

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

1988

tom 34 nr 4
PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 34 ZESZYT 4
1988

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 34 (4)
(257-472) (1988)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: M. Gumińska (Kraków)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumił (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

Grażyna Palamarczyk

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Andrzej Jerzmanowski

Instytut Biochemii UW

ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata 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-Kramaska (Warszawa)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA

Nakład 1790 (1703 + 87)	Oddano do składania 16.VIII.1988 r.
Ark. wyd. 18,0, ark. druk. 13,5	Podpisano do druku w maju 1989 r.
Papier offset. kl. III, 70 g 70 × 100	Druk ukończono w czerwcu 1989 r.
Zam. 6791/12/88	Cena zł 180.

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

Od Redakcji

Kwartalnik Postępy Biochemii, publikując prace przeglądowe w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych, ilustruje w pewnej mierze zainteresowania naszego Środowiska. Tematyka Postępów Biochemii jest *ipso facto* zróżnicowana. Wiele prac nadsyłają Autorzy spontanicznie, inne — w efekcie indywidualnych zaproszeń lub konsultacji z organizatorami sympozjów i konferencji. Redakcja stara się zbierać artykuły tematycznie, dba jednak by prace zaakceptowane kierować do bieżąco składanych zeszytów.

Wszystkie prace nadchodzące do Redakcji podlegają ocenie specjalistów, co najczęściej pociąga za sobą konieczność uzupełnień i weryfikacji autorskich. Kolejne zeszyty Postępów Biochemii składane są w PWN z wyprzedzeniem nominalnie półrocznym, cykl wydawniczy jednak znacznie przekracza pół roku. W tej sytuacji formowanie zeszytów monotematycznych, jak czasem sugerowano Redakcji, oznaczałoby przetrzymywanie części artykułów w tece redakcyjnej do czasu otrzymania pozostałych i przeciąganie cyklu ich publikacji o dodatkowy kwartał, lub dłużej. Dlatego to Redakcja inicjuje co pewien czas publikację serii artykułów, niekiedy rozciągniętą na kilka kolejnych zeszytów. I tak, w 1985 roku rozpoczęliśmy serię artykułów n.t. neuropeptydów, a w 1987 — serię prac n.t. peptydowych czynników wzrostowych. W obecnie przedkładanym Czytelnikom zeszycie rozpoczynamy krótką serię prac n.t. efektów biologicznych rodników ponadtlenkowych. W najbliższych zeszytach zaś będą to serie n.t. kinaz i fosfataz białkowych oraz różnych aspektów transportu przez błony biologiczne.

The first part of the book is devoted to a general introduction to the study of the history of the region. The author discusses the geographical location of the region, its climate, and its natural resources. He also mentions the early human settlements in the area and the role of the region in the development of the state.

The second part of the book is devoted to the study of the political and administrative organization of the region. The author discusses the role of the king, the nobles, and the common people in the governance of the state. He also mentions the various administrative divisions of the region and the role of the local officials.

The third part of the book is devoted to the study of the economic and social life of the region. The author discusses the various occupations of the people, such as agriculture, trade, and handicrafts. He also mentions the social structure of the region and the role of the different social classes.

The fourth part of the book is devoted to the study of the culture and religion of the region. The author discusses the various religious beliefs and practices of the people, as well as their art, music, and literature. He also mentions the role of the different religious institutions in the society.

The fifth part of the book is devoted to the study of the military and defense of the region. The author discusses the various military organizations and the role of the different military units in the defense of the state. He also mentions the various military campaigns and the role of the region in the expansion of the state.

The sixth part of the book is devoted to the study of the foreign relations of the region. The author discusses the various diplomatic relations of the region with other states and the role of the region in the international relations of the state.

The seventh part of the book is devoted to the study of the modern history of the region. The author discusses the various events and developments that have shaped the region in the modern era. He also mentions the role of the region in the development of the state and the progress of the nation.

ARTYKUŁY

RYSZARD FARBISZEWSKI *

Czynniki wzrostowe pochodzenia mózgowego

Brain — derived growth factors (BDGF-s)

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Izolowanie, oczyszczanie i struktura BDGF-s
- III. Wiązanie BDGF z receptorami
- IV. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania BDGF-s i ich rola biologiczna
- V. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Isolation, purification and structure of BDGF-s
- III. Binding of BDGF with the receptors
- IV. Intracellular mechanism action of BDGF and their biological role
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: BDaFGF — kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów pochodzący z mózgu, BDbFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów pochodzący z mózgu, ECGF — czynnik wzrostu komórek śródbłonkowych, EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy, NGF — czynnik wzrostu nerwu, PDGF — czynnik wzrostu płytek krwi, pI — punkt izoelektryczny, Mr — masa cząsteczkowa.

I. Wstęp

Tkanę mózgową od dawna uważano za źródło aktywności mitogennej [1]. Jednak dopiero w ostatnim dziesięcioleciu tkanka ta posłużyła jako materiał do izolowania i oczyszczania czynników wzrostowych.

Czynniki wzrostowe pochodzenia mózgowego różnią się strukturalnie i funkcjonalnie od czynnika wzrostu nerwu (NGF), pobudzającego komórki nerwowe do tworzenia neurytów, a którego budowę chemiczną i funkcję biologiczną opisali w Postęпах Biochemii Sieroń i Lewin-Kowalik [2]. Ten czynnik wzrostu został również zidentyfikowany w mózgu, gdzie jest syntetyzowany przez komórki astrogleju w obszarach zawierających cholinier-

* Prof. dr hab., Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Akademii Medycznej, ul. Kilińskiego 1, 15-230 Białystok.

giczne zakończenia nerwowe [3—7]. Wiele struktur mózgu wykazuje zdolność syntezy cząsteczek analogicznych do NGF, które są istotne dla wzrostu i przeżycia neuronów niewrażliwych na NGF [3]. Są to czynniki troficzne odpowiedzialne za prawidłowy rozwój i funkcje autonomicznego układu nerwowego i których aktywność badana w ekstraktach tkankowych ulega wzmożeniu w warunkach doświadczalnych uszkodzeń mózgu.

II. Izolowanie, oczyszczanie i struktura BDGF

Pierwszą próbę izolowania i oczyszczania czynników wzrostowych z przysadki mózgowej wołu podjął Gospodarowicz i wsp. [8]. Początkowo sądzono, że czynniki wzrostowe pochodzące z tej tkanki powstają z białka zasadowego mieliny w drodze ograniczonej proteolizy [9]. Wkrótce Thomasi i wsp. wykazali, że żaden z czynników wzrostowych mózgu nie pochodzi z degradacji białka zasadowego mieliny [10], co też potwierdzili inni [11]. Z podwzgórza wyizolowano dwa czynniki wzrostu: jeden o charakterze kwaśnym zwany „kwaśnym czynnikiem wzrostu fibroblastów” (ang. Brain-derived acidic FGF), wykazujący działanie głównie na komórki śródbłonkowe, drugi o charakterze zasadowym zwany „zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów FGF” (ang. Brain-derived basic FGF) o szerszym spektrum działania. Aktywność obu czynników wykazano głównie na komórkach pochodzenia mezodermalnego: fibroblastach, stąd nazwa kwaśny lub zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów. Czynniki te zidentyfikowano po oczyszczeniu na kolumnach wypełnionych żelam Sepharose sprzężonym z heparyną [12, 13]. Podobne czynniki wzrostowe z ludzkiego i wołowego mózgu wyizolowano w różnych laboratoriach [14—17]. Dotychczas jednak nie wykazano identyczności „kwaśnego FGF” z czynnikiem wzrostu wiążącym heparynę.

Procedurę izolowania i oczyszczania BDGF na dużą skalę opisał po raz pierwszy Huang i wsp. [18]. Uzyskał on dwa preparaty BDGF w stanie homogenym, stosując frakcjonowanie siarczanem amonu, rozdział chromatograficzny na CM-Sephadex C-50, następnie rozdział na sulfonowanym Sephadex G-50 i z kolei na żelu Sepharose 4 B sprzężonym z heparyną. Oba czynniki wzrostu eluowane są w ostatniej fazie rozdziału, odpowiednio przy stężeniu 1.2 i 1.6 M NaCl. Są to kwaśne białka o pI wynoszącym 5.7, różniące się masą cząsteczkową. Zbudowane są z pojedynczego łańcucha peptydowego, pierwszy nazywany przez autora BDGF-A posiada masę 16 000 drugi BDGF-B — 17 000. Czynniki BDGF wykazują tę samą specyficzną aktywność mitogenną i reagują z przeciwsurowicą mysią przeciw BDGF-A. Oba czynniki działają na fibroblasty, komórki śródbłonkowe aorty i naczyń krwionośnych, osteoblasty, chondrocyty, komórki nabłonkowe, glejowe i komórki mięśni gładkich z różną aktywnością mitogenną.

Cechą charakterystyczną czynników wzrostu pochodzenia mózgowego jest ich najaktywniejsze oddziaływanie na komórki glejowe: astrocyty i oligodendro-

cyty oraz komórki śródbłonkowe aorty i naczyń krwionośnych wobec których inne czynniki wzrostowe jak EGF i PDGF nie wykazują działania [10, 19, 21]. Te ostatnie, dobrze scharakteryzowane, są potężnymi mitogenami dla komórek tkanki łącznej.

Przyłączenie znakowanego jodem BDGF do komórek śródbłonka aorty wołowej osiąga równowagę w ciągu niespełna 15 min. [18, 22]. Uważa się, że oba czynniki BDGF-A i BDGF-B wiążą się z tymi samymi miejscami białka receptorowego komórek śródbłonka i komórek glejowych [18]. Stwierdzono, że czynniki wzrostu: BDGF, EGF i PDGF są aktywne wobec fibroblastów i komórek mięśni gładkich, stymulują one jednak włączanie ^3H -tymidyny do DNA z różną szybkością (najslabiej działa BDGF). Na komórki nabłonkowe czynniki BDGF wywierają mniejszy wpływ stymulujący niż EGF [19], prawdopodobnie ze względu na mniejsze powinowactwo receptora do BDGF.

Specyficzność komórkowa oraz właściwości fizyczne i chemiczne (pI i Mr) czynników wzrostowych pochodzenia mózgowego sprawiają, że są one bardzo podobne strukturalnie do kwaśnego czynnika wzrostowego, wyizolowanego z podwzgórza, zwanego „kwaśnym czynnikiem wzrostu fibroblastów” (ang. brain-derived acidic fibroblast growth factor — BDaFGF) [10, 11] oraz czynnika wzrostu komórek śródbłonkowych (ang. endothelial cell growth factor — ECGF) pochodzącego z mózgu [12, 13, 23]. Czynniki BDGF natomiast różnią się strukturalnie od zasadowego czynnika fibroblastów wyizolowanego z podwzgórza (ang. brain-derived basic fibroblast growth factor — BDbFGF). Różnice te dotyczą punktu izoelektrycznego, immunoreaktywności, współzawodniczenia z innymi czynnikami oraz stymulacji syntezy DNA [24]. Z porównania sekwencji aminokwasów kwaśnego i zasadowego czynnika wzrostu (BDaFGF i BDbFGF) wynika, że tylko 20 reszt aminokwasowych jest w nich identyczna [17]. Sądzi się, że BDaFGF i BDbFGF są strukturalnie różne, ale pochodzą ze wspólnego prebiałka, z którego wywodzą się również interleukina-1 (IL-1) oraz czynnik peptydowy, indukujący produkcję interferonu w ludzkich fibroblastach hodowanych *in vitro* [25]. Interferony jako nieklasyczne hormony tkankowe współdziałające z czynnikami wzrostowymi opisane zostały w Postęпах Biochemii przez A. D. Inglot [26].

Należy podkreślić, że wiele neuropeptydów o niskiej masie cząsteczkowej cechuje sekwencja bardzo zbliżona do fragmentu sekwencji czynnika BDGF pochodzącego z mózgu wołowego. I tak deka-peptyd występujący w kolejności od N-końca (od 101 do 111) ma skład i sekwencję zbliżoną do neuromedyny C i K oraz substancji P i K, znanych neuropeptydów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego [17]. Pełnią one funkcję neuroprzekazników impulsów nerwowych w neuronach czuciowych [27], a ponadto stymulują syntezę DNA i wzrost komórek mięśni gładkich tkanki łącznej [28].

Inhibitorami czynników BDGF są polizasadowe peptydy np. polilizyna i poliarginina. Cytochrom C, którego pI wynosi 11.7 nie wykazuje jednak wpływu hamującego na zdolność wiązania ^{125}I -BDGF z receptorami [29]. Wydaje się więc, że odpowiednie skupienie reszt aminokwasów zasadowych wydaje się

odpowiadać za inhibitorowe działanie białek zasadowych. Natomiast protamina, która jest inhibitorem wiązania ^{125}I -BDGF z receptorem, a zarazem aktywności mitogennej, nie jest inhibitorem wiązania EGF z białkiem receptorowym [29]. Protamina wiąże BDGF na drodze elektrostatycznej interakcji tworząc kompleks: protamina ^{125}I -BDGF. Jest interesujące, że protamina jest skutecznym inhibitorem angiogenezy, w którym to procesie proliferacja komórek śródbłonkowych ma kluczowe znaczenie [30], a czynniki wzrostowe uwalniane z tych komórek odgrywają istotną rolę w unaczynieniu tkanek [31].

III. Wiązanie BDGF z receptorami

Białko receptorowe wiążące BDGF w komórkach docelowych np. w komórkach śródbłonkowych i fibroblastach posiada odmienne właściwości od białek wiążących EGF i PDGF. Czas wymagany do osiągnięcia stanu równowagi wiązania ^{125}I -BDGF z receptorami komórek śródbłonkowych wynosi mniej niż 15 min, podczas gdy czas wymagany do osiągnięcia stanu równowagi wiązania ^{125}I -BDGF z receptorami fibroblastów mysich Swiss 3T3 wynosi około 1 godziny [32—34]. Ponadto liczba miejsc receptorowych wiążących BDGF w fibroblastach jest znacznie niższa liczba miejsc wiążących PDGF i EGF.

Wiązanie znakowanego ^{125}I -BDGF z receptorami i elektroforeza na żelu polyakrylamidowym z SDS wykazała, że względna masa cząsteczkowa białka receptorowego wynosi około 135 000. Białko to wykazuje aktywność tyrozynoswoistej kinazy [29]. Sekwencja aminokwasowa wewnątrzłonowej części receptora BDGF wydaje się być homologiczna z białkową kinazą tyrozynową jaka występuje w receptorze wiążącym EGF lub produkcie onkogenu src.

Zmiany powinowactwa i liczby receptorów wiążących czynniki wzrostowe oraz zmiany wywołane poprzez internalizację kompleksów ligand-receptor mogą modyfikować odpowiedź komórkową. Również zmiana struktury receptorów w wyniku działania ligandów heterologicznych może w zdecydowany sposób modulować mechanizmy odpowiedzi komórek docelowych.

Konsekwencją działania czynników wzrostowych na komórki oprócz zmian metabolicznych są zmiany organizacji cytoszkieletu. Opisał je poprzednio w *Postęпах Biochemii* Z. Pietrzowski [35].

IV. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania czynników BDGF i ich rola biologiczna

Odpowiedź komórki na większość czynników wzrostowych następuje po ich związaniu z białkiem receptorowym i wewnątrzkomórkowym przekazaniem sygnału mitogennego. Bezpośrednia interakcja BDGF ze swoistym receptorem wywołuje kaskadę reakcji chemicznych, których wynikiem jest wzrost komórkowy. Przeniesienie sygnału mitogennego do jądra komórkowego odbywa się podobnie jak w przypadku działania PDGF i EGF [29]. BDGF wiąże się z

częścią zewnątrz błonową receptora, powoduje stymulację wewnątrz błonowej części receptora, która wykazuje aktywność tyrozyno-swoistej kinazy. W wyniku stymulacji dochodzi do autofosforylacji receptora białkowego o Mr 135 000. Jest interesujące, że fosforylacja tego białka maleje przy stężeniu BDGF większym niż 40 pM. Wysokie stężenia BDGF w środowisku *in vitro* wykazują hamujący wpływ na aktywność kinazy białkowej. Wartym podkreślenia jest fakt, że rozmaite procesy biochemiczne, zachodzące w tkance mózgowej, jak biosynteza i uwalnianie neurotransmiterów, aksoplazmatyczny transport, generacja postsynaptycznych potencjałów, przewodnictwo kanałów jonowych, kształt i ruchliwość neuronów, rozwój i utrzymanie ich zróżnicowanego charakteru są konsekwencją fosforylacji wielu białek, zawartych w tej tkance [36].

Ostatnio wykryto czynniki BDGF w neuronach [37]. Badania, w których zastosowano wysokospecyficzną mysią surowicę przeciwko BDGF do bezpośredniego barwienia immunofluorescencyjnego potwierdziły ich występowanie w neuronach kory mózgowej wołu [38]. Przyczym nadal nie jest pewne czy czynniki te są produkowane w neuronach czy w innych komórkach, a następnie przenoszone na drodze dyfuzji do neuronów. Ich obecność w nerwiaku (neuroblastoma) wydaje się wskazywać, że czynniki BDGF są produkowane w neuronach. Jednak ekspresja czynników wzrostu w komórkach nowotworów złośliwych może być odmienna od tej, w odpowiednikach komórek prawidłowych.

Czynniki BDGF wykazują silne działanie mitogenne na komórki gleju, astrocyty [19, 22, 39]. Jeśli czynniki te byłyby produkowane przez neurony, mogłyby spełniać bardzo istotną rolę we wzroście komórek astroglejowych i w proliferacji oligodendrocytów skąpowypustkowych gleju — zwłaszcza, że neurony kontaktują się z jednej strony z astrocytami, a z drugiej ze ścianą naczyń. Są dane wskazujące, że neurony mogą dostarczać substancji, które stymulują podział i wzrost oligodendrocytów [40, 41], a czynniki wzrostowe uwalniane z neuronów przyczyniłyby się do ich przeżycia i wydłużenia wypustek osiowych [42]. Jeżeli dane powyższe zyskałyby potwierdzenie, oznaczałoby to, że rola czynników BDGF w przekazywaniu w sposób autokrynowy systemu informacyjnego jest bardzo istotna we wzroście neuronu, podczas prawidłowego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego. Sądzić można, że czynniki BDGF mają szczególne znaczenie w niedojrzalej tkance mózgowej. Wykazano bowiem w badaniach *in vitro*, że neuroblasty mózgu szczurów i piskląt w okresie zarodkowym wykazują zdolność proliferacji (43—46). Stwierdzono również, że ekstrakt tkanki mózgowej przyspiesza różnicowanie komórek glejowych [47].

V. Podsumowanie

Jak przedstawiono powyżej czynniki wzrostowe pochodzenia mózgowego (BDGF) są białkami zbudowanymi z pojedynczego łańcucha peptydowego, posiadającymi średnią masę cząsteczkową 16 000—17 000. Działają one na różne

typy komórek z różną aktywnością mitotyczną. Fizjologiczna funkcja czynników BDGF jest istotna we wzroście komórek występujących w tej tkance: 2neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Ich aktywność troficzna ma szczególne znaczenie podczas różnicowania i dojrzewania komórek glejowych i w czasie prawidłowego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego. Czynniki te przyczyniają się do przeżycia komórek nerwowych i wydłużania wypustek osiowych, otaczanych przez mielinę. Lokalizacja ich w tkance mózgowej sugeruje, że mogą odgrywać ważną rolę regulacyjną w przekazie informacji biologicznej do komórek docelowych różnych typów tej tkanki.

Opracowanie wykonane w ramach tematu finansowanego z CPBR 11.08/12/11/88.

Artykuł otrzymano 7 maja 1988 r.

Zaakceptowano do druku 10 czerwca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Trowel O. A., Chir B., Wilmer E. N., (1939), *J. Exp. Biol.*, **16**, 60—70.
2. Sieroń A., Lewin-Kowalik J., (1988), *Post. Biochem.*, w druku.
3. Lindsay R., (1979), *Nature*, **282**, 80—82.
4. Wien D., Barrand P., Dicou E., Scott J., Brachet P., (1985), *FEBS Lett.*, **189**, 37—41.
5. Furukawa S., Furukawa Y., Satoyoshi E., Hayashi K., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 57—63.
6. Korsching S., Auburger G., Heumann R., Scott J., Thoenen H., (1985), *EMBO J.*, **4**, 1389—1393.
7. Large T. H., Bodary S. C., Clegg D. O., Weskamp G., Otten U., Reinhardt L. F., (1986), *Science*, **234**, 352—355.
8. Gospodarowicz D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2515—2520.
9. Westfall F. C., Lenon V. A., Gospodarowicz D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4675—4678.
10. Thomas K., Rios-Candelore M., Fitzpatrick S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 357—361.
11. Gospodarowicz D., Cheng J., Lui G. M., Bohlen P., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6963—6967.
12. Maciąg T., Mehlman T., Friesel R., Schneiber A. B., (1984), *Science*, **225**, 932—935.
13. Burgess W. H., Mehlman T., Friesel R., Johnson W. V., Maciąg T., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11389—11392.
14. Lobb R. R., Fett J. W., (1984), *Biochemistry*, **23**, 6295—6299.
15. Conn G., Hatcher V., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 358—364.
16. Bohlen P., Esch F., Baird A., Jones K. L., Gospodarowicz D., (1985), *FEBS Lett.*, **185**, 177—181.
17. Gimenez-Gallego G., Rodkey J., Bennett C., Rios-Candelore M., Dislavo J., Thomas K., (1985), *Science*, **230**, 1385—1388.
18. Huang J. S., Huang S. S., Kuo M. D., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 11600—11607.
19. Huang J. S., Huang S. S., (1985), *Ciba Found. Symp.*, **116**, 46—65.
20. Maciąg T., Hoover G. A., Weinstein R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5333—5336.
21. Lemon S. K., Riley M. C., Thomas K. A., Hoover G. A., Maciąg T., Bradshaw R. A., (1982), *J. Cell Biol.*, **95**, 162—169.
22. Huang J. S., Huang S. S., (1986), *Fed. Proc.*, **45**, 1631.

