauczanie i popularyzację osiągnięć Biochemii z inicjatywy Zarządu Głównego, po raz pierwszy w tym roku zaproszono na zjazd do Torunia gości z Czechosłowacji, którzy od kilku lat przygotowują pomoce niezbędne przy realizacji programów nauczania nauk biologicznych (filmy, modele, tablice). To spotkanie było okazją do zapoznania się a nawet zakupienia prezentowanych prac. Zarząd Główny ma nadzieję, że sesje poświęcone dydaktyce będą kontynuowane na kolejnych zjazdach Towarzystwa i staną się inspiracją do stworzenia sekcji przygotowującej takie pomoce. Warto zwrócić uwagę, że redakcja Postępów Biochemii udostępniła swoje łamy dla artykułów dotyczących dydaktyki.

Z inicjatywy Oddziału Gdańskiego, przygotowano pierwszą Szkołę Jesienną, zorganizowaną przez prof. Makarewicza we wrześniu w Cetniewie. Ma ona na celu zapoznanie asystentów A.M. z najnowszymi osiągnięciami dotyczącymi „Mechanizmu działania hormonów”. To czterodniowe spotkanie będzie doskonałą okazją do wymiany poglądów oraz pogłębienia własnych wiadomości.

Miniona XII Kadencja władz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przebiegała, podobnie jak poprzednie wśród wielu trudności tak finansowych jak i organizacyjnych, jednak jak się wydaje, doprowadziła do większej integralności naszej biochemicznej społeczności. Wykazała konieczność częstszego organizowania wspólnych spotkań, podejmowania nowych inicjatyw i akcji na rzecz rozwoju naszej dyscypliny. Pokazała, że przedsięwzięcia, które wydają się trudne do zrealizowania, przy wspólnych wysiłkach, mogą jednak mieć miejsce.

*Docent dr Zofia Poremska
Prezes Zarządu Głównego
XIII Kadencji*

Nowe Władze Towarzystwa

Zarząd Główny wybrany w dniu 14 września 1989 r. przez Walne Zgromadzenie członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ukonstytuował się na posiedzeniu odbytym w dniu 30 października 1989 r. w sposób następujący.

Prezes	doc. dr hab. Zofia Poremska
wiceprezes	prof. dr hab. Tadeusz Wilusz
sekretarz	doc. dr hab. Jacek Kuźnicki
	doc. dr hab. Krzysztof Zwierz
skarbnik	dr Ewa Wieniawska-Szewczyk

Członkowie Zarządu

prof. dr hab. Mariusz Żydowo
prof. Maria Gumińska
prof. dr hab. Kazimierz Zakrzewski
prof. dr hab. Zofia Walter
doc. dr hab. Marian Wolny
doc. dr hab. Henryk Kostyra

doc. dr hab. Andrzej Guranowski
doc. dr hab. Roman Tarnawski
doc. dr hab. Maria Wojtaś-Wasilewska
dr Teresa Wesołowska
dr Michał Komoszyński

Komisja Rewizyjna

doc. dr hab. Wirginia Janiszowska
dr Lidia Paś
doc. dr hab. Bogdan Sieliwanowicz

Spis treści

WSPOMNIENIE

Profesor Bronisław Filipowicz — wspomnienie	203
---	-----

OD REDAKCJI	208
-----------------------	-----

SŁOWNICTWO

Klasyfikacja kinaz białkowych wyższych Eukaryota — wskazania doraźne (E. Gąsior)	209
--	-----

ARTYKUŁY

E. Gąsior — Kinazy białkowe, strukturalne i funkcjonalne podobieństwa i różnice	211
B. Kamińska — Właściwości białkowych kinaz tyrozynowych	219
G. Dobrowolska — Struktura i właściwości kinaz kazeinowych	231
J. Zając — Heterogenność kinazy białkowej C	245
J. Kwiatkowska — Kinaza białkowa C a transmisja sygnałów w komórce	253
J. Kawiak — Wpływ estrów forbolu na funkcje komórek	265
B. Baryłko — Rola fosforylacji białek w organizacji cytoszkieletu komórki nerwowej	279
J. Kuźnicki — Fosforylacja miozyny — fakty i hipotezy	295
T. Jakubowicz — Fosforylacja białek rybosomowych u wyższych i niższych Eukaryota	303
W. Kudlicki — Udział peptydów spektryno-podobnych w regulacji inicjacji syntezy białka w retikulocytach królika	311
A. Jerzmanowski — Wpływ postsyntetycznych fosforylacji na strukturę histonu H1 i jego funkcję w chromosomach	321
K. S. Famulski, A. B. Wojtczak — Wpływ tyroksyny na zależną od cAMP fosforylację białek i transport jonów wapnia w sarkolemie serca i mięśni szkieletowych	329
J. Gemel — Kinazy białkowe a aktywność fotosyntetyczna chloroplastów	337
M. Sanecka-Obacz — Kinazy białkowe ośrodkowego układu nerwowego w ontogenezie	347
E. Paleń — Fosfatazy fosfobiałkowe	363
W. S. Ostrowski — Mechanizm transfosforylacji w katalizie niespecyficznych fosfomonoesteraz	371
G. Muszyńska — Rozdział fosfoprotein na unieruchomionych jonach żelazowych	383