23. Schreiber A. B., Kenney J., Kawalski W. J., Frisel R., Mehlman T., Maciąg T., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6138—6142.
24. Schelling M. E., Hawker J. R. Jr., Granger H. J., (1987), *Tissue Cell*, **19**, 463—467.
25. Van Damme J., Deley M., Opdenakker G., Bilian A., De Somer P., Van Beeumen J., (1985), *Nature*, **314**, 266—268.
26. Inglot A. D., (1987), **33**, 151—164.
27. Lembeck F., Donner J., (1981), *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **316**, 240—243.
28. Nillson J., von Euler A. M., Dalsgaard C. J., (1985), *Nature*, **315**, 61—63.
29. Huang S. S., Huang J. S., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9568—9571.
30. Folkman J., (1985), *Adv. Cancer Res.*, **43**, 175—203.
31. Klagsbrun M., Sasse J., Sullivan R., Smith J. A., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2448—2452.
32. Huang J. S., Huang S. S., Kennedy B. B., Deuel T. F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8130—8136.
33. Huang J. S., Nishimura J., Huang S. S., Deuel T. F., (1984), *J. Cell Biochem.*, **26**, 205—220.
34. Bowen-Pope D. F., Ross R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5161—5171.
35. Pietrzkowski Z., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 501—514.
36. Nestler E. J., Greengard P., (1983), *Nature*, **305**, 583—588.
37. Pettman B., Labourdette G., Weibel M., Sensenbrenner M., (1986), *Neurosci. Lett.*, **68**, 175—180.
38. Huang S. S., Tsai C. C., Adams S. P., Huang J. S., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 81—87.
39. Kuo M. D., Huang S. S., Huang J. S., (1985), *Fed. Proc.*, **44**, 695.
40. Brockes J. P., Kintner C. R., (1986), *Cell*, **45**, 301—306.
41. Wood P. M., Bunge R. P., (1986), *Nature*, **320**, 756—758.
42. Walicke P., Cowan W. M., Ueno N., Baird A., Guillemin B., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3012—3016.
43. Barakat I., Sensenbrenner M., (1981), *Dev. Brain Res.*, **1**, 355—368.
44. Barakat I., Sensenbrenner M., Labourdette G., (1982), *J. Neurosci. Res.*, **8**, 303—314.
45. Kriegstein A., Dichter M. A., (1984), *Brain Res.*, **295**, 184—189.
46. Asou H., Iwasaki N., Hirano S., Dahl D., (1985), *Brain Res.*, **332**, 355—357.
47. Pettman B., Labourdette G., Devilliers G., Sensenbrenner M., (1981), *Dev. Neurosci.*, **4**, 37—45.

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. ...

WŁODZIMIERZ KOROHODA*

Badania wzrostu, różnicowania i transformacji nowotworowej komórek zwierzęcych i ludzkich—poglądy i tendencje : 1985—1988

Studies on growth, differentiation and neoplastic transformation of animal and human cells — views and trends: 1985—1988

Artykuły zawarte w zeszytach 2-433 tomu „Postępów Biochemii” oparte są na materiałach referatów wygłoszonych podczas XXI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, który odbył się we wrześniu 1985 roku w Krakowie. Zagadnienia związane z regulacją wzrostu i różnicowania komórek zwierzęcych przedstawiono w tych artykułach w oparciu o dostępne wówczas wyniki badań i dyskutowane przed trzema laty hipotezy. Od tego czasu nastąpił znaczny postęp w analizowaniu i wyjaśnianiu omawianych tutaj zagadnień. W przekonaniu piszącego te uwagi zapoznanie się z zamieszczonymi w tych zeszytach artykułami referatowymi powinno zatem nie tyle zapoznać Czytelnika z aktualnym stanem wiedzy, ile ułatwić Mu zaznajomienie się z podstawowymi zagadnieniami, metodami badań, terminologią i hipotezami związanymi z analizą mechanizmów procesów zaangażowanych w regulację wzrostu i różnicowania komórek. Poniżej chciałbym zwrócić uwagę Czytelników na kilka nowych aspektów tych badań, które, sygnalizowane już w niektórych z tutaj publikowanych artykułów, dopiero w latach 1986—1988 znalazły się w centrum zainteresowania badaczy.

Uderzającą zmianą w analizie zjawisk regulacji wzrostu i różnicowania komórek jest szybko postępująca integracja dotychczas odrębnych kierunków badań. Badania dotyczące regulacji cyklu komórkowego, stymulacji syntezy DNA w komórkach spoczynkowych, ekspresji genów różnicowania, ekspresji protoonkogenów komórkowych, budowy chemicznej i mechanizmów oddziaływań hormonów i czynników wzrostowych na komórki, mechanizmu działania promocyjnych czynników na transformowane komórki (np. kwasu forbolowego i jego pochodnych), mechanizmów wzajemnych oddziaływań na siebie kontaktujących się ze sobą komórek — wszystkie te dotychczas odrębne kierunki badań ściśle się ze sobą zazębiły i, jak to się ostatnio coraz wyraźniej ujawnia, prowadzą do analizy z rozmaitych stron, ale tych samych procesów. Są nimi łańcuchy reakcji odpowiedzialne za odebranie przez komórkę sygnałów z jej środowiska dzięki obecności przy powierzchni błony specyficznych receptorów,

* Prof. dr hab., Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Al. Mickiewicza 3, 30-120 Kraków

przetworzenie i wzmocnienie tych sygnałów w błonie, przekazanie następnych sygnałów do cytoplazmy, a wreszcie do jądra, gdzie następuje odpowiedź w postaci zmiany ekspresji genów, których produkty regulują zwrotnie fenotyp i funkcje komórki, włączając w to receptorowe funkcje błony komórkowej.

W publikowanych w zeszytach 2—3 i 4 tomu 33/1987 „Postępów Biochemii” artykułach większą uwagę zwrócono na czynniki wzrostowe niż na czynniki ograniczające wzrost, z których szerzej omówiono tylko interferony i transformujące czynniki beta. W płynach ustrojowych obecnych jest wiele czynników pobudzających i hamujących wzrost, wydzielanych przez komórki. Subtelna równowaga między oddziaływaniem tych czynników na daną komórkę warunkuje jej zachowanie się w organizmie. Również „starzenie się” i „śmiertelność” komórek w hodowlach *in vitro* okazały się zależne od takich oddziaływań, gdyż prawidłowe komórki zwierzęce hodowane w płynach bez surowicy okazały się nieśmiertelne. Molekularne mechanizmy działania na komórki czynników zwalniających i ograniczających wzrost są jak na razie mniej poznane niż czynników wzrostowych i obecnie stały się przedmiotem intensywnych badań.

Trzecią wyraźnie zaznaczającą się tendencją jest coraz to szersze uwzględnianie analizy ekspresji określonych genów. Dzięki nowoczesnym metodom inżynierii genetycznej, biochemii i immunocytochemii możliwe stało się śledzenie zmian ekspresji poszczególnych genów i określanie sekwencji tych zmian podczas np. pobudzenia komórek do syntezy DNA, podczas przebiegu cyklu komórkowego, po indukcji różnicowania komórkowego względnie transformacji nowotworowej. Opracowano również metody pozwalające na identyfikowanie i badanie lokalizacji w komórce białek będących produktami określonych genów, odpowiadających im informacyjnych kwasów rybonukleinowych, a także metody zezwalające na określenie kinetyki obrotu tych ostatnich w komórce. Dzięki tym metodom badania uległy bardzo wyraźnej konkretyzacji. Dzisiaj nie wystarcza badanie obrotu białek danej struktury komórkowej czy też obrotu mRNA, ale badania dotyczą już zwykle obrotu danego, określonego białka lub danego, określonego mRNA.

Dzięki wspomnianym tutaj nowym tendencjom w badaniach zjawisk biologicznych jesteśmy świadkami szybkiego postępu wiedzy o organizmach, o czynnościach komórek i mechanizmach regulujących ich procesy życiowe. Poniżej zestawilem bibliografię wybranych artykułów publikowanych w latach 1986—1988 i zawierających materiały obrazujące postęp w aktualnej analizie mechanizmów regulacji podstawowych czynności komórek.

Kraków, 12 marca 1988

PIŚMIENICTWO

1. Adamson E. D., (1987), Oncogenes in development. *Development*, **99**, 449—471.
2. Berridge M. J., (1986), Regulation of ion channels by inositol triphosphate and diacylglycerol. *J. exp. Biol.*, **124**, 323—335.

3. Berridge M. J., (1986), Intracellular signalling through inositol triphosphate and diacylglycerol. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **367**, 447—456.
4. Burgess A. W., (1986), Growth factors, receptors and cancer. *BioEssays*, **5**, 15—18.
5. Claycomb W. C., Lanson Jr N. A., (1987), Proto-oncogene expression in proliferating and differentiating cardiac and skeletal muscle. *Biochem. J.*, **247**, 701—706.
6. Denhaedt D. T., Edwards D. R., Parfett C. L. J., (1986), Gene expression during the mammalian cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta*, **865** 83—125.
7. Duesberg P. H., (1987) Cancer genes: Rare recombinants instead of activated oncogenes (A review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** 2117—2124.
8. Chan C. P., Krebs E. G., (1987), Effects of growth factors on carbohydrate metabolism in cultured mammalian cells. w *Mechanisms of Insulin Action* (red. Belfrage P., Stralfors P.), str 13—32, Elsevier Science Publishers.
9. Goustin A. S., Leof E. B., Shimpley G. D., Moses H. L., (1986), Growth factors and cancer, *Cancer Res.*, **46** 1015—1029.
10. Gros F., Fiszman M., Montarras D., (1986). A developmental biologists' view on cancer. W *New Experimental Modalities in the Control of Neoplasia* (red. Chandra P.), str. 1—13. Plenum Publishing Corporation.
11. Hjelm K. K., (1986), Is non-genic inheritance involved in carcinogenesis? A cytotoxic model of transformation. *J. Theoret. Biol.*, **119**, 89—101.
12. Israel B. A., Shaeffer W. I., Cytoplasmic suppression of malignancy. *In Vitro* **23** 627—632.
13. Lloyd D., (1987), Biochemistry of the cell cycle. *Biochem., J.*, **242**, 313—321.
14. Loo D. T., Fuquay J. I., Rawson C. L., Barnes D. W., (1987), Extended culture of mouse embryo cells without senescence: Inhibition by serum, *Science*, **236**, 200—202.
15. Montarras D., Pinset C., (1987), Protooncogenes. *Biochemie*, **69**, 171—176.
16. Müller R., (1986), Proto-oncogenes and differentiation. *Trends in Biochem. Sci.*, **11**, 129—132.
17. Nicolson G. L., (1987), Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: From oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res.*, **47** 1473—1487.
18. Pardee A. B., (1987), Molecules involved in proliferation of normal and cancer cells: Presidential adress. *Cancer Res.*, **47** 1488—1491.
19. Sachs L., (1986), Hematopoietic growth and differentiation factors and the reversibility of malignancy: Cell differentiation and by-passing of genetic defects in leukemia. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.*, 165—176
20. Sartorelli A. C., (1985), Malignant cell differentiation as a potential therapeutic approach. *British J. Cancer*, **52**, 293—302.
21. Sharifi B. G., Bascom C. C., Johnson T. C., (1986), Cell surface interaction is sufficient for the biological activity of bovine sialoglycopeptide inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **134**, 1350—1357.
22. Suda Y., Suzuki M., Ikawa Y., Alizawa S., (1987), Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. *J. Cell. Physiol.*, **133**, 197—201.
23. Vitkauskas G. V., Canellakis E. S., (1985), Intercellular communication and cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta*, **823**, 19—34.
24. Weinstein I. B., (1987), Growth factors, oncogenes, and multistage carcinogenesis. *J. Cell. Biochem.*, **33**, 213—224.
25. Whitfield J. F., Durkin J. P., Franks D. J., Kleine L. P., Raptis L., Rixon R. H., Sikorska M., Walker P. R., (1987), Calcium, cyclic AMP and protein kinase C — partners in mitogenesis. *Cancer and Metast. Reviews*, **6**, 205—250.
25. Keski-Oja J., Leof E. B., Lyons R. M., Coffey R. J. Jr., Moses H. L., (1987), Transforming growth factors and control of neoplastic cell growth, *J. Cell. Biochem.*, **33**, 95—107.

1. Bessie M. L. (1900) ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...
16. ...
17. ...
18. ...
19. ...
20. ...
21. ...
22. ...
23. ...
24. ...
25. ...

ADAM EDMUND LICZMAŃSKI*

Toksyczność tlenu. I. Uszkodzenia żywych komórek

Oxygen toxicity. I. Damage of living cells

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Wolne rodniki
 - II-1. Wolne rodniki i ich powstawanie w komórce
 - II-2. Chemiczne właściwości wolnych rodników
- III. Tlen, jego właściwości oraz produkty redukcji
 - III-1. Tlen singletowy ($^1\text{O}_2$)
 - III-2. Rodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$)
 - III-3. Nadtlenek wodoru (H_2O_2)
 - III-4. Rodnik hydroksylowy (OH)
- IV. Procesy uszkadzające komórkę
 - IV-1. Uszkodzenia na poziomie cząsteczek
 - IV-2. Uszkodzenia na poziomie błon. Peroksydacja lipidów
 - IV-2.1. Inicjacja peroksydacji lipidów
 - IV-2.2. Rozkład nadtlenu lipidowych. Rozprzestrzenianie peroksydacji lipidów
 - IV-2.3. Produkty peroksydacji lipidów
- V. Związki generujące wolne rodniki
 - V-1. Właściwości parakwatu i jego toksyczne działanie
 - V-2. Mechanizm toksyczności parakwatu
- VI. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Free radicals
 - II-1. Free radicals and ways of their production in a cell
 - II-2. Chemical properties of free radicals
- III. Properties of oxygen and the products of its reduction
 - III-1. Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)
 - III-2. Superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$)
 - III-3. Hydrogen peroxide (H_2O_2)
 - III-4. Hydroxyl radical (OH)
- IV. Processes damaging a cell
 - IV-1. Damage on the molecular level

* Mgr, Akademia Rolnicza w Lublinie Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu, ul. H. Sawickiej 102, 22-400 Zamość

IV-2. Damage on the membranes level. Lipid peroxidation

IV-2.1. Initiation of lipid peroxidation

IV-2.2. Decomposition of lipid hydroperoxides. The propagation of lipid peroxidation

V. Compounds generating oxygen free radicals

V-1. Properties of paraquat and its toxic activity

V-2. Mechanism of paraquat toxicity

VI. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: — niesparowany elektron, np. w rodniku hydroksylowym, lub w rodniku nadhydroksylowym; \ominus — anionorodnik, np. rodnik ponadtlenkowy; \oplus — kationorodnik, np. rodnik parakwatowy, Pr — prometażyna, Pr^{\oplus} — rodnik prometażynowy, $^1\text{O}_2$ — tlen singletowy, $^1\Delta\text{gO}_2$ — stan delta tlenu singletowego, $^1\Sigma\text{g} + \text{O}_2$ — stan sigma tlenu singletowego, Lipid-OOH — wodoronadtlenek lipidowy (nienasyconego kwasu tłuszczowego), Lipid-O \cdot — rodnik oksyalkoholowy, O_2^{\ominus} — rodnik ponadtlenkowy, $\cdot\text{OH}$ — rodnik hydroksylowy, $\text{HO}_2\cdot$ — rodnik nadhydroksylowy, PUFA — wielonienasycone kwasy tłuszczowe, O_2^{\ominus} — jon nadttlenkowy, O^{\ominus} — jon nadttlenkowy, NAD(P) \cdot — rodnik fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, DMSO — sulfotlenek dimetylowy, DMF — N, N-dimetyloformamid, DETAPAC — kwas dietyleno-triamino-pentaoctowy, PQ^{2+} — dwukation parakwatowy, PQ^{\oplus} — rodnik parakwatowy, PQ — parakwat

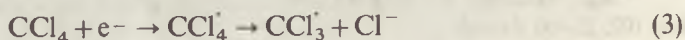
I. Wstęp

Tlen jest toksyczny dla organizmów beztlenowych, a w stężeniu wyższym, niż występuje w warunkach naturalnych, może być niebezpieczny również dla organizmów tlenowych. Tlen dezaktywuje bowiem układy enzymatyczne anaerobów niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania (np. kompleks nitrogenazy) [1]. Przebywanie aerobów w atmosferze o podwyższonej zawartości O_2 prowadzi do zahamowania aktywności niektórych enzymów, np. dehydratazy dihydroksykwosów i pirofosfokinazy 5-fosforybozowej. W wyższych stężeniach tlen hamuje rozwój chloroplastów, wzrost bakterii, zmniejsza przeżywalność siewek i wzrost korzeni, zwiększa częstość mutacji i uszkadza błony [2, 3, 4], a także może wywoływać schorzenia układu oddechowego i nerwowego [1].

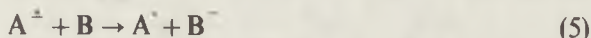
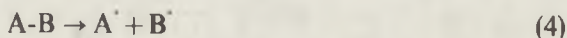
II. Wolne rodniki

II-1. Wolne rodniki i ich powstawanie w komórce

Wolne rodniki są to cząsteczki lub ich fragmenty zawierające niesparowany elektron. Atom wodoru, cząsteczka tlenu są przykładami wolnych rodników [5]. Niesparowany elektron nadaje rodnikowi właściwości paramagnetyczne. Struktury wolnorodnikowe mogą być elektrycznie obojętne albo obarczone ładunkiem dodatnim lub ujemnym [6]. Ilustrują to reakcje 1, 2 i 3.

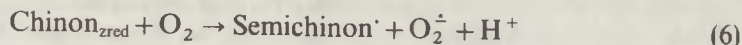


Wolne rodniki powstają w procesach homolitycznego rozrywania wiązań w cząsteczkach związków chemicznych (Reakcja 4) lub w wyniku przenoszenia elektronów (Reakcja 5).



Procesy te przebiegają w wyniku absorpcji promieniowania jonizującego, UV, widzialnego, termicznego, mogą również być wynikiem reakcji red-oks, takich jak: nieenzymatyczne reakcje przenoszenia elektronów, reakcje katalizowane przez metale i procesy katalizowane przez enzymy [6]. Aby mogły powstać rodniki w następstwie napromieniowywania światłem widzialnym niezbędny jest fotouczulacz. Absorbując on światło o określonej długości fali, osiąga stan singletowy, a następnie tripletowy, oddziałując zaś z tlenem przekazuje nań energię wzbudzenia. W rezultacie powstaje tlen singletowy (1O_2) [6].

Uważa się na ogół, że wolne rodniki powstają w reakcjach typu red-oks, które polegają na nieenzymatycznym przenoszeniu elektronów (Reakcja 6). W procesach metabolicznych jednak mogą również powstawać wolne rodniki, stanowiąc one niektóre pośrednie produkty określonego szlaku [6].



II-2. Chemiczne właściwości wolnych rodników

Specyficzne właściwości wolnych rodników zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1

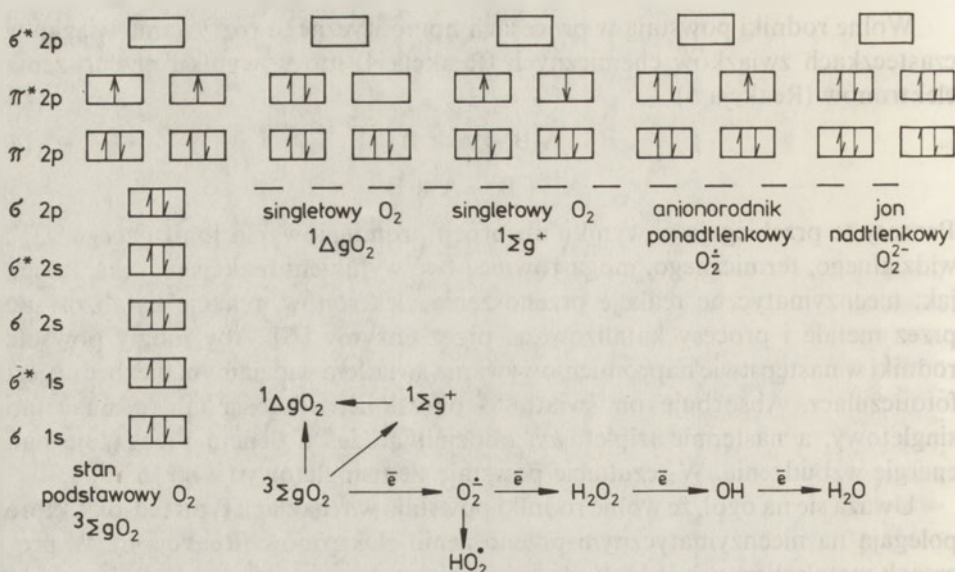
Właściwości wolnych rodników

Udział w przemianach	Przykłady
Dostarczanie elektronów	$CO_2^{\cdot} + O_2 \rightarrow CO_2 + O_2^{\cdot}$
Pobieranie elektronów	$^{\cdot}OH + RS^- \rightarrow OH^- + RS^{\cdot}$
Odrywanie atomów wodoru	$CCl_3^{\cdot} + RH \rightarrow CHCl_3 + R^{\cdot}$
Przylączenie rodnika	$CCl_3^{\cdot} + CH_2=CH_2 \rightarrow CH_2(CCl_3)=CH_2^{\cdot}$
Anihilacja rodników	$CCl_3^{\cdot} + CCl_3^{\cdot} \rightarrow C_2Cl_6$
Dysmutacja rodników	$CH_3CH_2^{\cdot} + CH_3CH_2^{\cdot} \rightarrow CH_2=CH_2 + CH_3-CH_3$

III. Tlen, jego właściwości oraz produkty redukcji

W cząsteczce tlenu są dwa niesparowane elektrony, które nadają jej właściwości paramagnetyczne i wolnorodnikowe * (Ryc. 1). Obydwa niesparo-

* Podstawowe wiadomości na temat elektronowej budowy cząsteczki tlenu i jej reaktywności zawarte są w podręczniku A. Bieleńskiego, Podstawy chemii nieorganicznej, PWN Warszawa, (1987).



Ryc. 1. Rozmieszczenie elektronów na orbitalach wiążących i antywiążących w cząsteczce tlenu i produktach jego redukcji. Schemat całkowitej czteroelektronowej redukcji cząsteczki tlenu. Gwiazdką oznaczono orbitale antywiążące. Prostokąty oznaczają orbitale molekularne, wektory natomiast spiny elektronów umieszczonych na tych orbitalach

wane elektrony umieszczone na zewnętrznych orbitalach mają równoległe spiny. Zgodnie z zakazem Pauliego przyłączane do cząsteczki tlenu elektrony powinny mieć spiny antyrównoległe. W konsekwencji zakazu Pauliego redukcja tlenu następuje etapowo. Podczas całkowitej czteroelektronowej redukcji cząsteczki tlenu powstają produkty pośrednie o różnej toksyczności: rodnik ponadtlenkowy i jego sprotonowana forma (HO_2^-), nadtlenuk wodoru i rodnik hydroksylowy. Oksydazy i oksygenazy zawierające w centrach aktywnych jony metali (z tzw. grup przejściowych), mogą pobierać lub oddawać elektrony, przełamując ograniczenia spinowe [5].

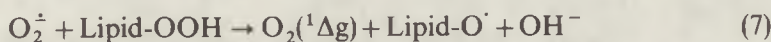
III-1. Tlen singletowy (1O_2)

Stan wzbudzony O_2 , w którym dwa spiny elektronowe nie są równoległe jak w paramagnetycznym tlenie, lecz są antyrównoległe, nawet w rozdzielonych orbitalach molekularnych określa się terminem „tlen singletowy”. Wyróżniamy dwa stany singletowe, delta i sigma. W stanie delta tlenu singletowego, dwa zewnętrzne elektrony o spinach przeciwnych zajmują ten sam orbital, a orbital zewnętrzny uprzednio zajmowany przez jeden z elektronów pozostaje nieobsadzony (Ryc. 1). Dwa zewnętrzne elektrony formy sigma ($1\Sigma_g^+ O_2$), podczas wzbudzenia, zajmują oddzielne orbitale, a ich liczby spinowe przyjmują wartości przeciwstawne. Forma $1\Sigma_g^+ O_2$ jest bogatsza energetycznie niż $1\Delta_g O_2$ w stosunku do tlenu w stanie podstawowym, dlatego też jest bardziej niestabilna i

ma krótszy półokres życia niż $^1\Delta gO_2$ [7]. Czas życia $^1\Sigma g^+O_2$ w roztworze wodnym wynosi 10^{-11} s natomiast $^1\Delta gO_2$ około 2×10^{-6} s. W fazie gazowej czasy życia stanów delta i sigma wynoszą odpowiednio 45 min i 12 s.

Naświetlane, w obecności tlenu, biologicznie czynne barwniki, jak np. chlorofile, retinal, flawiny, porfiryny powodują wzbudzenie O_2 do stanu delta [7]. *In vivo* tlen singletowy wytwarzany jest w naświetlanych chloroplastach [1], w siatkówce i soczewce oka ssaków [8—10].

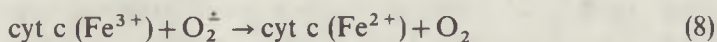
Tlen singletowy pośredniczy w szeregu reakcji, np. monoooksygenazy związanej z cyt P-450 [7], w utlenianiu difenylofuranu do dimetyloetylenu przez frakcję mikrosomalną wątroby [7]. Rodnik ponadtlenkowy może reagować z uprzednio powstałymi wodoronadtlenkami lipidowymi, generując singletowy O_2 [12—14] (Reakcja 7): prawdopodobnie reakcja ta wymaga śladowych ilości jonów metali.



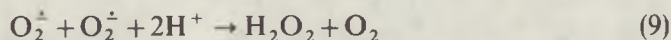
III-2. Rodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\dot{}}$)

W organizmach aerobowych znaczna część pobieranego tlenu wykorzystywana jest jako akceptor elektronów. Elektron pobrany przez cząsteczkę tlenu, będącą w podstawowym stanie trypletowym, zajmuje jeden z antywiążących orbitali (Ryc. 1). Powstały rodnik nazwano rodnikiem ponadtlenkowym [15]. Takie enzymy, jak dioksygenaza tryptofanowa i oksydaza ksantynowa, katalizują reakcje utleniania polegające na przenoszeniu pojedynczych elektronów z substratu na cząsteczkę O_2 . Rodnik ponadtlenkowy wytwarzany jest podczas „wybuchu oddechowego” komórek fagocytujących [16—18], w reakcjach samoutleniania zredukowanych związków występujących w komórkach (adrenalina, ferredoksyna, flawiny), w procesach transportu elektronów u bakterii [19], w chloroplastach [20, 21], w mitochondriach [22], retikulum endoplazmatycznym roślin [21] i zwierząt [23]. W tabeli 2 wyszczególniono układy wytwarzające rodniki ponadtlenkowe.

Rodnik ponadtlenkowy może być utleniaczem i reduktorem [24]. W rozpuszczalnikach niepolarnych $O_2^{\dot{}}$ jest silną zasadą i nukleofilem [25, 26]. Natomiast w roztworach wodnych działa, bądź jak silny czynnik redukujący oddając swój dodatkowy elektron, bądź jako słaby czynnik utleniający ulegający redukcji do H_2O_2 [1]. $O_2^{\dot{}}$ na przykład redukuje cytochrom c (Reakcja 8), a utlenia cząsteczki kwasu askorbinowego i adrenaliny.



W roztworach wodnych $O_2^{\dot{}}$ reaguje z drugą cząsteczką rodnika ponadtlenkowego (Reakcja 9) [5]. W rezultacie jeden z reagujących rodników ulega redukcji do H_2O_2 , drugi natomiast utlenieniu do O_2 . Reakcję tę nazwano reakcją dysmutacji.



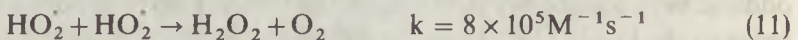
Reagowanie ze sobą dwóch rodników ponadtlenkowych jest bardzo powolne z

Tabela 2

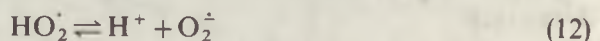
Źródła rodników ponadtlenkowych w komórkach i ich otoczeniu

Źródła rodników ponadtlenkowych	Przykłady
Enzymy i inne białka	dioksygenaza tryptofanowa, oksydaza ksantynowa, peroksydaza (np. podczas utleniania NADH), dehydrogenazy flawinowe, oksydaza aldehydowa, cytochrom P-450, rubredoksyna, białka żelazo-siarkowe (np. ferredoksyny), hemoglobina.
Małe cząsteczki podlegające reakcji samoutlenienia	zredukowane ryboflawiny (FMNH ₂ , FADH ₂), dwufenole (adrenalina), melanina.
Organelle komórkowe	mitochondrialny łańcuch przenośników elektronów, chloroplastowy łańcuch przenośników elektronów (PS I), mikrosomalny łańcuch przenośników elektronów (cyt. b ₅ , P-450), błony plazmatyczne (leukocyty polimorfonuklearne), bakteryjny łańcuch transportu elektronów.
Czynniki środowiska, które mogą indukować w komórce tworzenie O ₂ ^{•-}	UV, ultradźwięki, promieniowanie X i gamma, toksyczne chemikalia, jony metali (np. Cu ²⁺).

powodu elektrostatycznego odpychania się molekuł. Uważa się więc, że aby mogła nastąpić dysmutacja niezbędne jest wytworzenie sprotonowanej formy rodnika ponadtlenkowego (Reakcje 10, 11) [27]. Reakcja dysmutacji jest znacznie szybsza w środowisku o niskim pH (protonowanie O₂^{•-}), a wolniejsza w naturalnym środowisku komórki, ponieważ ograniczają ją stężenia protonów [27].

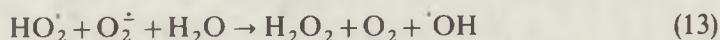


Powstający w układach biologicznych rodnik ponadtlenkowy ma stosunkowo długi „czas życia”, może więc dyfundować z miejsca powstawania do innych struktur komórkowych [3, 28]. Sprotonowana forma rodnika ponadtlenkowego jest znacznie silniejszym utleniaczem niż O₂^{•-} [29]. Wartość pK_a dysocjacji rodnika nadhydroksylowego (Reakcja 12) wynosi 4,88, może on zatem występować, ale w niewielkich ilościach, w naturalnym środowisku komórki [28].

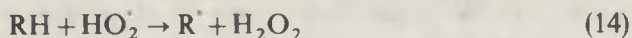


Badając zdolność reagowania O₂^{•-} z takimi związkami jak aminokwasy, kwasy karboksylowe, czynniki chelatujące, stwierdzono, że rodnik ponadtlen-

kowy nie wchodzi w reakcję z tymi związkami, a zatem nie może być odpowiedzialny za biologiczne uszkodzenia obserwowane w jego obecności [31]. W celu wyjaśnienia przyczyn toksyczności $O_2^{\cdot -}$ rozpatrzono w tym względzie rodnik hydroksylowy i singletowy O_2 . Wytwarzanie $\cdot OH$ [32] i singletowego O_2 [33, 34] zostało wykazane *in vitro*, ale nie wykazano ich dotąd *in vivo* [32]. W parze $HO_2^{\cdot}/O_2^{\cdot -}$ rodnik nadhydroksylowy jest znacznie silniejszym utleniaczem. Potwierdzają to wartości potencjałów red-oks [35] oraz kinetyczne dane zmiatania HO_2^{\cdot} i $O_2^{\cdot -}$ [36, 37]. Rodniki nadhydroksylowe dysmutują (Reakcja 11) lub utleniają $O_2^{\cdot -}$ (Reakcja 13).



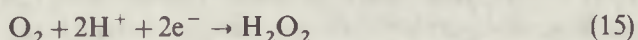
Sugeruje się, że uszkodzenia błon, obserwowane w układach biologicznych, są efektem równoczesnego działania HO_2^{\cdot} i $O_2^{\cdot -}$ [38]. Rodnik ponadtlenkowy reagując z jonem metalu Mn(II) wytwarza znacznie silniejszy utleniacz, początkowo identyfikowany jako Mn(III) [1], a następnie $MnO_2^{\cdot +}$ [30]. $O_2^{\cdot -}$, oraz bardziej reaktywne jego pochodne mogą docierać do miejsca ataku z większą skutecznością niż HO_2^{\cdot} . We wnętrzu komórki o pH 7,4 mniej niż 1% $O_2^{\cdot -}$ występuje w formie sprotonowanej [24]. pH mikrośrodowiska we wnętrzu komórki może być jednak niższe w stosunku do wartości 7,4. Rodnik ponadtlenkowy dyfundując do ujemnie naładowanej powierzchni błony ulega protonowaniu [40]. To z kolei powoduje podwyższenie stężenia HO_2^{\cdot} w pobliżu błony. Powstałe rodniki nadhydroksylowe mogą zanikać w wyniku dysmutacji lub utleniania $O_2^{\cdot -}$ (Reakcja 13). Jednakże niskie stężenia $HO_2^{\cdot}/O_2^{\cdot -}$ w stanie równowagi *in vivo* [3] wynikają, jak się przypuszcza [41, 42], z dyfuzji HO_2^{\cdot} do domen lipidowych błony (Reakcja 14) [41, 42]. W efekcie następuje atak tych rodników na allilowe atomy wodoru wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [31]. Takiej selektywności nie obserwowano w podobnych badaniach z rodnikami $\cdot OH$, które niespecyficznie odrywają atomy wodoru od tłuszczów [31].



W reakcji 14 symbolem RH oznaczono wielonienasycony kwas tłuszczowy, R^{\cdot} natomiast rodnik powstały w wyniku oderwania allilowego atomu wodoru od PUFA.

III-3. Nadtlenek wodoru (H_2O_2)

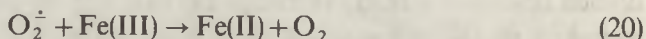
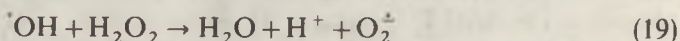
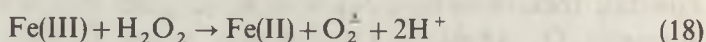
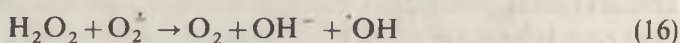
W wyniku przyłączenia do rodnika ponadtlenkowego następnego elektronu powstaje jon nadtlenkowy. Jon ten nie ma niesparowanych elektronów (Ryc. 1) i nie jest wolnym rodnikiem. Ponieważ pKa dysocjacji H_2O_2 jest bardzo wysoka (11,8), O_2^{2-} powstający w środowisku o pH 7,4 ulega natychmiastowemu sprotonowaniu do nadtlenku wodoru. W komórkach występują enzymy przenoszące dwa elektrony na każdą cząsteczkę tlenu z utworzeniem O_2^{2-} , np. oksydaza L-aminokwasów, oksydaza glikolanowa (Reakcja 15). Stwierdzono



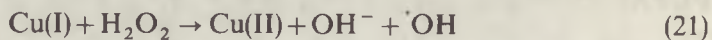
wytwarzanie H_2O_2 w badanych *in vitro* mitochondriach, chloroplastach [23, 43] i mikrosomach [44]. W badaniach *in vivo* potwierdzono powstawanie nadtlenu wodoru obserwowane w mitochondriach [45, 46], retikulum endoplazmatycznym [47, 48], chloroplastach roślin wyższych [43]. Nadtlenek wodoru swobodnie penetruje błony i ściany komórkowe [1]. W roztworach wodnych nadtlenek wodoru wykazuje właściwości słabego kwasu. Podczas rozkładu H_2O_2 działa utleniająco, sam zaś redukuje się. Nadtlenek wodoru w obecności jonów metali grup przejściowych, takich jak Fe, Cu ulega rozpadowi z wytworzeniem reaktywnego rodnika hydroksylowego.

III-4. Rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$)

Po wykazaniu niskiej reaktywności O_2^{\pm} [49], przyjęto, że przyczyną toksycznych efektów tlenu jest $\cdot OH$ powstający w reakcji H a b e r a - W e i s s a (Reakcja 16). Już w 1884 r F e n t o n zaobserwował, że w mieszaninie nadtlenu wodoru i soli żelaza Fe(II) powstają rodniki hydroksylowe (Reakcja 17) [50]. Śladowe ilości Fe(III) mogą reagować dalej z H_2O_2 (Reakcja 18), a także możliwe są inne reakcje (Reakcje 19, 20).



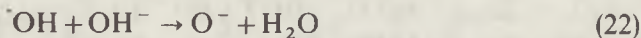
Jeśli w mieszaninie reakcyjnej oprócz soli Fe(II) i H_2O_2 znajduje się jeszcze inny akceptor $\cdot OH$, to następuje katalizowany przez Fe rozkład H_2O_2 na tlen i wodę [51]. W reakcji soli Cu(I) z H_2O_2 powstają rodniki hydroksylowe ze znacznie większą stałą szybkości reakcji niż z solami Fe(II) (Reakcja 21). Natomiast jony Mn(II) występujące w komórkach bakteryjnych, roślinnych i zwierzęcych nie uczestniczą w tworzeniu rodnika hydroksylowego [51, 52].



Rodnik hydroksylowy reaguje z cząsteczkami różnych związków zawartych w komórkach [50]. Są to na ogół reakcje polegające na przenoszeniu elektronu z $\cdot OH$ na dowolną cząsteczkę i odrywania protonów od cząsteczek wielu związków [5]. W przeciwieństwie do H_2O_2 , O_2^{\pm} rodniki hydroksylowe nie penetrują komórki [1, 31], a zatem *in vivo* mogą reagować z cząsteczkami z najbliższego ich sąsiedztwa [31, 53]. W rezultacie tych oddziaływań powstają wtórne rodniki o zróżnicowanej aktywności chemicznej w stosunku do $\cdot OH$, np. w reakcji $\cdot OH$ z jonem węglanowym CO_3^{2-} , powstaje rodnik węglanowy, CO_3^{\pm} , który jest silnym czynnikiem redukującym [54].

Rodnik hydroksylowy jest bardzo słabym kwasem i dysocjuje uwalniając

alkaliczny jon nadtlenkowy, $O_2^{\cdot-}$ (Reakcja 22). Wartość pK_a wyznaczona dla $^{\cdot}OH$ wynosi 11,85 i jest prawie identyczna z pK_a H_2O_2 [55].



Dwa rodniki hydroksylowe z łatwością tworzą cząsteczkę H_2O_2 , mogą też reagować z wielu innymi rodnikami [55]. Do utworzenia jednego $^{\cdot}OH$ potrzebne są trzy rodniki $O_2^{\cdot-}$ (reakcja protonowania, dysmutacji, Fentona) [56]. Fe-EDTA w środowisku o pH 4,8 stymuluje powstawanie rodników $^{\cdot}OH$ [56].

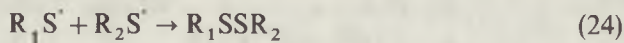
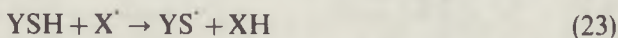
W pewnych warunkach patologicznych jony Fe występują w płynach organicznych w formie niezwiązanej z białkami [57]. Przypuszcza się, że w tych warunkach ich ligandami są cytrynian i fosforan [5, 58, 59]. W środowisku o pH 7,3 jony żelaza związane z cytrynianem są około 5-cio krotnie efektywniejszymi katalizatorami tworzenia $^{\cdot}OH$ z $O_2^{\cdot-}$ w porównaniu z fosforanem [59].

pH wnętrza komórki jest bliskie obojętnemu, podczas np. fagocytozy następuje, lokalnie, obniżenie pH wewnątrz fagosomu do wartości 4,5 — 5,5 [60, 61]. W strukturach biologicznych takich, jak fagosomy [60], lizosomy [62], przestrzeń wewnątrztylakoidalna chloroplastów [63], wakuole niektórych roślin [64], mogą wystąpić warunki (zakwaszenie środowiska), sprzyjające powstawaniu dużych ilości $^{\cdot}OH$.

IV. Procesy uszkadzające komórkę

IV-1. Uszkodzenia na poziomie cząsteczek

Wolne rodniki wywołują *in vitro* chemiczne modyfikacje oraz uszkodzenia białek, lipidów, węglowodanów i nukleotydów [50]. Jeśli reaktywny rodnik powstaje w bezpośrednim sąsiedztwie DNA, to może spowodować zmiany w jego strukturze prowadzące do mutacji lub efektów cytotoksycznych [65 — 67]. Utlenione wolne rodniki mogą ponadto zmieniać stan red-oks par NAD/NADH i NADP/NADPH, indukować powstanie NAD(P) $^{\cdot}$ i jego dimeryzację [68]. Grupy tiolowe białek i innych związków mogą podlegać utlenianiu przez wolne rodniki, a powstałe rodniki tiolowe mogą dimeryzować [6], tworząc mieszane dwusiarczki (Reakcje 24, 24).



$O_2^{\cdot-}$ w środowisku aprotonowym* (aprotycznym), a rodnik hydroksylowy w protonowym** (protonogennym) rozrywają wiązania dwusiarczkowe powo-

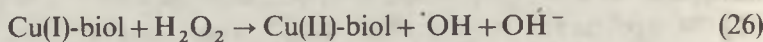
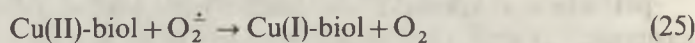
* Rozpuszczalnik polarny o średnich wartościach względnej przenikalności elektrycznej, nie zawierający kwasowego atomu wodoru, np. DMSO, DMF, sulfolan.

** Rozpuszczalnik zawierający w cząsteczce atom wodoru połączony z atomem tlenu lub azotu, co powoduje znaczną jego kwasowość, np. woda, metanol.

R. T. Morrison, R. N. Boyd, Chemia organiczna, T1, PWN Warszawa, (1985).

dując denaturację niektórych białek [69]. Również utlenianie grup -SH białek, uwarunkowane obecnością O_2^{\pm} , prowadzi do tych samych uszkodzeń [69]. Zwiększanie poziomu O_2^{\pm} i HO_2^{\cdot} w komórce dezaktywuje cyklazę adenylową w wyniku utleniania jej grup -SH do -S-S- przez rodniki RS^{\cdot} [70, 71]. Wolne rodniki powodują agregację białek i peroksydację lipidów osłonki mielinowej [72], mogą też indukować polimeryzację reszt tyrozynowych [73], co w efekcie prowadzi do agregacji wspomnianych białek.

W celu wyjaśnienia cytotoksycznych efektów rodnika ponadtlenkowego, zaproponowano hipotezę, według której O_2^{\pm} reagując z jonem miedzi $Cu(II)$, zasocjonowanym z czynną biologicznie cząsteczką (Reakcja 25), redukuje kompleks miedziowy do miedziawego. Kompleks miedziawy reaguje następnie z cząsteczką H_2O_2 , co, podobnie jak w reakcji Fentona, powoduje utlenienie kompleksu miedziawego z wytworzeniem $\cdot OH$ (Reakcja 26).



Powstały rodnik hydroksylowy może reagować z cząsteczkami znajdującymi się w bezpośrednim sąsiedztwie jego tworzenia.

Nie tylko rodniki tlenowe, lecz również tlen cząsteczkowy może powodować utratę aktywności biologicznej niektórych cząsteczek. Np. tlen dezaktywuje transferazę amidofosforybulozową i dehydratazę dihydroksykwasów [2, 74], prawdopodobnie w następstwie oddziaływań z centrami aktywnymi tych enzymów, a tlen singletowy uszkadza cząsteczki chlorofilu, powodując zanik jego charakterystycznego zabarwienia [75].

IV-2. Uszkodzenia na poziomie błon. Peroksydacja lipidów

Składniki błon biologicznych (lipidy, białka, węglowodany) często są celem ataku dyfundujących, oraz powstających w nich lub przenikających do ich wnętrza wolnych rodników tlenowych (Tab. 3).