SPRAWOZDANIA ZE ZJAZDÓW I KONFERENCJI NAUKOWYCH

Konferencja na temat „Regulacyjne funkcje fosforylacji białek” — Lublin, 14–15 czerwca, 1988 (E. Gąsior)	395
--	-----

ARTYKUŁY

E. Bańkowski, J. Pałka — Polimorfizm molekularny kolagenu: kolageny typów VI–XII	397
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	415

Table 1

Year	Country	Value
2000	USA	1.2
2001	USA	1.3
2002	USA	1.4
2003	USA	1.5
2004	USA	1.6
2005	USA	1.7
2006	USA	1.8
2007	USA	1.9
2008	USA	2.0
2009	USA	2.1
2010	USA	2.2
2011	USA	2.3
2012	USA	2.4
2013	USA	2.5
2014	USA	2.6
2015	USA	2.7
2016	USA	2.8
2017	USA	2.9
2018	USA	3.0
2019	USA	3.1
2020	USA	3.2
2021	USA	3.3
2022	USA	3.4
2023	USA	3.5
2024	USA	3.6
2025	USA	3.7
2026	USA	3.8
2027	USA	3.9
2028	USA	4.0
2029	USA	4.1
2030	USA	4.2
2031	USA	4.3
2032	USA	4.4
2033	USA	4.5
2034	USA	4.6
2035	USA	4.7
2036	USA	4.8
2037	USA	4.9
2038	USA	5.0
2039	USA	5.1
2040	USA	5.2
2041	USA	5.3
2042	USA	5.4
2043	USA	5.5
2044	USA	5.6
2045	USA	5.7
2046	USA	5.8
2047	USA	5.9
2048	USA	6.0
2049	USA	6.1
2050	USA	6.2
2051	USA	6.3
2052	USA	6.4
2053	USA	6.5
2054	USA	6.6
2055	USA	6.7
2056	USA	6.8
2057	USA	6.9
2058	USA	7.0
2059	USA	7.1
2060	USA	7.2
2061	USA	7.3
2062	USA	7.4
2063	USA	7.5
2064	USA	7.6
2065	USA	7.7
2066	USA	7.8
2067	USA	7.9
2068	USA	8.0
2069	USA	8.1
2070	USA	8.2
2071	USA	8.3
2072	USA	8.4
2073	USA	8.5
2074	USA	8.6
2075	USA	8.7
2076	USA	8.8
2077	USA	8.9
2078	USA	9.0
2079	USA	9.1
2080	USA	9.2
2081	USA	9.3
2082	USA	9.4
2083	USA	9.5
2084	USA	9.6
2085	USA	9.7
2086	USA	9.8
2087	USA	9.9
2088	USA	10.0
2089	USA	10.1
2090	USA	10.2
2091	USA	10.3
2092	USA	10.4
2093	USA	10.5
2094	USA	10.6
2095	USA	10.7
2096	USA	10.8
2097	USA	10.9
2098	USA	11.0
2099	USA	11.1
2100	USA	11.2

Contents*

OBITUARY

Professor Bronisław Filipowicz	203
--	-----

FROM THE EDITOR:	208
----------------------------	-----

NOMENCLATURE:

An ad hoc classifications of the protein kinases of higher Eukaryotes	209
---	-----

ARTICLES:

E. Gašior – Protein kinases, structural and functional similarities and differences (Dept. of Molecular Biology, M. Curie-Skłodowska University, Lublin)	211
B. Kamińska – Properties of protein tyrosine kinases (Dept. of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa)	219
G. Dobrowolska – Structure and properties of casein kinases (Dept. of Plant Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warszawa)	231
J. Zając – The heterogeneity of the protein kinase C (Dept. of Physiological Chemistry, Medical Academy in Lublin, Lublin)	245
J. Kwiatkowska – Protein kinase C and signal transmission in the cell (Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Wrocław)	253
J. Kawiak – Influence of phorbol esters on cell functions (Dept. of Cytophysiology, Medical Centre of Postgraduate Education, Warszawa)	265
B. Barylko – The function of protein phosphorylation in the organization of neuronal cytoskeleton (Dept. of Muscle Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa)	279
J. Kuźnicki – Phosphorylation of myosin – facts and hypotheses (Dept. of Muscle Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa)	295
T. Jakubowicz – Phosphorylation of ribosomal proteins in higher and lower Eukaryotes (Dept. of Molecular Biology, M. Curie-Skłodowska University, Lublin)	303
W. Kudlicki – Participation of spectrin-related peptides in regulation of protein synthesis initiation in rabbit reticulocytes (Dept. of Molecular Biology, M. Curie-Skłodowska University, Lublin)	311
A. Jerzmanowski – Effect of postsynthetic phosphorylation on the structure and chromosomal function of histone H1 (Institute of Biochemistry, Warsaw University, Warszawa)	321
K. S. Famulski, A. B. Wojtczak – Thyroxine influences the cAMP-dependent protein phosphorylation and the ion transport in heart skeletal muscle sarcolemma (Dept. of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa)	329
J. Gemel – Protein kinases and photosynthetic activity of chloroplasts (Dept. of Enzymology, Institute of Biochemistry, Warsaw University, Warszawa)	337
M. Sanecka-Obacz – Protein kinases of central nervous system during ontogenesis (Dept. of Physiological Chemistry, Medical Academy, Lublin)	347
E. Paleń – Phosphoprotein phosphatases (Dept. of Molecular Biology, M. Curie-Skłodowska University, Lublin)	363

* pages 208–396 — materials presented at a national conference on the „Regulatory functions of protein phosphorylations”. Lublin, 14–15 June, 1988

W. S. Ostrowski – Mechanism of transphosphorylation in the reaction catalyzed by nonspecific phosphomonoesterases (Institute of Medical Biochemistry, Nicolaus Copernicus Academy of Medicine in Kraków, Kraków)	371
G. Muszyńska – Separation of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate (Dept. of Plant Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warszawa)	383
SCIENTIFIC MEETINGS AND CONFERENCES	
A report on a national conference on the Regulatory functions of protein phosphorylations, Lublin, 14 – 15 June, 1988 (E. Gąsior)	395
ARTICLES	
E. Bańkowski, J. Pałka – Molecular polymorphism of collagen: type VI – XII collagens (Dept. of Biochemistry, Medical Academy of Białystok, Białystok)	397
Chronicle of the Polish Biochemical Society	415

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

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

PIŚMIENICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, a więc w sposób nieuporządkowany alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB). Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanej przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Hildenbrandt G. R., Aronson N. N., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **631**, 499-502.
2. Bostock C. J., Sumner A. T., (1978). *The Eukaryotic Chromosome*, 233-268, North-Holland, Amsterdam.
3. Norbeth T., Piscator M., (1979), *Handbook on the Toxicology of Metals* (red. Friberg L., Nordberg G. F., Vonk V. B.), str. 541-553, Elsevier/MNorth-Holland, Amsterdam.
4. De Ley J., Kesters K., (1975), w *Comprehensive Biochemistry*, (red. Florin M., Stotz E. H.), t. 29 B, str. 1-77, Elsevier, Amsterdam.
5. Franks N. P., Lieb W. R., (1981), w *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7 (red. Knight C. G.), str. 243-272, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

ILUSTRACJE: Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz sporządzić oddzielnie i odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, ryciny, czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na plaszcy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje odpowiednio ponumerowane należy oprócz tego podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Podobnie opisuje się fotografie sporządzone kontrastowo na matowym papierze. Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

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

WARUNKI PRENUMERATY

Prenumeratorzy indywidualni, instytucje i zakłady pracy zamawiają prenumeratę w Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch” właściwych dla miejsca zamieszkania lub siedziby prenumeratora.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PBK XIII Oddział Warszawa 370044-1195-139-11.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleciodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów.

Na życzenie prenumeratora dostawa może odbywać się drogą lotniczą; koszty dostawy lotniczej w pełni pokrywa prenumerator.

Terminy przyjmowania prenumeraty:

- I półr. i cały rok następny
- na kraj do 10 XI.
- na zagranicę do 31 X.
- na pozostałe okresy prenumeraty: do 1-go dnia każdego m-ca poprzedzającego okres prenumeraty roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7. Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.