Tabela 3

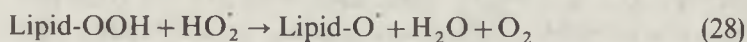
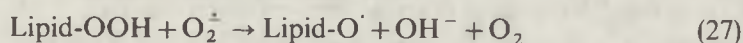
Uszkodzenia błon biologicznych wywoływane przez wolne rodniki

- modyfikacja aktywności składników błony (np. enzymów związanych z błonami),
- zmiany struktury błon wpływające na funkcje i ich antygenowy charakter,
- utlenianie grup tiolowych,
- zmiany w stosunku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i białka,
- inicjacja peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z bezpośrednim wpływem na strukturę błony i jej płynność,
- rozprzęgnięcie transportu przez błony.

Peroksydacji ulegają wolne i zestryfikowane kwasy tłuszczowe. Jest to proces lawinowy. Starterowy wolny rodnik R^{\cdot} reagując z wielonienasyconym kwasem tłuszczowym inicjuje serię reakcji. W rezultacie proces ten bardzo szybko rozprzestrzenia się, a powstałe związki o charakterze wolnych rodników, w wyniku oddziaływań z następnymi wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, powodują wytwarzanie nowych rodników.

IV-2.1. Inicjacja peroksydacji lipidów

Nie wyjaśniono jeszcze definitywnie co inicjuje proces peroksydacji lipidów. Uważano, że sole metali i ich kompleksy są czynnikiem rozpoczynającym ten proces. Obecnie wiadomo, że katalizują one rozpad pierwotnych wodoronadtlenków lipidowych. Bardzo często funkcję startera peroksydacji lipidów przypisuje się tlenowi singletowemu. Jeden z mechanizmów tworzenia wodorotlenków lipidowych polega na bezpośredniej reakcji tlenu singletowego (w formie delta) z lipidami [76]. Naświetlanie nienasyconych kwasów tłuszczowych w obecności fotouczulaczy, biorących udział w tworzeniu singletowego O_2 , inicjuje peroksydację lipidów. Natomiast układy wytwarzające O_2^{\pm} [77] i $^{\cdot}OH$ [78], stymulują peroksydację kwasów tłuszczowych w błonach, podczas gdy sprotonowana forma O_2^- , HO_2^{\cdot} , atakuje bezpośrednio PUFA, generując wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych [31]. Przypuszcza się jednocześnie [79], że HO_2^{\cdot} i O_2^{\pm} rozkładają wodoronadtlenki lipidowe (Reakcje 27, 28) i powodują powstawanie rodników oksyalkoholowych, które są bardziej reaktywne niż rodniki wodoronadtlenkowe w zainicjowanej peroksydacji.



Zredukowane związki chelatujące żelazo generują rodniki tlenowe w tym O_2^{\pm} i $^{\cdot}OH$ [80-82]. Szybkość peroksydacji izolowanych lipidów błon i frakcji mikrosomalnej przyspiesza dodanie kwasu askorbinowego, jako czynnika redukującego, w obecności chelatów Fe(III) [83] lub związków zawierających grupy tiolowe. Ten sam efekt, przyspieszenie peroksydacji, wywołuje reduktaza NADPH-cyt c z frakcji mikrosomalnej, redukująca wiele chelatów Fe(III), takich jak np. Fe(III)-ADP [86].

We wszystkich omówionych przykładach rodniki hydroksylowe powstają *in vitro* [87, 88], dodawanie zmiataczy tych rodników (związki usuwające rodniki z mieszaniny reakcyjnej) ma niewielki wpływ na obserwowaną szybkość peroksydacji [86, 87]. A zatem rodniki hydroksylowe mimo, że są wytwarzane *in vitro*, nie inicjują peroksydacji lipidów. Sugerowano [86], że rodnik ponadferylowy może inicjować ten proces. Jednakże bardziej prawdopodobnym inicjatorem wydaje się rodnik ferylowy, reaktywniejszy od ponadferylowego.

IV-2.2 Rozkład wodoronadtlenków lipidowych. Rozprzestrzenianie peroksydacji lipidów

Czyste chemicznie wodoronadtlenki lipidowe są stabilne w temperaturach naturalnego środowiska komórki, a skompleksowane jony metali grup przejścio-

wych (np. kompleksy soli żelaza z jonem fosforanowym, estry fosforanowe), katalizują ich rozkład. Efektywne są również hemoproteiny, hem oraz białka zawierające żelazo nie związane z hemem [89, 90, 86]. Związki te mogą współuczestniczyć w rozprzestrzenianiu peroksydacji lipidów *in vivo*. Jednakże białka transportujące żelazo, jak np. laktoferyna i transferyna nie stymulują rozkładu wodoronadtlenków lipidowych [91], podczas gdy ferrytyna (białko magazynujące nadmiary żelaza) stymuluje [92]. Zredukowane związki żelaza reagując z wodoronadtlenkami lipidowymi indukują tworzenie rodników oksyalkoholowych. Również związki zawierające Fe(III) mogą uwalniać rodnik $O_2^{\cdot -}$ z wodoronadtlenków lipidowych. Rodniki ponadtlenkowy i oksyalkoholowy stymulują łańcuch reakcji peroksydacji lipidów, poprzez dalsze odrywanie atomów wodoru od cząsteczek nienasyconych tłuszczowców. Związki chelatujące żelazo, takie jak EDTA i DETAPAC zwiększają szybkość peroksydacji, ale i również hamują ją, pomimo stymulacji tego procesu przez sole żelaza. Obserwowany efekt zależy od stosunku stężeń chelatora i soli żelaza. Natomiast desferal (związek kompleksujący żelazo), hamuje peroksydację we wszystkich testowanych stężeniach [93, 94]. Rozkład wodoronadtlenków stymulują również sole miedzi [95, 96].

IV-2.3. Produkty peroksydacji lipidów

Peroksydacja lipidów jest procesem nieenzymatycznym, lub katalizowanym przez bliżej nieznane enzymy.

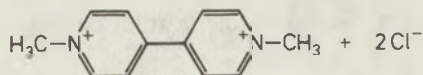
Produkty peroksydacji mogą wywoływać efekty cytotoksyczne, np. hydroksypentalal hamuje aktywność enzymów związanych z błonami, takich jak fosfataza 6-glukozowa i cyklaza adenylova [97, 98]. Szczególne zainteresowanie badaczy wzbudzają produkty degradacji prostaglandyn. Pierwszymi produktami peroksydacji kwasu arachidonowego są kwasy hydroperoksyekoizatetraenowe, które mogą być przekształcane do leukotrienów wykazujących aktywność farmakologiczną [99, 100].

V. Związki generujące wolne rodniki

Takie związki, pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, jak: adriamycyna [101, 102], parakwat [103, 104], bleomycyna [105] i inne, mogą wzmacniać wytwarzanie wolnych rodników po wprowadzeniu do żywego organizmu. Sposób w jaki związki te generują wolne rodniki, jak również zagadnienia dotyczące ich udziału w efektach toksycznych tlenu, zostaną omówione na przykładzie parakwatu.

V-1. Właściwości parakwatu i jego toksyczne działanie

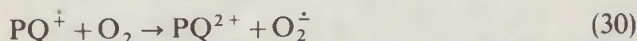
Parakwat (1,1'-dimetylo-4, 4'-bispirydył: metylowiologen) działa jako nieselektywny herbicyd. Po raz pierwszy został zsyntetyzowany w 1882 r [106], jego fitotoksyczne właściwości [107], wykazano dopiero w 1955r.



Ryc. 2. Budowa cząsteczki parakwatu

Dwukation parakwatowy (PQ^{2+}) składa się z dwóch zasocjowanych z sobą pierścieni pirydylowych, zmetylowanych w pozycjach 1 i 1'. Dwukation jest zobojętniany ujemnie naładowanymi chlorowcami. Aktywną częścią cząsteczki jest kation, natomiast anion nie wpływa na aktywność herbicydową tego związku. Redukcja parakwatu przebiega dwustopniowo. Pierwszy etap polega na tworzeniu względnie stabilnego wolnego rodnika, drugi, na przyłączeniu następnego elektronu. Reakcja ta przebiega tylko w drastycznych chemicznie warunkach redukcyjnych.

Fitotoksyczny wpływ parakwatu jest spowodowany możliwością redukcji go przez fotosystem I roślin (Reakcja 29) [104]. Powstające rodniki $PQ^{\dot{+}}$ gwałtownie reagując z O_2 (Reakcja 30) ulegają utlenieniu do dwuwartościowego kationu, a cząsteczka O_2 redukcji do $O_2^{\dot{-}}$. Powstały $O_2^{\dot{-}}$ indukuje tworzenie H_2O_2 , który uszkadza chloroplasty [108].



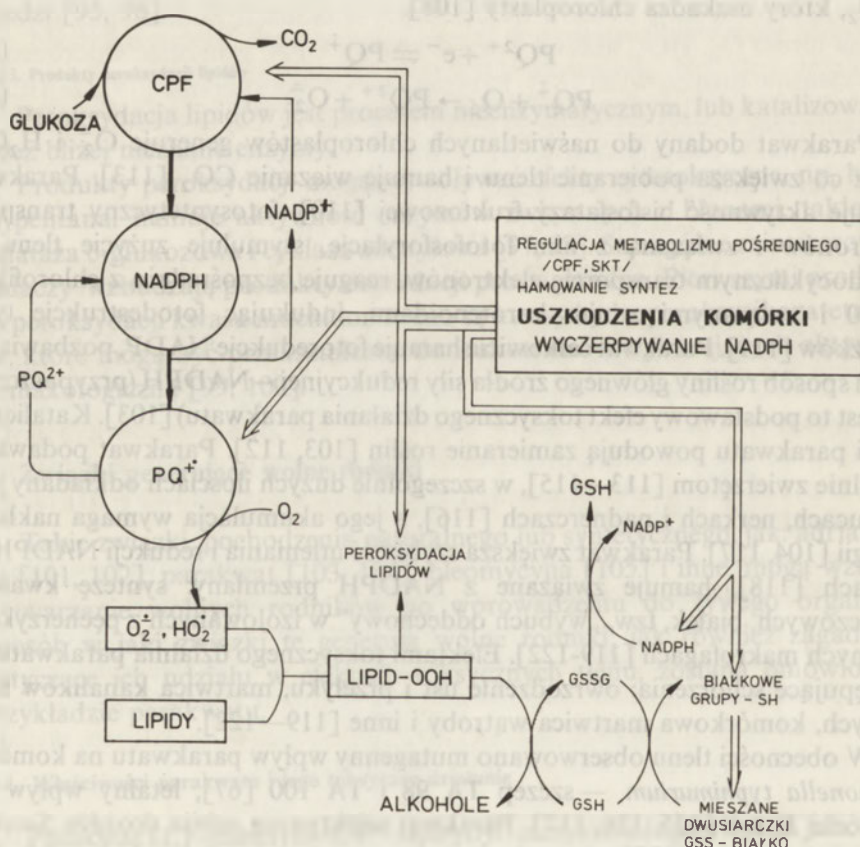
Parakwat dodany do naświetlanych chloroplastów generuje $O_2^{\dot{-}}$ i H_2O_2 , przez co zwiększa pobieranie tlenu i hamuje wiązanie CO_2 [113]. Parakwat hamuje aktywność bisfosfatazy fruktozowej [110], fotosyntetyczny transport elektronów i związaną z nim fotofosforylację, stymuluje zużycie tlenu w pseudocyklicznym transporcie elektronów, reaguje bezpośrednio z chlorofilem P-700 i związanymi z nim karotenoidami, indukując fotodestrukcję tych związków [111]. Parakwat całkowicie hamuje fotoredukcję NADP, pozbawiając w ten sposób rośliny głównego źródła siły redukcyjnej — NADPH (przypuszczalnie jest to podstawowy efekt toksycznego działania parakwatu) [103]. Kataliczne ilości parakwatu powodują zamieranie roślin [103, 112]. Parakwat podawany dożylnie zwierzętom [113—115], w szczególnie dużych ilościach odkładany jest w płucach, nerkach i nadnerczach [116], a jego akumulacja wymaga nakładu energii [104, 117]. Parakwat zwiększa szybkość utleniania i redukcji NADPH w płucach [118], hamuje związane z NADPH przemiany: syntezę kwasów tłuszczowych, białek, tzw. „wybuch oddechowy” w izolowanych z pęcherzyków płucnych makrofagach [119-122]. Efektami toksycznego działania parakwatu są następujące schorzenia: owrzodzenie ust i przełyku, martwica kanalików nerkowych, komórkowa martwica wątroby i inne [119—122].

W obecności tlenu obserwowano mutagenny wpływ parakwatu na komórki *Salmonella typhimurium* — szczep TA 98 i TA 100 [67], letalny wpływ na komórki *E. coli* [125, 126, 117]. Parakwat selektywnie zabija drożdże *Saccharomyces cerevisiae* [127], nie uszkadzając mutantów nie zdolnych do oddychania. Sugeruje to udział łańcucha oddechowego w efektach toksycznych parakwa-

tu. Wydaje się, że redukcja parakwatu ma miejsce w kompleksie III łańcucha oddechowego [128].

V-2. Mechanizm toksyczności parakwatu

Redukcja i utlenianie parakwatu oraz towarzyszące im powstawanie $O_2^{\cdot -}$ sprowadza się pośrednio lub bezpośrednio poprzez $\cdot OH$ lub tlen singletowy do peroksydacji lipidów i zamierania komórki. Przemiany te nie stanowią jednak pierwotnego mechanizmu toksycznych efektów parakwatu. Jedyną prawdopodobną konsekwencją akumulacji parakwatu w komórkach są reakcje utleniania i redukcji NADPH. Cykl pentozofosforanowy w komórkach ssaków jest jednym z głównych procesów redukujących NADP do NADPH [104]. Jeśli szybkość utleniania jest większa od szybkości jego regeneracji w cyklu pentozofosforanowym, to stężenia NADPH mogą być niższe od wymaganych do utrzymania procesów życiowych komórki. Rycina 3 przedstawia ewentualną kaskadę toksycznych efektów indukowanych przez parakwat i produkty redukcji O_2 , która może prowadzić do uszkodzenia komórki.



Ryc. 3. Łańcuch reakcji generujących rodnik ponadtlenkowy oraz możliwe skutki jego toksycznego działania. (CPF — cykl pentozofosforanowy, SGT — synteza kwasów tłuszczowych)

VI. Podsumowanie

Skutki toksycznego działania O_2 znane są od dawna. W 1954 r. Ger-shman i Gilbert [129, 130] przypuszczali, że szkodliwe efekty O_2 są następstwem wytwarzania w komórkach produktów jego redukcji. Hipoteza ta została rozwinięta przez Fridovicha w tzw. ponadtlenkową teorię toksyczności tlenu [28]. Według najnowszych badań $O_2^{\cdot -}$ nie może spowodować obserwowanych skutków. W reakcji H a b e r a - W e i s s a [1] powstaje między innymi rodnik hydroksylowy. W komórkach obecne są śladowe ilości metali grup przejściowych [1, 131]. Wysznięto więc alternatywną hipotezę, według której rodnik OH jest odpowiedzialny za biologiczne skutki toksyczności tlenu [1, 132, 133]. Oponenty tej hipotezy twierdzą, że w komórkach jony metali występują w postaci niedostępnej dla reakcji Fentona [134, 135], a wysoce niespecyficzna reaktywność rodnika hydroksylowego świadczy przeciw jego dominującej roli w efektach toksycznych, tym bardziej, że rodnik ten nie dyfunduje i ma krótki czas trwania [1, 6, 55], oraz może atakować struktury komórkowe w bezpośrednim sąsiedztwie jego tworzenia [53]. Najnowsze doniesienia potwierdzają możliwość indukowania uszkodzeń przez $O_2^{\cdot -}/HO_2^{\cdot}$ [136].

Panu doc. dr. hab. T. Bilińskiemu składam serdeczne podziękowania za krytyczne uwagi i pomoc w redagowaniu niniejszej pracy.

Część badań przedstawionych w artykule wykonano w ramach CPBR 3.13.

Artykuł otrzymano 3 marca 1988 r.

Zaakceptowano do druku 20 czerwca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

- Hall iwell B., (1981), w *Age Pigments* (red. Sohal R. S.), str. 1—62, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Hall iwell B., (1984), *Chloroplast metabolism. The structure and function of chloroplasts in green leaf cells*, str. 199—200, Claredon Press, Oxford.
- Fridovich I., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 147—159.
- Bruyninck W. J., Mason H. S., Morse S. A., (1978), *Nature*, **274**, 606—607.
- Hall iwell B., Gutteridge J. M. C., (1984), *Biochem. J.*, **219**, 1—14.
- Slater T. F., (1984), *Biochem. J.*, **222**, 1—15.
- Foot e C. S., (1982), w *Pathology of Oxygen* (red. Autor A. P.), str. 21—44, Academic Press, New York.
- Zigler J. S., Goosey J. D., (1982), *Photochem. Photobiol.*, **33**, 869—874.
- Katz M. L., Parker K. R., Handelman G. R., Bramel T. L., Dratz E. A., (1982), *Exp. Eye Res.*, **34**, 339—369.
- Kirschfeld K., (1982), *Proc. R. Soc. London, Ser. B.*, **216**, 71—85.
- Wefers H., Sies H., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **137**, 29—36.
- Lynch R. E., Fridovich I., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4697—4699.
- Pryor W. A., (1978), *Photochem. Photobiol.*, **28**, 787—801.
- Thomas M. J., Mehl K. S., Pryor W. A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 927—932.

15. Stevens J. B., Autor A. P., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3509—3514.
16. Fridovich I., (1978), *Science*, **201**, 875—880.
17. Barbior B. M., (1978), *N. Engl. J. Med.*, **298**, 659—668.
18. Barbior B. M., (1978), *N. Engl. J. Med.*, **298**, 721—725.
19. Shvinka J. G., Toma M. K., Galinina N. J., Skards J. V., Viesturs U. E., (1979), *J. Gen. Microbiol.*, **113**, 377—382.
20. Acada K., Kiso K., Yoshikawa K., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2175—2181.
21. Huq S., Palmer L. M., (1978), *Plant Sci. Lett.*, **11**, 351—358.
22. Berman H. C., Adnams C. M., Ivanetich K. M., Kench J. E., (1976), *Biol. Chem. J.*, **157**, 237—246.
23. Nohl H., Hegner D., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **82**, 563—567.
24. Bielski B. H. J., (1978), *Photochem. Photobiol.*, **28**, 645—649.
25. Elstner E. F., (1980), w: *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutases* (red. Bannister J. V., Hill H. A. O.), str. 394—401, Elsevier/North Holland, New York.
26. Purrington S. T., Kenion G. B., (1982), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **120**, 732.
27. Fridovich I., (1979), *Advanc. Inorg. Biochem.*, **1**, 1—40.
28. Fridovich I., (1974), *Advanc. Enzymol.*, **41**, 35—97.
29. Sawyer D. T., Gibian M. T., (1979), *Tetrahedron*, **35**, 1471—1481.
30. Bielski B. H. J., Chan P. C., (1978), *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 1920—1921.
31. Bielski B. H. J., Arudi R. L., Sutherland M. W., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 4759—4761.
32. Bors W., Saran M., Czapski G., (1980), w: *Biological and Clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase* (red. Bannister W. H., Bannister J. V.), str. 1—31, Elsevier/North Holland, New York.
33. Danen W. C., Arudi R. L., (1978), *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 3944—3945.
34. Mayeda E. A., Bard A. J., (1973), *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 6223—6226.
35. Ilan Y. A., Czapski G., Meisel D., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 209—224.
36. Behar D., Czapski G., Rabani J., Dorfman L. M., Schwarz H. A., (1970), *J. Phys. Chem.*, **74**, 3209—3213.
37. Bielski B. H. J., Allen A. O., (1977), *J. Phys. Chem.*, **81**, 1048—1050.
38. Bannister W. H., Bannister J. V., red., (1980), w: *Biological Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase, Developments in Biochemistry*, T. 11B, Elsevier/North Holland, New York.
39. Farhataziz., Ross A. B., (1977), *Selected Specific Rates of Reactions of Transient from Water in Aqueous Solution. III. Hydroxyl Radical and Perhydroxyl Radical and their Radical Ions.*, NSRDS-NBS, US Government Office Washington, DC.
40. Barber J., (1980), *Biochem. Biophys. Acta*, **594**, 253—308.
41. Mead J. F., (1976), w: *Free Radicals in Biology* (red. Pryor W. A.), str. 51—67, Academic Press, New York.
42. Tyler D. D., (1975), *FEBS Lett.*, **51**, 180—183.
43. Halliwell B., (1978), *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, **33**, 1—54.
44. Hildebrandt A. G., Roots I., (1975), *Arch. Biochem.*, **171**, 385—397.
45. Oshino N., Chance B., Sies H., Buchner T., (1973), *Arch. Biochem.*, **154**, 117—131.
46. Chance B., Sies H., Boveris A., (1979), *Physiol. Rev.*, **59**, 527—605.
47. Jones D. P., Thor H., Andersson B., Orrenius S., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6031—6037.
48. Sies H., Bartoli G. M., Burk R. F., Waydhas C., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **89**, 113—118.
49. Sawyer D. T., (1981), *Acc. Chem. Res.*, **14**, 393—400.
50. Walling C., (1982), w: *Oxidases and Related Redox Systems* (red. King T. E., Mason H. S., Morrison H. S.), str. 85—97, Pergamon Press, Oxford.
51. Schramm V. L., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 369—371.

52. Archibald F.S., Fridovich I., (1981), *J. Bacteriol.*, **146**, 928—936.
53. Czapski G., Aronovitch J., Godinger D., Samuni A., Chevion M., w *The Oxygen Radicals in Chemistry and Biology* (red. Bors W., Saran M., Tait D.), str. 225—229, Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York.
54. Anbar M., Neta P., (1967), *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **18**, 495—523.
55. Czapski G., (1984), w: *Methods in Enzymology*, red. Packer L., str. 209—215, T. 105, Academic Press, Inc. Orlando, Florida.
56. Baker M.S., Gebicki J.M., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**, 258—264.
57. Gutteridge J.M.C., Rowley D.A., Halliwell B., (1982), *Biochem. J.*, **206**, 605—609.
58. Baker M.S., Gebicki J.M., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 581—588.
59. Sutton H.C., (1985), *J. Free Radical Biol. Med.*, **1**, 195—202.
60. Helple J.M., Taylor D.L., (1982), w *Intracellular pH: It's measurement, regulation and utilisation in cellular functions* (red. Nuccitelli R., Deamer D.W.), str. 44—54, Alan R. Liss, New York.
61. Jensen M.S., Bainton D.F., (1973), *J. Cell. Biol.*, **56**, 379—388.
62. Renswoude J.V., Bridges K.R., Harford J.B., Klausner R.D., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6186—6190.
63. Jagendorf A.F., Uribe E., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 170—177.
64. Davies J.T., Rideal E.K., (1963), *Interfacial Phenomena*, Academic Press, New York.
65. Brawn K., Fridovich I., (1980), *Fed. Proc.*, **31**, 1945—1966.
66. Brawn K., Fridovich I., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 414—419.
67. Moody C.S., Hassan H.M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2855—2859.
68. Land E.J., Swallow A.J., (1968), *Biochem. Biophys. Acta*, **162**, 327—337.
69. Inoune H., Nagano T., Hirobe M., (1984), *Tetrahedron Lett.*, **25**, 317—320.
70. Oberley L.W., Buettner G.R., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 1141.
71. Vanella A., Geremia E., Pinturo R., Patane E., Scarvaglieri E., Cappellani A., Garotto A., Bianchi A., Zanghi M., (1983), *Pharm. Res. Commun.*, **15**, 641—646.
72. Konat G.W., Wiggins R.C., (1985), *J. Neurochem.*, **45**, 1113—1118.
73. Cammer W., Bieler L.Z., Norton W.T., (1978), *Biochem. J.*, **169**, 567—575.
74. Itakura M., Holmes E.W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 333—338.
75. Pallet K.E., Dodge A.D., (1979), *Z. Naturforsch.*, **34C**, 1058—1061.
76. Rawls H.R., Van Santen P.J., (1970), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **171**, 135—137.
77. Fridovich I., Porter N.A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 260—265.
78. Fong K.L., McCay P.B., Poyer J.L., Keele B.B., Misra H.P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792—7797.
79. Thomas M.J., Mehl K.S., Pryor W.A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8343—8347.
80. Michelson A.M., McCord J.M., Fridovich I., (1977), *Superoxide and Superoxide Dismutases*, Academic Press, London.
81. Halliwell B., (1978), *FEBS Lett.*, **96**, 238—242.
82. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1981), *FEBS Lett.*, **128**, 347—352.
83. Wills E.D., (1966), *Biochem. J.*, **99**, 667—676.
84. Thien M., Bucher J.R., Aust S.D., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 279—285.
85. Searle A.J.F., Willson R.L., (1983), *Biochem. J.*, **212**, 549—554.
86. Aust S.D., Svingen B.A., (1982), w *Free Radicals in Biology* (red. Pryor W.A.), str. 1—28, Academic Press, New York.
87. Gutteridge J.M.C., (1982), *FEBS Lett.*, **150**, 454—458.
88. Rawley D.A., Halliwell B., (1982), *FEBS Lett.*, **138**, 33—36.
89. O'Brien P.J., (1969), *Can. J. Biochem.*, **47**, 485—492.
90. Kaschnitz P.M., Hatefi Y., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 292—304.
91. Gutteridge J.M.C., Paterson S.K., Segal A.W., Halliwell B., (1981), *Biochem. J.*, **199**, 259—261.

92. Gutteridge J.M.C., Halliwell B., Treffry A., Harrison P.M., Blake D., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 557—560.
93. Wills E.D., (1969), *Biochem. J.*, **113**, 325—332.
94. Gutteridge J.M.C., Richmond R., Halliwell B., (1979), *Biochem. J.*, **184**, 469—472.
95. Gutteridge J.M.C., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 379—386.
96. Sree Kumar K., Rowse C., Hochstein P., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 587—592.
97. Ferrali M., Fulceri R., Bencdetti A., Comporti M., (1980), *Res. Commun., Chem. Pathol. Pharmacol.*, **30**, 99—112.
98. Dianzani M.U., (1982), w *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer* (red. McBrien D.C.H., Slater T.F.), str. 129—151, Academic Press, London.
99. Samuelsson B., Paoletti R.-red., (1982), *Adv. Prostaglandin Tromboxane Leukotriene Res.*, **9**, 1—365.
100. Hamnerstrom S., (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 355—377.
101. Doroshov J.H., Hochstein P., (1982), w *Pathology of Oxygen* (red. Autor A.P.), str. 245—259, Academic Press, New York.
102. Davies K.J.A., Doroshov J.H., Hochstein P., (1983), *FEBS Lett.*, **153**, 2935—2939.
103. Zetterberg G., Persson T., (1970), *Bull. Chim. Farm.*, **109**, 728—732.
104. Smith L.L., Rose M.S., Wyatt I., (1979), w *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*, str. 321—341, CIBA Foundation Series 65, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
105. Lown J.W., Joshua A.V., Chen H.H., (1982), w *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer* (red. McBrien D.C.H., Slater T.F.), str. 305—328, Academic Press, New York.
106. Weidel H., Russo M., (1982), *Mh. Chem.*, **3**, 850—855.
107. Calderbank A., (1968), *Adv. Pest. Control. Res.*, **8**, 127—235.
108. Dodge A.D., (1971), *Endeavour*, **30**, 130—135.
109. Dodge A.D., (1975), *Sci. Prog.*, **62**, 447—466.
110. Law M.V., Charles S.A., Halliwell B., (1983), *Biochem. J.*, **210**, 899—903.
111. Ridley S.M., (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 461—468.
112. Dodge A.D., (1985), w *Biochemical Society Transaction, 597th Meeting, London, t. 10*, str. 73—75.
113. Sharp C.W.M., Ottolenghi A., Posner H.S., (1972), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **22**, 241—251.
114. Litchfield M.H., Daniel J.W., Longshaw S., (1973), *Toxicology*, **1**, 155—163.
115. Ilett K.F., Stripp B., Menard R.H., Reid N.D., Gillette J.R., (1974), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **28**, 216—226.
116. Rose M.S., Lock E.A., Smith L.L., Wyatt I., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 419—423.
117. Hassan H.M., Moody C.S., (1982), *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **60**, 1367—1373.
118. Rose M.S., Smith L.L., Wyatt I., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1763—1767.
119. Forman H.J., Aldrich T.K., Posner M.A., Fisher A.B., (1982), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **221**, 428—433.
120. Engelbrecht F.M., Rossouw D.J., Nienaber M.W.P., (1981), *Med. J.*, **59**, 953—956.
121. Fisher H.K., Clements J.A., Tierney D.F., Wright R., (1975), *Am. J. Physiol.*, **228**, 1217—1223.
122. Forman H.J., Nelson J., Fisher A.B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9879—9883.
123. McDonagh B.J., Martin J., (1970), *Arch. Dis. Childh.*, **45**, 425—427.
124. Malone J.D.G., Carmody M., Keogh B., O'Dwyer W.F., (1971), *J. Ir. Med. Assoc.*, **64**, 59—68.
125. Hassan H.M., Fridovich I., (1982), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8143—8148.
126. Kao S.M., Hassan H.M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10478—10481.
127. Biliński T., Litwińska J., Błaszczński M., (1985), *Acta Microbiol. Polon.*, **34**, 15—17.

128. Błaszczyński M., Litwińska J., Zaborowska D., Biliński T., (1985), *Acta Microbiol. Polon.*, **34**, 243—254.
129. Gershman R., Gilbert D. L., Nye S. W., Dwyer P., Fenn W. O., (1954), *Science*, **119**, 623—626.
130. Gilbert D. L., (red., (1981), *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach*, Springer Verlag, New York.
131. Brown J. C., (1978), *Plant Cell. Envir.*, **1**, 249—257.
132. Rosen G. M., Barber M. J., Rauckman E. J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2225—2228.
133. Girotti A. W., Thomas J. P., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 1744—1752.
134. Kon S. H., (1978), *Med. Hypoth.*, **4**, 445—471.
135. Crichton R. R., (1979), w *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*, CIBA Foundation Symposium, t. 65, str. 57—76, Elsevier, Amsterdam.
136. Fridovich I., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1—11.

122. Baccanini, G. (1967). *Parasitologia*, 1, 1-10.

123. Baccanini, G. (1968). *Parasitologia*, 2, 1-10.

124. Baccanini, G. (1969). *Parasitologia*, 3, 1-10.

125. Baccanini, G. (1970). *Parasitologia*, 4, 1-10.

126. Baccanini, G. (1971). *Parasitologia*, 5, 1-10.

127. Baccanini, G. (1972). *Parasitologia*, 6, 1-10.

128. Baccanini, G. (1973). *Parasitologia*, 7, 1-10.

129. Baccanini, G. (1974). *Parasitologia*, 8, 1-10.

130. Baccanini, G. (1975). *Parasitologia*, 9, 1-10.

131. Baccanini, G. (1976). *Parasitologia*, 10, 1-10.

132. Baccanini, G. (1977). *Parasitologia*, 11, 1-10.

133. Baccanini, G. (1978). *Parasitologia*, 12, 1-10.

134. Baccanini, G. (1979). *Parasitologia*, 13, 1-10.

135. Baccanini, G. (1980). *Parasitologia*, 14, 1-10.

136. Baccanini, G. (1981). *Parasitologia*, 15, 1-10.

137. Baccanini, G. (1982). *Parasitologia*, 16, 1-10.

138. Baccanini, G. (1983). *Parasitologia*, 17, 1-10.

139. Baccanini, G. (1984). *Parasitologia*, 18, 1-10.

140. Baccanini, G. (1985). *Parasitologia*, 19, 1-10.

141. Baccanini, G. (1986). *Parasitologia*, 20, 1-10.

142. Baccanini, G. (1987). *Parasitologia*, 21, 1-10.

143. Baccanini, G. (1988). *Parasitologia*, 22, 1-10.

144. Baccanini, G. (1989). *Parasitologia*, 23, 1-10.

145. Baccanini, G. (1990). *Parasitologia*, 24, 1-10.

146. Baccanini, G. (1991). *Parasitologia*, 25, 1-10.

147. Baccanini, G. (1992). *Parasitologia*, 26, 1-10.

148. Baccanini, G. (1993). *Parasitologia*, 27, 1-10.

149. Baccanini, G. (1994). *Parasitologia*, 28, 1-10.

150. Baccanini, G. (1995). *Parasitologia*, 29, 1-10.

151. Baccanini, G. (1996). *Parasitologia*, 30, 1-10.

152. Baccanini, G. (1997). *Parasitologia*, 31, 1-10.

153. Baccanini, G. (1998). *Parasitologia*, 32, 1-10.

154. Baccanini, G. (1999). *Parasitologia*, 33, 1-10.

155. Baccanini, G. (2000). *Parasitologia*, 34, 1-10.

156. Baccanini, G. (2001). *Parasitologia*, 35, 1-10.

157. Baccanini, G. (2002). *Parasitologia*, 36, 1-10.

158. Baccanini, G. (2003). *Parasitologia*, 37, 1-10.

159. Baccanini, G. (2004). *Parasitologia*, 38, 1-10.

160. Baccanini, G. (2005). *Parasitologia*, 39, 1-10.

161. Baccanini, G. (2006). *Parasitologia*, 40, 1-10.

162. Baccanini, G. (2007). *Parasitologia*, 41, 1-10.

163. Baccanini, G. (2008). *Parasitologia*, 42, 1-10.

164. Baccanini, G. (2009). *Parasitologia*, 43, 1-10.

165. Baccanini, G. (2010). *Parasitologia*, 44, 1-10.

166. Baccanini, G. (2011). *Parasitologia*, 45, 1-10.

167. Baccanini, G. (2012). *Parasitologia*, 46, 1-10.

168. Baccanini, G. (2013). *Parasitologia*, 47, 1-10.

169. Baccanini, G. (2014). *Parasitologia*, 48, 1-10.

170. Baccanini, G. (2015). *Parasitologia*, 49, 1-10.

171. Baccanini, G. (2016). *Parasitologia*, 50, 1-10.

172. Baccanini, G. (2017). *Parasitologia*, 51, 1-10.

173. Baccanini, G. (2018). *Parasitologia*, 52, 1-10.

174. Baccanini, G. (2019). *Parasitologia*, 53, 1-10.

175. Baccanini, G. (2020). *Parasitologia*, 54, 1-10.

176. Baccanini, G. (2021). *Parasitologia*, 55, 1-10.

177. Baccanini, G. (2022). *Parasitologia*, 56, 1-10.

178. Baccanini, G. (2023). *Parasitologia*, 57, 1-10.

179. Baccanini, G. (2024). *Parasitologia*, 58, 1-10.

180. Baccanini, G. (2025). *Parasitologia*, 59, 1-10.

ADAM EDMUND LICZMAŃSKI*

Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne

Oxygen toxicity. II. Defence mechanisms

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Związki wygaszające wzbudzone cząsteczki
- III. Mechanizmy nieenzymatyczne
 - III-1. Antyutleniacze
 - III-1.1. Tokoferole i tokoferylchinony
 - III-1.2. Glutation
 - III-1.3. Kwas askorbinowy
 - III-1.4. Inne antyutleniacze
 - III-2. Zmiatacze wolnych rodników
 - III-3. Jony metali grup przejściowych
 - III-4. Sekwestr metali
 - III-5. Metalotioneiny
- IV. Mechanizmy enzymatyczne
 - IV-1. Dysmutazy ponadtlenkowe
 - IV-2. Katalazy
 - IV-3. Peroksydazy
 - IV-4. Reduktaza glutationowa
- V. Białka szoku termicznego
- VI. Podsumowanie

Contents

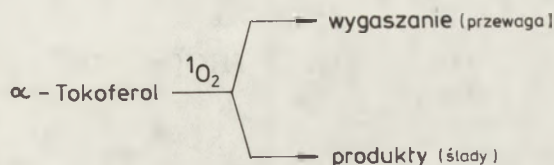
- I. Introduction
- II. Compounds quenching excited molecules
- III. Nonezymatic mechanisms
 - III-1. Antioxidants
 - III-1.1. Tocopherols and tocopherylochinones
 - III-1.2. Glutathion
 - III-1.3. Ascorbic acid
 - III-1.4. Other antioxidants
 - III-2. Scavengers of free radicals
 - III-3. Transition metal ions
 - III-4. Sequestration of metals
 - III-5. Metalothioneins

* Mgr, Akademia Rolnicza w Lublinie Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu, ul. H. Sawickiej 102, 22-400 Zamość



Schemat 2. Mechanizm wygaszania wzbudzonych cząsteczek przez związki zasobne w elektrony. (Q — wygaszacz, ${}^1\text{O}_2$ — wzbudzony tlen singletowy, ${}^3\text{O}_2$ — tlen w tripletowym stanie podstawowym

elektronu (Schemat 2) [1]. Fenole wygaszają także ${}^1\Delta\text{gO}_2$. Witamina E (α -tokoferol), wygasza wzbudzone cząsteczki, zatrzymuje łańcuch reakcji wolnorodnikowych [8, 9], a ponadto jest efektywnym antyutleniaczem $\text{O}_2^{\dot{-}}$ [10, 11]. Na schemacie 3 przedstawiono możliwe sposoby oddziaływania α -tokoferolu z tlenem singletowym.



Schemat 3. Oddziaływania α -tokoferolu z tlenem singletowym

III. Mechanizmy nieenzymatyczne

W komórkach i płynach organicznych znajdują się chemiczne związki organiczne i nieorganiczne, które w reakcjach nieenzymatycznych mogą detoksykować wolne rodniki. Biorąc pod uwagę sposób funkcjonowania, można wśród nich wyróżnić: antyutleniacze, zmiatacze wolnych rodników, kompleksy jonów metali grup przejściowych i wolne jony, które katalizują reakcję dysmutacji rodników.

III-1. Antyutleniacze

Naturalne substancje redukujące $\text{O}_2^{\dot{-}}$ do nadtlenu wodoru, który następnie jest rozkładany między innymi przez katalizy i peroksydazy, nazwano antyutleniaczami. Do grupy antyutleniaczy należą: tokoferole, glutation, kwas askorbinowy.

III-1.1. Tokoferole i tokoferylochinony

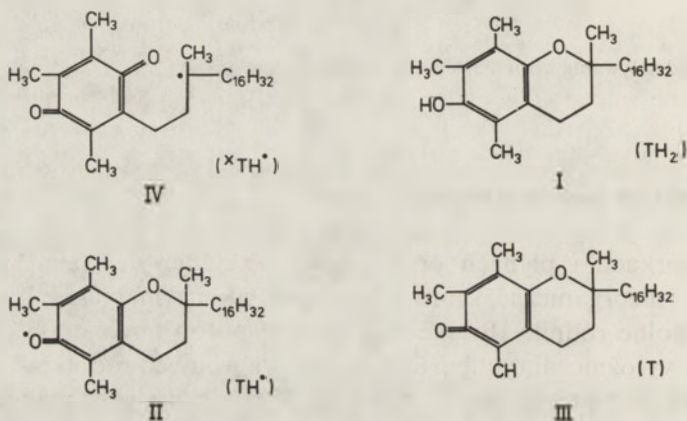
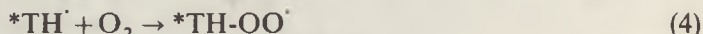
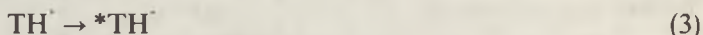
W komórkach występuje wiele tokoferoli, które różnią się długością łańcucha izoprenowego. Związki te występują głównie w błonach biologicznych [10].

Tokoferole reagując z wolnymi rodnikami zabezpieczają lipidy przed utlenianiem [9, 22—14]. Tokoferol redukując rodniki może być utleniany w dwóch różnych ciągach reakcji, z których tylko jeden ma charakter antyutlenia-czowy [15]. Ciąg reakcji o charakterze antyutlenia-czowym może funkcjonować tylko wtedy, gdy początkowe stężenia nadtlenuków lipidowych w błonach są

wysokie. Jeśli pierwsza reakcja przebiega z rodnikiem ROO^\cdot , to od tokoferolu (TH_2) odrywany jest fenolowy atom wodoru (Reakcja 1). Utworzony rodnik TH^\cdot może dalej reagować z następnym rodnikiem ROO^\cdot (Reakcja 2).



Przy niskich stężeniach nadtlenków lipidowych w błonach, powstały uprzednio rodnik TH^\cdot może reagować w odmienny sposób (Reakcje 3, 4, 5), nie wykazując właściwości antyutleniacza [15].



Wzory I—IV. Wzory strukturalne reagującego tokoferolu

Rodnik tokoferylowy wytworzony w reakcjach antyutleniaczowych (Reakcje 1, 2) może być ponownie redukowany do α -tokoferolu przez inny antyutleniacz — kwas askorbinowy. Cząsteczka kwasu askorbinowego reaguje z rodnikiem tokoferylowym przy powierzchni błony. Uwarunkowane jest to lokalizacją rodnika w błonie i polarnym charakterem cząsteczki kwasu askorbinowego. Reakcję redukcji rodnika tokoferylowego katalizuje związana z błonami reduktaza [16, 17].

α -tokoferol może działać również jako wychwytywacz rodników ponadtlenkowych [10, 11]. Pierwotny produkt reakcji tokoferolu O_2^\cdot jest ponownie redukowany przez kwas askorbinowy do α -tokoferolu [10].

III-1.2. Glutation

Komórki o metabolizmie tlenowym zawierają glutation w stężeniach mili-molarnych. Grupa -SH glutationu jest znacznie łatwiej dostępna dla O_2 niż

grupy tiolowe enzymów. Przypuszcza się więc, że związek ten może zabezpieczać aktywne biologicznie białka. GSH również reaktywuje enzymy zainaktywowane przez utlenienie ich grup tiolowych. Utlenianie oczyszczonego GSH i grup tiolowych enzymów przez O_2 jest bardzo powolne *in vitro*, ale śladowe ilości metali grup przejściowych katalizują ten proces [18, 19].

GSH współuczestniczy w procesie usuwania nadtlenu wodoru i wodoronadtlenków lipidowych w komórkach tlenowców, jest również kofaktorem szeregu enzymów, takich jak: glioksyłaza, izomeraza endonadtlenków prostaglandynowych, transferaza γ -glutamyłowa. Ponadto uczestniczy w degradacji herbicydów i pestycydów [16], hamuje indukowane przez $O_2^{\cdot -}$ samoutlenianie adrenaliny i oksydację dianizydyny [20], kontroluje poziom wewnątrzkomórkowego stężenia rodnika ponadtlenkowego [16].

W chloroplastach roślin wyższych funkcjonuje cykl Foyera-Halliweilla, w którym usuwany jest nadtlenek wodoru wytwarzany podczas fotosyntetycznego transportu elektronów [21]. W cyklu tym askorbinian redukuje H_2O_2 , a powstający dehydroaskorbinian redukowany jest nieenzymatycznie przez GSH. Regenerowanie zredukowanego glutationu następuje kosztem NADPH przy udziale reduktazy glutationowej.

Analiza rozmieszczenia i zawartości GSH w komórkach zwierzęcych [22—27], wykazała, że największe ilości glutationu gromadzone są w mitochondriach [26]. Przypuszczalnie jest to sposób zabezpieczania przed wolnorodnikowymi formami tlenu generowanymi w dużych ilościach w tych organelach [26, 27].

III-1.3. Kwas askorbinowy

Kwas askorbinowy zapewnia utrzymanie odpowiedniego potencjału red-oks w komórce. Związek ten może stymulować powstawanie rodników hydroksylowych z H_2O_2 w obecności zredukowanych jonów metali [28]. Mieszanina kwasu askorbinowego, nadtlenu wodoru i soli żelaza może zainicjować peroksydację lipidów [29, 30], a w mieszaninie H_2O_2 i askorbinianu powstają rodniki $^{\cdot}OH$ [31]. Kwas askorbinowy w niskich stężeniach działa jak prooksydant, w wysokich natomiast jak antyutleniacz [32].

III-1.4. Inne antyutleniacze

Do antyutleniaczy zaliczane są również substancje, którym w literaturze anglo-amerykańskiej nadano nazwę „sacrificial antioxidants”. Reprezentują je śluzu tchawicowo-oskrzelowe i żołądkowo-jelitowe [33]. Wykazują one olbrzymią aktywność w wychwytywaniu rodników hydroksylowych oraz innych reaktywnych związków wytwarzanych w układzie pokarmowym i oddechowym (szczególnie podczas palenia tytoniu), a także zawartych we wdychanym, skażonym powietrzu [33].

III-2. Zmiatacze wolnych rodników

Niskocząsteczkowe związki takie jak adrenalina, bilirubina, biliwerdyna i inne [16, 34—36], reagując z rodnikami ponadtlennymi nie dopuszczają do rozprzestrzeniania się reakcji wolnorodnikowych, a w konsekwencji do uszkodzenia komórek.

Kwas moczowy [37] hamuje peroksydację lipidów i usuwa niespecyficznie rodniki, a tiomocznik jest specyficznym zmiataczem rodników hydroksylowych [38]. Takie związki chemiczne, jak: mrówczan sodowy, etanol, butanol, glukoza, mannitol, Tris [39] również wychwytyują rodniki hydroksylowe. Jednakże szereg zmiataczy uznawanych za specyficzne wobec $\cdot\text{OH}$, nie wykazuje tej właściwości. Np. tiomocznik reaguje z nadtlenkiem wodoru i rodnikami oksyalkoholowymi [40, 41], a także chelatuje jony metali niezbędne do wytwarzania rodników hydroksylowych. Etanol reaguje z rodnikami oksyalkoholowymi [40], a mannitol tworzy stabilne kompleksy z nadtlenkiem wodoru [39].

Związki kompleksujące jony metali mogą również zabezpieczać komórki przed możliwością wytwarzania wolnych rodników. Kwas dietyleno-triamino-pentaoctowy hamuje reakcję H a b e r a - W e i s s a [42], ponieważ kompleks Fe(III)-DATAPAC jest redukowany w nieznacznym stopniu przez $\text{O}_2^{\cdot-}$ [43]. Jednakże układy redukujące np. rodnik parakwatowy [44], semichinon adriamycyny [45], oraz reduktaza NADPH-cyt P-450 [46], mogą redukować Fe(III)-DETAPAC i w rezultacie inicjować powstawanie rodnika $\cdot\text{OH}$ w obecności nadtlenku wodoru.

Kompleksy jonów żelaza z siarczanem betafenantroliny [47] i desferal [48] ograniczają produkcję rodników hydroksylowych. Ponadto desferal *in vitro* hamuje peroksydację lipidów oraz reakcje powstawania rodników hydroksylowych katalizowane przez sole żelaza, a także efektywnie zmiata rodniki hydroksylowe i ponadtlennowe [48, 30, 39].

III-3. Jony metali grup przejściowych

Jony metali grup przejściowych wchodzące w skład centrów aktywnych dysmutaz ponadtlennych, w postaci wolnej i w połączeniu z niskocząsteczkowymi związkami chelatującymi, wykazują właściwości katalizowania reakcji dysmutacji rodników ponadtlennych. Jony te w czasie katalizy są redukowane i utleniane [49]. Spośród wielu przetestowanych małowcząsteczkowych kompleksów miedzi jedynie $[\text{Cu}-(\text{His})_2\text{H}]^{3+}$ [50], wykazywał aktywność dysmutazy ponadtlennowej. Kompleksy miedziowe, w których wszystkie pozycje koordynacyjne wysyczone są przez związki chelatujące (np. przez EDTA), nie katalizują reakcji dysmutacji [51]. Jony miedzi zasocjowane z cząsteczkami białek, np. z albuminą surowiczą, wykazują aktywność dysmutazy ponadtlennowej [52].

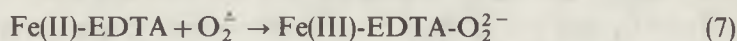
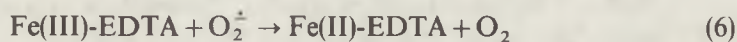
Sole miedzi dodane do pożywki podwyższają poziom aktywności SOD w hodowanych komórkach drożdży [53], przyspieszają wzrost mutantów niesyntetyzujących CuZnSOD, umożliwiają też wzrost mutantów bezdysmutazowych

w pożywce zawierającej parakwat, mimo ich wrażliwości na ten herbicyd generujący rodniki ponadtlenkowe [54, 55].

Mniej wiemy o właściwościach kompleksów manganu. Aktywność dysmutazową wykazują jedynie jony manganu i kompleks manganu-chinolinowy [56-58]. Katalitycznych właściwości nie wykazuje natomiast Mn(II) zasocjowany z EDTA [59].

Jony manganu zabezpieczają przed toksycznością tlenu [57], przyspieszają wzrost drożdżowych mutantów bezdysmutazowych [54], zwiększają odporność spor na ciepło i promieniowanie jonizujące [60, 61], wygaszają tlen singletowy [59] zmiatają wolne rodniki tlenowe [62—67], hamują peroksydację lipidów w błonach [62, 63].

Kompleksy jonów żelaza i EDTA katalizują dysmutację rodników ponadtlenkowych [49]. W pierwszym etapie $O_2^{\cdot -}$ redukuje Fe(III)-EDTA (Reakcja 6) [68]. Następna cząsteczka rodnika ponadtlenkowego ponownie utlenia powstały Fe(II)-EDTA (Reakcja 7) [69] do Fe(III)-EDTA.



III-4. Sekwestr metali

Sekwestr metali polega na przechowywaniu, w formie niedostępnej dla reakcji Haber-Weissa, niewykorzystanych przez organizm, jonów metali. Sekwestr jest więc jednym z wielu sposobów zabezpieczania organizmu przed możliwością wytwarzania rodników hydroksylowych i innych. Najczęściej nadmiary jonów metali gromadzone są w cząsteczkach wyspecjalizowanych białek magazynujących. Transport jonów metali z miejsc ich składowania do miejsc wykorzystania odbywa się również z udziałem specjalnych białek transportujących. Jony żelaza i miedzi stanowią szczególne zagrożenie dla organizmów, ponieważ mogą one w obecności H_2O_2 generować wolne rodniki.

Jony żelaza, w tkankach zwierzęcych, wiązane są przez transferynę i ferytynę. Transferyna jest białkiem transportującym, a ferytyna magazynującym żelazo [70—73]. Białka te znaleziono w wątrobie, śledzionie, szpiku kostnym, a niektóre ferytyny wykryto w osoczu krwi [70]. Transferyna jest glikoproteina zawierająca miejsca wiążące Fe(III). Białko podobne do transferyny — laktoferyna, występuje w wielu płynach organicznych i mleku, a także jest wytwarzana przez komórki fagocytyczne [74].

Okolo 95% jonów miedzi występujących w osoczu krwi zgromadzone jest w ceruloplazminie. Pozostała część Cu(II) tworzy kompleksy z albuminą i aminokwasami osocza krwi [75]. Ceruloplazmina jest białkiem magazynującym. Postuluje się, że komórki muszą wydalić, a następnie rozłożyć cząsteczkę ceruloplazminy, aby pozyskać zmagazynowane w niej jony miedzi [76]. Ceruloplazmina może katalizować oksydację poliamin, polifenoli, a uwalniany w tych procesach tlen jest redukowany do H_2O . Białko te może utleniać Fe(II) do Fe(III) [77], hamować reakcję Fentona i zmiatać wolne rodniki [76].

Jony metali zwykle przemieszczane są pomiędzy miejscem ich magazynowania a miejscem ich wykorzystania w komórce. Przypuszcza się zatem, że sekwestr metali nie jest procesem w pełni efektywnym, tym bardziej, że estry fosforanowe, jak np. 2, 3-difosfoglicerynian, ATP, GTP zdolne są do usuwania jonów żelaza z kompleksów białkowych [71].

III-5. Metalotioneiny

Metalotioneiny, to niskocząsteczkowe białka bogate w metale i grupy sulfhydrylowe. Metalotioneiny uczestniczą w metabolizmie śladowych ilości metali [78]. Metalotioneiny występujące u ssaków, zbudowane są z pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Reszty cysteinowe stanowią około 1/3 wszystkich reszt aminokwasowych tych białek. Za pomocą elektroforezy można wyróżnić dwie formy metalotionein o różnych sekwencjach aminokwasowych, tzw. metalotioneiny 1 i metalotioneiny 2 [79].

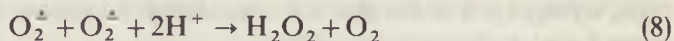
Metalotioneiny uczestniczą w wewnątrzkomórkowym metabolizmie żelaza [80], wiążą jony miedzi, cynku i kadmu [81–83] jak i zabezpieczają one komórki przed szkodliwym promieniowaniem, dzięki dużej zawartości grup sulfhydrylowych w białku [84]. Metalotioneiny są wydajnymi zmiataczami rodników hydroksylowych [85] i uzupełniają liczbę białek uczestniczących w sekestrze metali (np. CuMT).

Białka wiążące jony metali wykryto w innych organizmach jak np. bakterie, glony, drożdże, owady [86]. Białka te różnią się masami cząsteczkowymi, ilością grup sulfhydrylowych i rodzajem wiązanych jonów metali [86].

IV. Mechanizmy enzymatyczne

IV-1. Dysmutazy ponadtlenkowe

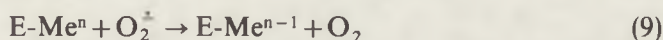
Dysmutazy ponadtlenkowe zaliczamy do klasy oksydoreduktaz [EC. 1. 15. 1. 1] (Nazwa systematyczna-oksydoreduktaza ponadtlenek:ponadtlenek). Enzymy te będące metaloproteinami zawierają w swych centrach aktywnych jony metali (Fe, Mn, Cu), które biorą udział w reakcjach dysmutacji rodników ponadtlenkowych (Reakcja 8).



Wyróżnia się więc FeSOD, MnSOD i CuZnSOD*. Mechanizm dysmutacji rodników ponadtlenkowych katalizowanej przez SOD polega na reakcjach redukcji i utleniania jonów metali wchodzących w skład centrów aktywnych tych enzymów. Przedstawiono to w reakcjach 9 i 10. W pierwszym etapie katalizy

* Wcześniejsze prace przeglądowe [87, 88] opublikowane w Postęпах Biochemii przedstawiają szczegółowo zagadnienia filogenezy, subkomórkowego rozmieszczenia tych enzymów i ich charakterystyki fizyko-chemiczne.

(Reakcja 9) jon metalu jest redukowany przez rodnik ponadtlenkowy. Jednocześnie uwalniana jest cząsteczka O_2 . Następny rodnik ponadtlenkowy utlenia zredukowany jon metalu w obecności protonów i powstaje H_2O_2 (Reakcja 10). W reakcjach tych symbolem E oznaczono enzym (SOD), natomiast Me oznacza jon metalu centrum aktywnego.

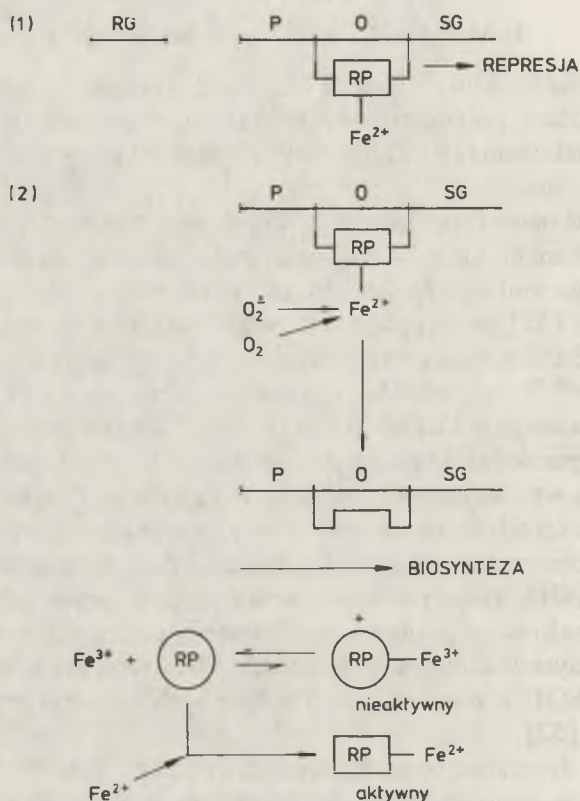


Rodnik ponadtlenkowy, substrat SOD, jest wytwarzany tylko w obecności tlenu, a dysmutazy ponadtlenkowe chronią organizmy przed jego cytotoksycznym działaniem [89]. Zanik aktywności SOD jest przyczyną wrażliwości organizmów na tlen.

W celu wyjaśnienia fizjologicznej funkcji dysmutazy ponadtlenkowej podjęto próby wyizolowania mutantów nie syntetyzujących tych enzymów. Otrzymano termowrażliwego mutanta *Escherichia coli* nie syntetyzującego SOD w warunkach tlenowych [52]. Następnie wyizolowano wrażliwe na tlen mutanty *E.coli* lini K 12, a wśród nich szczepy o podwyższonej aktywności katalazy, peroksydazy i MnSOD [90]. W naszym laboratorium po raz pierwszy w świecie otrzymano mutanty niezawierające CuZnSOD [55]. Wyizolowano je na podstawie nadwrażliwości na parakwat. Mutanty pozbawione SOD charakteryzują się wysoką wrażliwością na wzrastające pO_2 , stężenie PQ i światło. Zwiększanie produkcyjności $O_2^{\cdot-}$ powoduje uszkodzenia komórek drożdży nie zawierających SOD [55, 91]. Nieco później otrzymano mutanty *E.coli* z delecjami powodującymi defekty w MnSOD i FeSOD, które nie rosną w warunkach tlenowych w minimalnej pożywce i są wrażliwe na parakwat w pożywce bogatej [92]. Wyniki badań nad mutantami bezdysmutazowymi potwierdziły, kwestionowaną przez innych [93], kluczową rolę SOD w mechanizmach ochronnych komórki przed toksycznym działaniem O_2 [52].

Biosynteza dysmutaz ponadtlenkowych podlega rygorystycznej kontroli. Wysokie stężenia tlenu przyspieszają biosyntezę SOD w *E.coli* [94], *Streptococcus faecalis* [95], *Saccharomyces cerevisiae* i w innych organizmach [16]. Induktorem biosyntezy SOD jest produkt redukcji tlenu cząsteczkowego [96]. FeSOD jest wytwarzana na poziomie konstytutywnym nawet w warunkach beztlenowych [97], zatem stanowi stałą ochronę przed toksycznością tlenu. Natomiast MnSOD — enzym indukcyjny, jest intensywnie syntetyzowany w odpowiedzi na czynnik indukujący [98]. Żelazo pełni ważną funkcję w regulacji biosyntezy MnSOD w *E.coli* [99, 100]. W opisanej poniżej hipotezie [101], biosynteza MnSOD jest przedstawiona jako negatywny operon, w którym białko regulatorowe (RP) występuje w dwóch formach: aktywnej i nieaktywnej. Z aktywnym represorem związane jest Fe^{2+} ($RP-Fe^{2+}$) z nieaktywnym Fe^{3+} ($RP-Fe^{3+}$) lub białko represora nie wiąże jonu żelaza (RP). Gdy wzrasta produkcja $O_2^{\cdot-}$ w komórce (intensywny metabolizm tlenowy, procesy redukcji i utleniania, np. PQ), rodnik ponadtlenkowy utlenia Fe^{2+} w białku represorowym. $RP-Fe^{3+}$ jest nieaktywnym represorem, który może ulec konformacyjnym

zmianom i utracić jon metalu. W wyniku tych zmian może nastąpić biosynteza MnSOD. W warunkach beztlenowych nie są wytwarzane $O_2^{\cdot -}$ i inne utleniacze mogące utleniać Fe^{2+} , białko represora zatem jest nieaktywne i biosynteza MnSOD nie następuje [101]. Szereg związków red-oks, działających podobnie jak parakwat, indukuje biosyntezę MnSOD (Schemat 4).

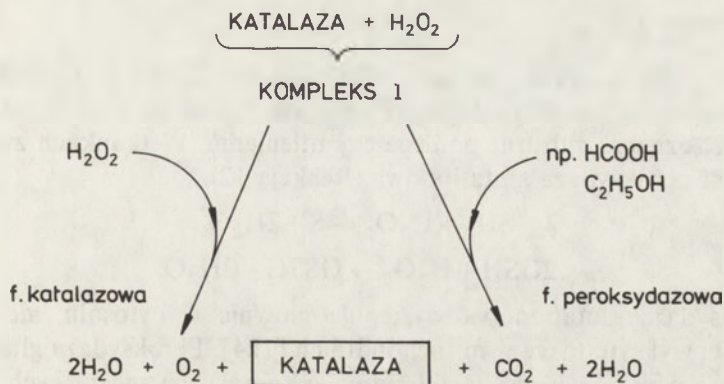


Schemat 4. Mechanizm regulacji biosyntezy MnSOD w *E. coli*. RG — gen regulatorowy, P — promotor, O — operon, SG — gen struktury, RP — represor

IV-2. Katalazy

Katalazy, to enzymy rozkładające wolne nadtlenki wodoru [E.C.1.11.1.6]. Są żelazoporfirynoproteinami zbudowanymi z czterech monomerów. Katalazy wykazują dwie aktywności: katalazową i peroksydazową. W środowisku o wysokim stężeniu H_2O_2 dominuje aktywność katalazowa, natomiast w środowisku o niskim stężeniu nadtlenku wodoru, peroksydazowa (Schemat 5) [21].

Bardzo niską aktywność katalazy lub jej brak wykazano w bakteriach beztlenowych, natomiast wysoką aktywność tego enzymu zaobserwowano w bakteriach tlenowych [102]. Wysoka aktywność katalazy umożliwia przeży-



Schemat 5. Sposoby funkcjonowania katalazy w komórce. W wyniku przyłączenia pierwszej cząsteczki H₂O₂ do centrum aktywnego enzymu, wytwarzany jest tzw. kompleks I

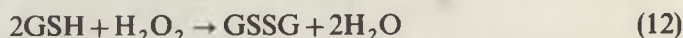
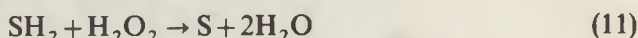
wanie mikroorganizmów tlenowych podczas ekspozycji w H₂O₂ [103, 104]. Względnie beztlenowce, jak *S.cerevisiae* [105] i *E.coli* K-12 his- [106], wykazują wysoki poziom aktywności katalazy podczas wzrostu w warunkach tlenowych. W *E.coli* B i *S.faecalis*, w warunkach beztlenowych i tlenowych, aktywność katalazy nie podlega większym zmianom, podczas gdy obserwuje się różnice w aktywności SOD [107]. Organizmy nie syntetyzujące katalazy, np. *Bacillus popillie* [108], *Anacystis nidulans* [109], wydzielają nadtlenek wodoru do otaczającego je środowiska.

Drożdże *S.cerevisiae*, podobnie jak *E.coli* B, zawierają dwie katalazy: katalazę T (typową) i A (nietypową), które różnią się ciężarem cząsteczkowym. Nie jest dotąd znane znaczenie katalazy A, której zawartość stanowi 30 do 80% całkowitej aktywności katalazowej komórek. Zaobserwowano, że zmianom aktywności katalazy A towarzyszą zmiany aktywności oksydazy acylo-CoA z peroksyosomów komórek drożdży [110]. Katalazy T i A kodowane są przez dwa różne geny jądrowe i mają różne mapy peptydowe. Katalaza T jest enzymem cytoplazmatycznym [111]. Katalaza A natomiast występuje w peroksyosomach [110, 112], ale również wskazuje się na jej obecność w wakuolach [113]. Poziom katalaz w drożdżach zależy od warunków wzrostu komórek, w tym również od obecności tlenu i glukozy [114—118]. Biosynteza hemu również podlega regulacji przez tlen i glukozę, a zatem synteza grupy prostetycznej warunkuje syntezę obu enzymów [116, 119—121]. Katalazy A i T nie występują w dzikich, rosnących w warunkach beztlenowych, komórkach drożdży. Otrzymano mutanty, które syntetyzują w warunkach beztlenowych katalazę T [122, 123]. W warunkach represji glukozowej zawartość katalazy T jest wydatnie obniżana, a aktywność katalazy A jest niewykrywalna.

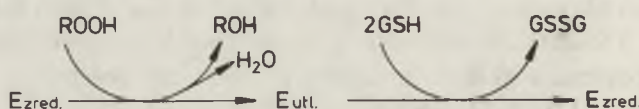
Mutanty bezkatalazowe *S.cerevisiae* nie wykazują nadwrażliwości na wysokie stężenia tlenu, parakwat i naświetlanie. Reagują na stres tlenowy podobnie jak szczep dziki [55].

IV-3. Peroksydazy

W komórkach oprócz katalaz występują peroksydazy, których funkcja polega również na usuwaniu H_2O_2 . Peroksydazy działają według reakcji 11, w której SH_2 oznacza substrat podlegający utlenieniu. W tkankach zwierzęcych obecna jest peroksydaza glutationowa (Reakcja 12).



Peroksydaza glutationowa występuje głównie w cytosolu, ale ślady jej aktywności wykryto także w mitochondriach [124]. Peroksydaza glutationowa kontroluje szybkość peroksydacji lipidów w komórkach zwierzęcych. Znane są dwa rodzaje tego enzymu. Pierwszy stanowi wspomniana peroksydaza glutationowa rozkładająca nadtlenek wodoru w katalizowanych reakcjach. Działa ona również na wodoronadtlenki lipidowe i redukuje je do stabilnych hydroksykwasów [125, 126], działając wg reakcji 13 (Schemat 6).



Schemat 6. Redukcja wodoronadtlenków lipidowych do stabilnych hydroksykwasów, katalizowana przez selenową peroksydazę glutationową

Ten rodzaj enzymu zawiera w swej cząsteczce selen skompleksowany przez cysteinę* [127]. Połowa zawartego w białku selenu może podlegać zmianom red-oks podczas wiązania substratu [128]. Niska zawartość selenu w pożywieniu powoduje zmniejszenie aktywności tego enzymu.

Drugi rodzaj peroksydazy, to enzym nie zawierający selenu. Działa on również na wodoronadtlenki lipidowe, lecz nie rozkłada H_2O_2 . Aktywność peroksydazy glutationowej niezależnej od selenu, katalizowana jest przez inny enzym — transferazę GSH, który powoduje koniugację GSH z „obcymi” związkami.

We wcześniejszych doniesieniach wykluczano obecność peroksydazy glutationowej w komórkach bakteryjnych i roślinnych [129]. Ostatnio wykryto obecność tego enzymu niezależnego od selenu w *Euglena* [130], *Gleocapsa* [131], oraz ekstraktach z hodowanych *in vitro* komórek szpinaku, jawora, kukurydzy i soji [132].

Ważnym ogniwem cyklu F o y e r a - H a l l i w e l l a jest peroksydaza askorbinianowa. Jak wiadomo, H_2O_2 jest inhibitorem karboksylazy RuBP, a zatem usuwanie nadtlenu wodoru ma istotne znaczenie dla wydajności fotosyntezy.

* J. Fronk, Krystalograficzne uszczegółowienie struktury peroksydazy glutationowej, (1984), *Post. Biochem.*, 30, 13—14.

IV-4. Reduktaza glutationowa

Reduktazy to enzymy należące również do klasy oksydoreduktaz i najczęściej współdziałają z peroksydazami, poprzez „regenerowanie” donora protonów, niezbędnego do funkcjonowania peroksydaz. Reduktaza glutationowa uczestniczy w komórkowych procesach detoksykacji tlenu. Enzym ten współdziała z peroksydazą glutationową. GSSG, powstały w wyniku peroksydacji lipidów, jest ponownie przekształcany do GSH w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową (Reakcja 14).



Równowaga reakcji 14 przesunięta jest w kierunku tworzenia GSH [133].

Reduktaza glutationowa występuje, tak jak peroksydaza glutationowa, w cytosolu i mitochondriach [124].

Enzymy uczestniczące w mechanizmach ochronnych przed toksycznym działaniem tlenu (np. dysmutaza, katalaza) podlegają regulacji, a związki utleniające (np. O_2^+ , H_2O_2) indukują ich syntezę.

V. Białka szoku termicznego

W mikroorganizmach, grzybach i komórkach zwierzęcych poddawanych szokowi termicznemu, a także stresowi oksydacyjnemu, następuje gwałtowny wzrost poziomu ufosforylowanych dinukleotydów typu AppppA, AppppG, ApppA i ApppG. Nukleotydy te nazwano alarmonami i przypisano im funkcję cząsteczek regulatorowych [134]. Komórki poddawane szokowi adaptują się do warunków stresowych poprzez zwiększanie syntezy specyficznych enzymów. Enzymy te skutecznie zabezpieczają komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [135]. Do białek szoku termicznego i oksydacyjnego zaliczane są dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy, peroksydazy, reduktaza glutationowa, transferazy glutationowe, specyficzne glikozylazy naprawiające uszkodzenia oksydacyjne DNA [136]. W następstwie stresu oksydacyjnego zaobserwowano u *Salmonella thyphimurium* ponad 30-to krotny wzrost poziomu aktywności peroksydaz i katalazy [136]. W opornych na nadtlenek wodoru mutantach *S. thyphimurium* (mutanty *oxyR*₁) stwierdzono wielokrotnione aktywności katalazy/peroksydazy, MnSOD, reduktazy glutationowej i reduktazy alkilonadtlenków [137]. W drożdżach *S. cerevisiae* katalaza T podlega indukcji pod wpływem szoku termicznego (22 → 37°C) oraz stresu oksydacyjnego (H_2O_2) [138].

W komórkach żywych organizmów wykazano jeszcze jeden mechanizm ochronny przed toksycznym działaniem tlenu i produktów jego redukcji. Dinukleotydy adenylowe, mianowicie uważa się za alarmony dla materiału genetycznego i związanych z nim procesów replikacji i transkrypcji DNA w regionie *oxyR*. Ekspresja tego regionu decyduje o szybkiej odpowiedzi na wywołany stres oksydacyjny lub szok termiczny.

VI. Podsumowanie

W niniejszej pracy mechanizmy ochronne komórek przed toksycznym działaniem tlenu zróżnicowano na nieenzymatyczne i enzymatyczne. W pierwszych uczestniczą niskocząsteczkowe związki zdolne do redukcji reaktywnych form tlenu (tzw. antyutleniacze), wygaszające wzbudzony tlen singletowy oraz wolne i skompleksowane jony metali grup przejściowych. Związki te unicestwiają wolne rodniki, hamują reakcje wolnorodnikowe, wygaszają wzbudzone cząsteczki i dysmutują rodniki ponadtlenkowe.

W mechanizmach enzymatycznych funkcjonują dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy, peroksydazy i pomocnicze reduktazy. Badania prowadzone nad mutantami bezdysmutazowymi i bezkatalazowymi, pozwoliły na ustalenie udziału wspomnianych enzymów w procesach detoksykacji tlenu. Dysmutazy ponadtlenkowe pełnią kluczową funkcję w enzymatycznych mechanizmach ochronnych. Zabezpieczają one komórki przed uszkodzeniami indukowanymi przez $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ i powstawaniem wtórnych rodników. Brak tych enzymów prowadzi do wrażliwości na stres tlenowy [55]. Produkt dysmutacji jest substratem katalaz i peroksydaz, które rozkładają H_2O_2 , zabezpieczając komórki przed reakcją Habera-Weissa i powstawaniem rodników $\cdot OH$. W parze z peroksydazami współdziałają odpowiednie reduktazy, które regenerują utlenione donory wodoru. Ponadto działają nadrzędne mechanizmy regulacyjne, odpowiedzialne za jednoczesne uruchamianie syntezy różnych białek ochronnych, np. MnSOD, katalazy, peroksydazy, reduktazy.

Wiele innych białek uczestniczy w procesach ochronnych komórki. Są to np. białka działające w sekwestrze metali (ferytyna, ceruloplazmina), które nie tylko magazynują wolne jony metali, czyniąc je niedostępnymi dla reakcji Habera-Weissa, lecz również wychwytyują wolne rodniki (ceruloplazmina). Także metalotioneiny biorące udział w procesie detoksykacji metali, wychwytyują rodniki ponadtlenkowe i hydroksylowe.

Pozostaje wiele pytań, na które brak odpowiedzi w tym opracowaniu. Dlaczego tak istotna jest funkcja SOD, a nie katalaz, które usuwają bezpośredni substrat reakcji Habera-Weissa, tym bardziej, że w komórkach jest wiele czynników redukujących? Dlaczego organizmy reagują tak odmiennie na wysokie stężenia nadtlenu wodoru? Niewiele też jest wiadomo na temat efektów toksycznych *in vivo*. Zatem problem toksyczności tlenu pozostaje nadal otwartym zagadnieniem.

Panu doc. dr. hab. T. Bilińskiemu składam serdeczne podziękowania za krytyczne uwagi i pomoc w redagowaniu niniejszej pracy.

Część badań przedstawionych w artykule wykonano w ramach CPBR 3.13.

Artykuł otrzymano 3 marca 1988 r.

Zaakceptowano do druku 20 czerwca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Foote C.S., (1982), w *Pathology of Oxygen* (red. Autor A.P.), str. 21—44, Academic Press, New York.
2. Foote C.S., (1978), w *Singlet Oxygen* (red. Wasserman H.H., Murray R.W.), str. 139, Academic Press, New York.
3. Krinsky N., (1971), w *Carotenoids* (red. Isler O.), str. 669, Birkhaeuser, Basel.
4. Foote C.S., Denny R.W., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6233.
5. Foote C.S., Chank Y.C., (1970), *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 521.
6. Merkel P.B., Kearns D.R., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7244.
7. Smith W.F., Herkstroeter W.G., Eddy K.L., (1975), *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2764.
8. Clough R.L., Yee B.G., Foote C.S., (1979), *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 683.
9. Pryor W.A., (1976), w *Free Radicals in Biology* (red. Pryor W.A.), str. 1—49, t. 1, Academic Press, New York.
10. Nishiki M., Yamada H., Yagi K., (1982) w *Oxygenases and Oxygen Metabolism*, str. 605—610, Academic Press Inc.
11. Yagi K., Yamada H., Nishikimi M., (1978), w *Tocopherol, Oxygen and Biomembranes* (red. deDuve C., Hayaishi O.), str. 1, Elsevier/North Holland, Biomedical Press, Amsterdam.
12. Tappel A.L., *Vitam. Horm.*, **20**, 493—510.
13. Aeses-Jorgensen E., (1962), w *Autooxidation and Antioxidants* (red. Ludenberg W.O.), t. 2, str. 1045—1093.
14. Tappel A.L., (1972), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **203**, 12—38.
15. Hicks M., Gebicki J.M., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 56—63.
16. Halliwell B., (1981), w *Age Pigments* (red. Sohal R.S.), str. 1—62, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
17. Packer J.E., Slater T.F., Willson R.L., (1979), *Nature*, **278**, 737—738.
18. Gilbert D.L., Gershan R., Cohen J., Sherwood W., (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5677—5680.
19. Misra H.P., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2151—2155.
20. McNeil C.J., Banford J.C., Brown D.H., Smith W.E., (1981), *FEBS Lett.*, **133**, 175—177.
21. Halliwell B., (1984), w *Chloroplast Metabolism. The structure and function of chloroplast in green leaf cells*, Clarendon Press, Oxford.
22. Smith I., (1985), *Plant Physiol.*, **79**, 1044—1047.
23. Meredith M.J., Reed D.J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3747—3753.
24. Romero F.J., Soboll S., Sies H., (1984), *Experientia*, **40**, 365—367.
25. Romero F.J., Sies H., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 1110—1121.
26. Schnellmann R.G., Mandel L.J., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**, 1001—1005.
27. Sies H., Cadenas E., (1985), *Phil. Trans. R. Soc. London. B*, **311**, 617—631.
28. Winterbourn C.C., (1979), *Biochem. J.*, **182**, 625—628.
29. Muakkassah-Kelly S.F., Anderson J.W., Shith J.C., Hochstein P., (1983), *J. Neurochem.*, **41**, 1429—1439.
30. Wills E.D., (1969), *Biochem. J.*, **113**, 325—332.
31. Rowley D.A., Halliwell B., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **325**, 279—284.
32. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1985), *Trends Neurosci.*, **8**, 22—26.
33. Cross C.E., Halliwell B., Allen A., (1984), *Lancet*, **1**, 1328—1330.
34. McCord J.M., Fridovich I., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049—6054.
35. Robertson P.Jr., Fridovich I., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **213**, 353—357.
36. Galliani G., Monti D., Speranza G., Manitto P., (1984), *Tetrahedron, Lett.*, **25**, 6037—6040.
37. Ames B.N., Cathacard R., Schwiers E., Hochstein P., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6858—6862.

38. Sadrzadeh S.M.H., Graf E., Panter S.S., Hallway P.E., Eaton J.W., (1985), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14354—14356.
39. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 501—514.
40. Winston G.W., Hervey W., Berl L., Cadebraum A.J., (1983), *Biochem. J.*, **216**, 415—421.
41. Cadebraum A.J., Dicker E., Rubin E., Cohen G., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1187—1191.
42. Buettner G.R., Oberly L.W., Leuthauser S.W.H.C., (1978), *Photochem. Photobiol.*, **28**, 693—695.
43. Butler J., Halliwell B., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 174—178.
44. Sutton H.C., Winterbourn C.C., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 106—115.
45. Winston G.W., Harvey W., Berl L., Cadebraum A.J., (1983), *Biochem. J.*, **216**, 415—421.
46. Morehouse L., Thomas C.E., Aust S.D., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **232**, 366—377.
47. Halliwell B., (1978), *FEBS Lett.*, **96**, 238—242.
48. Gutteridge J.M.C., Richmond R., Halliwell B., (1979), *Biochem. J.*, **184**, 469—472.
49. Bull Ch., McClune G.J., Fee J.A., (1983), *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5290—5300.
50. Weinstein J., Bielski B.H.J., (1980), *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4916—4919.
51. Joester K.E., Jung G., Weber U., Weser U., (1972), *FEBS Lett.* **25**, 25—28.
52. Fridovich I., (1974), *Adv. Enzymol.*, **41**, 35—97.
53. Gregory E.M., Goscin S.A., Fridovich I., (1974), *J. Microbiol.*, **117**, 456—460.
54. Liczmański A., Biliński T., (1987), XXIII Zjazd PTBioch, Białystok, streszczenia, 303—304.
55. Biliński T., Krawiec Z., Liczmański A., Litwińska J., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 533—539.
56. Chen K.-L., McCay P.B., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1412—1418.
57. Archibald F.S., Fridovich I., (1981), *J. Bacteriol.*, **145**, 442—451.
58. Howie J.K., Sawyer P.C., (1978), *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 6698—6700.
59. Stein J., Fackler J.P.Jr., McClune G.J., Fee J.A., Chan L.T. (1979), *Inorg. Chem.*, **18**, 3511—3519.
60. Fong K.L., McCay P.B., Poyer J.L., Keele B.B., Misra H.P., (1978), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792—7797.
61. Fong K.L., McCay P.B., Poyer J.L., Misra H.P., Keele B.B., (1976), *Chem. Biol. Interact.*, **15**, 77—89.
62. Aoki H., Slepecky R., (1973), *Spore Res.*, 93—102.
63. Aoki H., Slepecky R., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 137—143.
64. Kenten R.H., Mann P.J.G., (1955), *Biochem. J.*, **61**, 279—286.
65. Kono Y., Takahashi M.-A., Asada K., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 454—462.
66. Schmid R., (1975), *FEBS Lett.*, **60**, 98—102.
67. Lumsden J., Hall D.O., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 595—602.
68. Ilan Y., Czapski G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **498**, 386—394.
69. McClune G.J., Fee J.A., McClusky G.A., Grovers J.T., (1977), *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5220—5222.
70. Crichton R.R., (1979), w Oxygen Free Radicals and Tissue Damage, CIBA Foundation Symposium, t. 65, str. 57—76, Elsevier, Amsterdam.
71. Morgan E.H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **580**, 312—326.
72. Kon S.H., (1978), *Med. Hypoth.*, **4**, 445—471.
73. Pickart L., Thaler M.M., (1980), *J. Cell Physiol.*, **102**, 129—139.
74. Reiter B., (1979), w Oxygen Free Radicals and Tissue Damage, CIBA Foundation Symposium, t. 65, str. 285—294, Elsevier, Amsterdam.
75. Harrison P.M., Hoare R.J., (1980), *Metals in Biochemistry*, Chapman and Hall, London.

76. Gutteridge J. M. C., Stocks J., (1981), *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **14**, 257—329.
77. Boyer R. F., Schori B. E., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 244—250.
78. Nordberg M., Kojima Y., (1979), w *Metalothionein* (red. Kagi J. H. R., Nordberg M.), str. 41—124, Birkhauser Verlag, Basel.
79. Kagi J. H. R., Vasak M., Lerch K., Gilg D. E. O., Hunziker P., Bernhard W. R., Good M., (1984), *EHP, Environ. Health Perspect.*, **54**, 93—103.
80. Kagi J. H. R., Vallee B. L., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 2435—2442.
81. Kagi J. H. R., Nordberg M. (red.), (1979), *Metalothionein*, Birkhauser Verlag, Basel.
82. Brady F. O., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 143—145.
83. Bakka A., Webb M., (1981), *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 721—725.
84. Bakka A., Johanson A. S., Endressen L., Rugstad H. E., (1982), *Experientia*, **38**, 381—383.
85. Kojima Y., Kagi J. H. R., (1978), *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 90—93.
86. Petering D. H., Fowler B. A., (1986), *Environ. Health Perspect.*, **65**, 217—224.
87. Liczmański A. E., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, 113—136.
88. Michalski W., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 295—317.
89. Hassan H. M., (1985), w *Free Radical in Molecular Biology, Aging and Disease*, red. Armstrong D., Sohal R. S., Cutter R. G., Slater T. F., str. 77—85, t. 27, Raven Press, New York.
90. Hassan H. M., Fridovich I., (1979), *Rev. Infect. Dis.*, **1**, 357—367.
91. Fridovich I., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1—11.
92. Carlouz A., Touati D., (1986), *EMBO J.*, **5**, 623—630.
93. Fee J. A., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 84—86.
94. Gregory E. M., Yost T. J. Jr., Fridovich I., (1973), *J. Bacteriol.*, **115**, 897—991.
95. Gregory E. M., Fridovich I., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 543—548.
96. Hassan H. M., Fridovich I., (1977), *J. Bacteriol.*, **130**, 805—811.
97. Hassan H. M., Fridovich I., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7667—7672.
98. Fridovich I., (1983), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 239—257.
99. Moody C. S., Hassan H. M., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12821—12825.
100. Hassan H. M., Moody C. S., (1984), *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 233—236.
101. Hassan H. M., Fridovich I., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**, 385—396.
102. McCord J. M., Keele B. B. Jr., Fridovich I., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1024—1027.
103. McLeod J. W., Gordon J., (1923), *J. Pathol. Bacteriol.*, **26**, 332—343.
104. McLeod J. W., Gordon J., (1923), *J. Pathol. Bacteriol.*, **26**, 326—331.
105. Gregory E. M., Goscin S. A., Fridovich I., (1974), *J. Bacteriol.*, **117**, 456—460.
106. Gregory E. M., Fridovich I., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 1193—1197.
107. Gregory E. M., Fridovich I., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 543—548.
108. Costilow R. N., Keele B. B., (1972), *J. Bacteriol.*, **111**, 628—630.
109. Platterson C. O. P., Myers J., Thynol P. I., (1973), *Landcaster*, **51**, 109—114.
110. Skoneczny M., Chełstowska A., Rytka J., (1986), 13th International Conference on Yeast Genetic and Molecular Biology, Bauff, Canada, Yeast 2, Special Issue, str. 361.
111. Seah T., Kaplan J. G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2889—2893.
112. Avers C. J., Federman M., (1968), *J. Cell. Biol.*, **37**, 555—559.
113. Susani M., Zimniak P., Fessl F., Ruis H., (1976), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **357**, 961—970.
114. Rytka J., Śledziewski A., Litwińska J., Biliński T., (1976) *Mol. Gen. Genet.*, **145**, 37—42.
115. Rytka J., Śledziewski A., Łukaszewicz J., Biliński T., (1978), *Mol. Gen. Genet.*, **160**, 51—57.
116. Biliński T., Śledziewski A., Rytka J., (1980), *Acta Microbiol. Polon.*, **29**, 183—197.
117. Biliński T., Litwińska J., Śledziewski A., Rytka J., (1980) *Acta Microbiol. Polon.*, **29**, 199—212.
118. Krawiec Z., Biliński T., (1987), *Bull. Pol. Acad. Sci., Ser. B*, **35**, 285—291.

119. Śledziewski A., Rytka J., Biliński T., Hortner H., Ruis H., (1981), *Curr. Genet.*, **4**, 19—23.
120. Hortner H., Ammer G., Hartner E., Hamilton B., Rytka J., Biliński T., Ruis H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **128**, 179—184.
121. Woloszczuk W., Sprinson D. B., Ruis H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2624—2627.
122. Biliński T., Łukaszkiewicz J., Śledziewski A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1225—1233.
123. Barlas M., Ruis H., Śledziewski A., (1978), *FEBS Lett.*, **92**, 195—199.
124. Floche L., Schlegel W., (1971), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1401—1410.
125. Sies H., Wendel A., Burk R. F., (1981), w *Proceeding of the Third International Symposium on Oxidases and Related Redox Systems*, red. King T.E., Mason H.S., Morrison M., Academic Press.
126. Floche L., (1979), w *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*, CIBA Foundation Symposium, t. 65, str. 95—122, Elsevier, Amsterdam.
127. Forstrom J. W., Żakowski J., Tappel A. L., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2639—2644.
128. Ladenstein R., Wendel A., (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 877—882.
129. Smith J., Schrift A., (1979), *Comp. Biochem. Physiol.*, **63B**, 39—44.
130. Overbaugh J. M., Fall R., (1982), *FEMS Microbial Lett.*, **13**, 271.
131. Tozun S. R. D., Gallon J. R., (1979), *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 271.
132. Drotar A., Phelps P., Fall R., (1985), *Plant Sci.*, **42**, 35—40.
133. Tietze F., (1969), *Analyt. Biochem.*, **27**, 502—522.
134. Lee P. C., Bochner B. R., Ames B. N., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7496—7500.
135. Demple B., Halbrook J., (1983), *Nature*, **304**, 466—468.
136. Bochner B. R., Lee P. C., Willson S. W., Cutler Ch. W., Ames B. N., (1984), *Cell*, **37**, 225—232.
137. Christman M. F., Morgan R. W., Jacobson F. S., Ames B. N., (1985), *Cell*, **41**, 753—762.
138. Krawiec Z., Biliński T., (1987), XXIII Zjazd PTBioch, Białystok, streszczenia, 286—287.

JAN MARIA KWIATOWSKI*

Dysmutaza ponadtlenkowa — struktura, funkcja i filogeneza

Superoxide dismutase — structure, function, phylogenesis

Spis treści

- I. Anionorodnik ponadtlenkowy
 - I-1. Stopniowa redukcja tlenu cząsteczkowego
 - I-2. Powstawanie O_2^{\pm} w układach biologicznych
 - I-3. Układy biologiczne zabezpieczające przed toksycznymi formami tlenu
- II. Struktura dysmutazy ponadtlenkowej
 - II-1. Dysmutaza miedziowo-cynkowa
 - II-1. Dysmutaza żelazowa i manganowa
- III. Mechanizm reakcji dysproporcjonacji O_2^{\pm}
 - III-1. Reakcja spontaniczna i wymagania reakcji katalizowanej
 - III-2. Reakcja katalizowana przez dysmutazę miedziowo-cynkową
 - III-3. Reakcja katalizowana przez dysmutazę żelazową i manganową
- IV. Występowanie i filogeneza dysmutazy ponadtlenkowej
 - IV-1. Występowanie dysmutazy ponadtlenkowej
 - IV-1.1. Dysmutaza żelazowa
 - IV-1.2. Dysmutaza manganowa
 - IV-1.3. Dysmutaza kambialistyczna
 - IV-1.4. Dysmutaza miedziowo-cynkowa
 - IV-2. Filogeneza dysmutazy ponadtlenkowej

Contents

- I. Superoxide anion radical
 - I-1. Stepwise reduction of dioxygen
 - I-2. Generation of O_2^{\pm} in biological systems
 - I-3. Systems of biological protection from toxic forms of oxygen
- II. Superoxide dismutase structure
 - II-1. Cooper- and zinc-containing dismutase
 - II-2. Iron- and manganese-containing dismutase
- III. Mechanism of O_2^{\pm} disproportionation
 - III-1. Spontaneous reaction and requirements for catalytic reaction
 - III-2. Reaction catalyzed by Cu, Zn-superoxide dismutase
 - III-3. Reaction catalyzed by Fe- and Mn-superoxide dismutase

* Dr, Zakład Systematyki i Geografii Roślin, Instytut Botaniki UW, Al. Ujazdowskie 4, 00—478 Warszawa

IV. Distribution and phylogenesis of superoxide dismutase

IV-1. Distribution of superoxide dismutase

IV-1.1. Iron-containing superoxide dismutase

IV-1.2. Manganese-containing superoxide dismutase

IV-1.3. Cambialistic dismutase

IV-1.4. Cooper- and zinc containing dismutase

IV-2. Superoxide dismutase phylogenesis

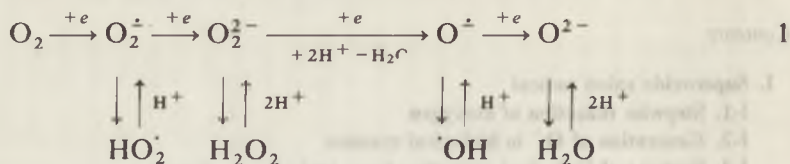
Wykaz stosowanych skrótów: EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny, PSI — fotosystem pierwszy, PSII — fotosystem drugi, SOD — dysmutaza ponadtlenkowa

Tlen, dzięki wyjątkowym własnościom molekularnym, stał się dobrodziejstwem dla organizmów żywych na Ziemi. Wysoki potencjał redukcyjny pary $1/2$ O_2/H_2O pozwolił na niezwykle bujny rozwój organizmów tlenowych, umożliwiając im wykorzystanie energii zawartej w związkach zredukowanych. Jednocześnie energia ta stanowi śmiertelne zagrożenie dla wszystkich struktur żywych czyniąc paradoksalnie tlen wysoce toksycznym. W 1954 r. Gerschman, Gilbert i in. [1] przedstawili pogląd, wg którego wiele szkodliwych efektów tlenu należy przypisać tworzeniu rodników tlenowych. Hipoteza ta została następnie rozwinięta, głównie przez Fridovicha, w tzw. ponadtlenkową teorię toksyczności tlenu [2, 2, 4].

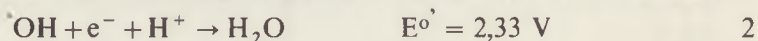
I. Anionorodnik ponadtlenkowy

I-1. Stopniowa redukcja tlenu cząsteczkowego

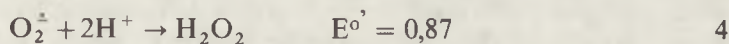
W konsekwencji budowy elektronowej cząsteczki tlenu, która ma 2 niesparowane elektrony o równoległych spinach na zewnętrznych orbitalach, reakcja redukcji O_2 przebiega z trudnością, chyba że jest stopniowym procesem podzielonym na etapy jednoelektronowe (Reakcja 1). W wyniku tej reakcji powstają produkty pośrednie o wzrastającej kolejno toksyczności;



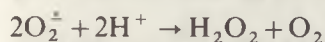
anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$), nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Z powstawaniem rodnika hydroksylowego wiążą się nieodłącznie rozległe uszkodzenia materii żywej, gdyż reaguje on niespecyficznie z wszystkimi związkami organicznymi [5, 6]. Jest on bardzo silnym utleniaczem jednoelektronowym i większość energii redukcji tlenu do wody zostaje uwolniona właśnie w reakcji 2 [6]. Spośród produktów pośrednich



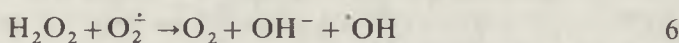
redukcji tlenu (Reakcja 1) jon ponadtlenkowy jest sam w sobie najmniej niebezpieczny, szczególnie w rozpuszczalnikach protonowych. Potencjały redukcyjne reakcji 3 i 4 wykazują, że



może on być zarówno utleniaczem jak i reduktorem [6]. Termodynamicznie faworyzowana reakcja utleniania przez O_2 jest jednak kontrolowana kinetycznie [7]. W środowisku wodnym podstawową reakcją jest więc reakcja dysproporcjonacji (dysmutacji) anionorodnika nadtlenkowego [6, 8].



Inną istotną cechą chemizmu $\text{O}_2^{\cdot -}$ jest jego zdolność do reakcji z H_2O_2 , znanej od 1934 r. jako reakcji *Haber-Weissa* [9], w wyniku której tworzy się $\cdot\text{OH}$. Tak więc obecność $\text{O}_2^{\cdot -}$ w środowisku wodnym prowadzi nieuchronnie do utworzenia H_2O_2 oraz, co gorsze, śmiertelnie groźnego $\cdot\text{OH}$.



I-2. Powstawanie $\text{O}_2^{\cdot -}$ w układach biologicznych

Powstawanie $\text{O}_2^{\cdot -}$ w żywych organizmach, jeszcze 15 lat temu wydawające się zjawiskiem niezwykłym, jest obecnie przekonywująco udokumentowane [2, 10]. Istnieje wiele biogennych substancji, które w reakcji autooksydacji wytwarzają $\text{O}_2^{\cdot -}$. Ponadto, wiele enzymów oksydoredukcyjnych, w trakcie katalizowanych przez siebie reakcji wytwarza i może uwalniać $\text{O}_2^{\cdot -}$.

W wyniku reakcji fotolizy wody w chloroplastach powstaje tlen cząsteczkowy bez wydzielania produktów pośrednich [11]. Tlen w oświetlanych chloroplastach jest nie tylko wydzielany, ale może być również zużywany w tzw. reakcji *Mehlera* [12], w wyniku której elektrony po redukującej stronie PSI przenoszone są na tlen. Wydaje się, że redukcja tlenu przez PSI jest jednym z naturalnych mechanizmów regulacji fotosyntezy [13]. Redukcję tlenu przez PSII stwierdzono jedynie w warunkach zahamowania transportu elektronów między fotosystemami nie przypisując jednak tej reakcji znaczenia praktycznego [14].

Przeważająca ilość tlenu atmosferycznego zużywana jest w mitochondriach przez oksydazę cytochromową bez uwalniania produktów pośrednich [15]. W mitochondriach roślinnych działają dodatkowo oksydazy niewrażliwe na cyjanek [16], które wytwarzają co prawda nadtlenek wodoru [17], ale bez udziału $\text{O}_2^{\cdot -}$ [18]. Wykazano, że nadtlenek powstaje jednak w mitochondriach [19] w dwóch rejonach transportu elektronów, *ubichinon-cytochrom b* [20, 21] oraz kompleksu dehydrogenazy NADH [18].

Wytwarzanie $\text{O}_2^{\cdot -}$ stwierdzono również w mikrosomach [22] i jądrze komórkowym [23]. Ponadto produkowany jest on w olbrzymich ilościach przez komórki cytotoksyczne kręgowców. Fagocytyjający leukocyt w stanie spoczynku zużywa niewiele tlenu, jednak po odpowiednim pobudzeniu, np. po wchłonięciu bakterii, zużycie tlenu wzrasta gwałtownie [24, 25]. Połączone jest to ze znacznym wzrostem zużycia glukozy w cyklu pentozowym i powstaniem znacznych ilości H_2O_2 [26] oraz $\text{O}_2^{\cdot -}$ [27]. Te zmiany w metabolizmie leukocytów znane są w literaturze angielskiej jako „respiratory burst” —

— „wybuch oddechowy” [28], w trakcie którego wytwarzane są czynniki utleniające służące do niszczenia patogenów. Ulega wówczas aktywacji oksydaza flawoproteinowa katalizująca redukcję tlenu przy użyciu zredukowanych dinukleotydów pirydynowych [29, 30] (Reakcja 7). Sugerowano także wykorzystywanie $O_2^{\cdot -}$ w innych fizjologicznych procesach, jak lignifikacja ściany komórkowej i obrona przed pasożytami u roślin [31].



Sięgnięcie przez naturę po rodniki tlenowe musiało spowodować rozległe konsekwencje. Niedostateczna kontrola ich wytwarzania lub defekty systemów ochronnych powodują wiele chorób. Rola $O_2^{\cdot -}$ w etiologii choroby Parkinso-
na [32], różnych odmian raka [33], cukrzycy [34], zaćmy [35], chorób autoimmunizacyjnych — jak liszaj rumieniowaty [36], czy gościec stawowy [37] oraz różnego rodzaju zapaleń, obrzmień i uszkodzeń spowodowanych urazem lub niedokrwieniem jest lepiej lub gorzej udokumentowana. Z kolei niedobór $O_2^{\cdot -}$, lub nadmiar SOD może prowadzić do innych chorób, być może, nawet choroby Downa [38, 39].

I-3. Układy biologiczne zabezpieczające przed toksycznymi formami tlenu

W trakcie ewolucji organizmy tlenowe wytworzyły wiele mechanizmów obronnych przeciwko toksycznym, częściowo zredukowanym formom tlenu. Przede wszystkim wytworzone zostały układy enzymatyczne przeprowadzające reakcję redukcji tlenu do wody (oksydaza cytochromowa [15]) oraz reakcję odwrotną (chloroplastowy enzym rozszczepiający wodę [11]), bez wydzielania produktów pośrednich. Inny rodzaj obrony realizowany jest przez enzymy neutralizujące zredukowane formy tlenu. Enzymatyczne wychwytywanie $\cdot OH$ jest niemożliwe, z uwagi na jego niesłychaną reaktywność. W eliminacji H_2O_2 biorą udział od dawna znane enzymy: katalaza i peroksydazy. Wytwarzanie $O_2^{\cdot -}$ również nie pozostaje w komórce bez odpowiedzi. Enzym odpowiedzialny za jego detoksykację, dysmutaza ponadtlenkowa, z powodu nieuchwytności substratu, został rozpoznany dopiero w 1969 roku. Obronę enzymatyczną uzupełnia w komórce jeszcze trzeci system niskocząsteczkowych związków przeciwutleniających, jak np. α -tokoferol, kwas askorbinowy, czy zredukowany glutation [40].

II. Struktura SOD

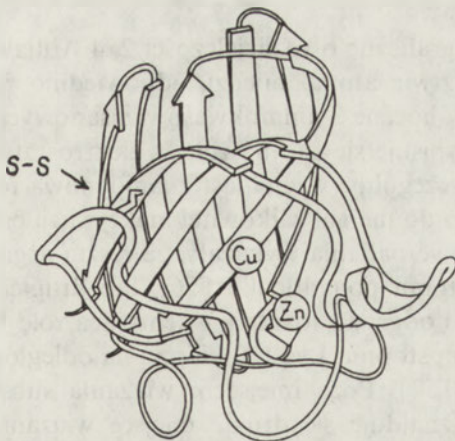
II-1. Dysmutaza miedziowo-cynkowa

Cu, Zn-SOD z erytrocytów wołu jest, podobnie jak pozostałe enzymy tej grupy, homodimerem i ma 151 aminokwasów w łańcuchu podjednostki [41]. Identyczność struktury podjednostek potwierdziły badania widma EPR [42] i dane krystalograficzne [43]. Jednak badania mechanizmu reakcji katalizowanej przez ten enzym wykazały, że względny stopień utlenienia atomów miedzi w centrum aktywnym w stanie równowagi dynamicznej nie jest równy temuż na

początku reakcji, mimo że od niego zależy. Wydaje się to świadczyć o nieidentyczności funkcjonalnej podjednostek. Ponadto wcześniejsze doniesienia o otrzymaniu aktywnych podjednostek Cu, Zn-SOD z miecznika [44] i wołu [45], przynajmniej w ostatnim przypadku, zostały zakwestionowane [46].

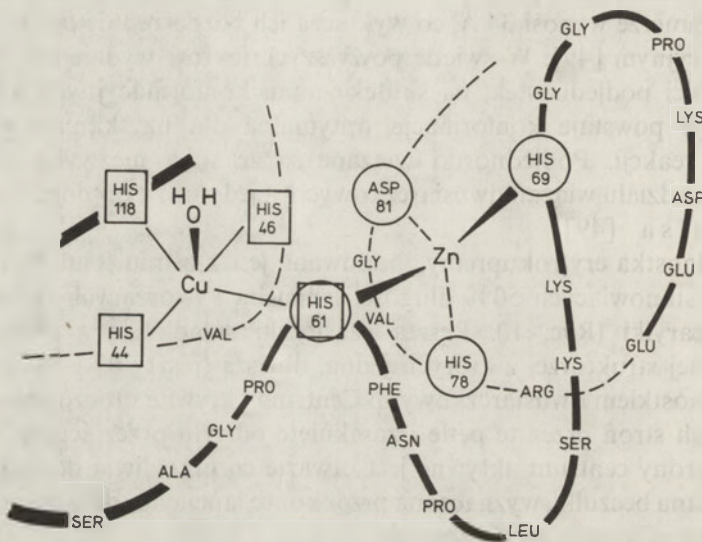
Funkcjonalna kooperacja podjednostek została potwierdzona przez badania kinetyki rekonstrukcji enzymu pozbawionego Cu. Proces ten można podzielić na dwie fazy: szybkie włączanie jonów miedzi, w którym przyłączenie drugiego atomu jest ułatwione przez przyłączenie pierwszego [47], po którym następuje wolno postępująca, oraz malejąca w miarę zbliżania się do stanu nasycenia (równego 2 atomom miedzi na cząsteczkę dimeru) rekonstrukcja aktywności i swoistego widma EPR [48]. Z kolei wykazano, że odległość między atomami miedzi w dimerze wynosi 34 Å, co wyklucza ich bezpośrednie oddziaływanie w akcie reakcyjnym [49]. W świetle powyższych faktów wydaje się, że pomimo identyczności podjednostek, na skutek zmian konformacyjnych wywołanych dimeryzacją powstaje konformacja optymalna dla uzyskania maksymalnej szybkości reakcji. Podjednostki związane są ze sobą niezwykle silnie [50], jednak bez udziału wiązań dwusiarczkowych, a jedynie za pomocą wiązań *van der Waalsa* [49].

Podjednostka erytrokupyreiny zbudowana jest z ośmiu β antyrównoległych odcinków stanowiących 50% długości łańcucha i tworzących strukturę spłaszczonej baryłki (Ryc. 1.). Reszta cząsteczki składa się z dwóch pętli o nieregularnej strukturze, z których jedna, dłuższa (reszty 49—84) spięta jest z beczką mostkiem dwusiarczkowym. Centrum aktywne otoczone jest z dwóch przeciwnych stron przez te pętle i zamknięte od tyłu przez ścianę beczki. Z czwartej strony centrum aktywne jest otwarte co umożliwia dostęp substratu. Boczna ściana beczki, wyznaczona przez końce łańcucha i dłuższą pętlę, tworzy miejsce oddziaływania podjednostek.



Ryc. 1. Podjednostka Cu, Zn-SOD z eurotrycytów wołu. Na rysunku pokazano schematycznie konformację łańcucha polipeptydowego z mostkiem dwusiarczkowym oraz miejsce wiązania miedzi i cynku (wg 51)

Metale centrum aktywnego odległe są od siebie o 6 Å i związane przez pierścień imidazolowy His 61 pochodzącej z krótszej, nieregularnej pętli. Cynk wiązany jest jeszcze przez dwie reszty histydyny pochodzące z tej samej pętli (His 69 i 78) oraz resztę kwasu asparaginowego (Asp 81) z jednego z łańcuchów, z których pochodzą też pozostałe ligandy miedzi (His 44, 46, 118) (Ryc. 2.). Ligandy atomu cynku tworzą w nieczynnym enzymie nieco naruszony czworościan foremny, natomiast ligandy miedzi leżą mniej więcej na jednej płaszczyźnie. Osłowo, prostopadłe do tej płaszczyzny w nieczynnym enzymie zajmuje miejsce woda jako piąty ligand. Dostęp do szóstej pozycji koordynacyjnej uzupełniającej strukturę ośmiościanu jest uniemożliwiony.



Ryc. 2. Topologia centrum aktywnego Cu, Zn-SOD z erytrocytów wołu (wg 52)

Badania krystalograficzne o rozdzielczości 2, 4 Å ujawniały ponadto, że w bezpośrednim sąsiedztwie atomu miedzi, odpowiednio 5, 12, 13 Å od niego znajdują się łańcuchy boczne 3 aminokwasów zasadowych: Arg 141, Lys 120 i Lys 134, którym przypisuje się istotną rolę w elektrostatycznym przyciąganiu substratu [53, 54]. Szczególnie ważna jest guanidynowa reszta Arg 141, której modyfikacja prowadzi do niemal całkowitej inaktywacji enzymu (do 98%) [53, 55]. Dalsze szczegółowe badania wykazały, że reszta argininy bierze udział w wiązaniu drugiego atomu ponadtlenku [56], lub drugiej cząsteczki wody w nieczynnym enzymie i odgrywa lokalną, orientującą rolę 57. Natomiast reszta Lys 134 i w mniejszym stopniu Lys 120 kierują na odległość cząsteczkę O_2^- do centrum aktywnego [57]. Poza miejscem wiązania substratu, w niewielkiej odległości od niego znajduje się drugie miejsce wiązania wody w centrum aktywnym.

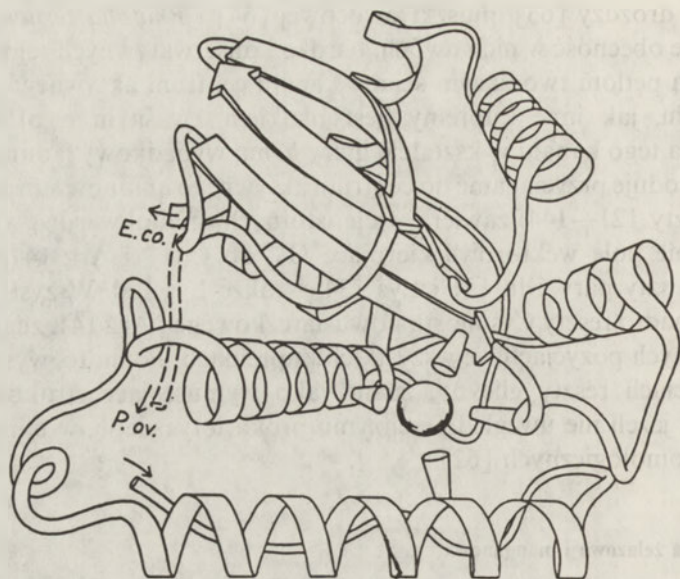
Porównanie sekwencji dziewięciu dysmutaz miedziowo-cynkowych: człowieka [58], krowy [41], konia [59], świni [60], ryby miecznika [61]. *Neurospora*

crassa [62], drożdży [63], muszki owocowej [64] i *Photobacterium leiognathi* [66] wykazuje obecność w nich dwóch, bardzo konserwatywnych rejonów, które odpowiadają pętłom tworzącym ściany kanału centrum aktywnego. Mimo, że SOD z wołu, jak inne kupreiny, jest białkiem kwaśnym o $pI = 4,8$ [66] powierzchnia tego kanału w kształcie litery Y ma wypadkowy ładunek dodatni [57], co powoduje przyciąganie do centrum aktywnego anionów substratu. Pętla krótsza (reszty 121—144) zawiera wiele istotnych aminokwasów, wytwarzających dodatnie pole wektorowe kierujące $O_2^{\cdot -}$ do Cu^{2+} i Arg 141, tj. przede wszystkim reszty pary Glu 131 i Lys 134, a także Lys 120. Wszystkie ligandy metali, a ponadto reszty Cys mostka dwusiarczkowego i Arg 141, znajdują się w homologicznych pozycjach we wszystkich kupreinach. Ponadto, występujące w dużych ilościach reszty glicyny, znane jako wymuszające strukturę β [67] znajdują się, jeżeli nie uwzględnić enzymu prokariotycznego, w ponad 80% w pozycjach homologicznych [62].

II-2. Dysmutaza żelazowa i manganowa

Zarówno wśród Fe-SOD jak i Mn-SOD występują enzymy homodi- i homotetrametryczne. Poznane sekwencje kilku enzymów manganowych i żelazowych świadczą o tym, że są one ze sobą blisko spokrewnione [68, 69]. Jak dotąd poznano całkowite sekwencje enzymów manganowych z *E. coli* [70], *B. stearothermophilus* [71], drożdży [72] i wątroby człowieka [73], a enzymów żelazowych z *E. coli* [74] i *P. leiognathi* [75]. Wydaje się, że białka te są mniej konserwatywne ewolucyjnie niż Cu, Zn-SOD (np. homologia sekwencji Mn-SOD z człowieka i drożdży sięga 43%, a homologia enzymów miedziowo-cynkowych z tych organizmów 54%). Z badań rentgenograficznych enzymów żelazowych z *E. coli* [76] i *Pseudomonas ovalis* [77] przeprowadzonych z rozdzielczością ok. 3 Å wynika, że ich struktury są wysoce powtarzalne (Ryc. 3.), różniąc się jedynie występującym w enzymie z *P. ovalis* dodatkowym odcinkiem na końcu karboksylowym.

Cząsteczka podjednostki Fe-SOD zawierająca około 200 aminokwasów składa się z sześciu α -helikalnych i trzech β -antyrownoległych odcinków. Dwie długie, antyrownoległe heliksy α stanowią oddzielną, N-końcową domenę dostarczającą dwóch ligandów żelaza. Dwa pozostałe pochodzą z drugiej C-końcowej domeny o mieszanej, 3 warstwowej strukturze α/β . Badania dichroizmu kołowego [78] oraz porównanie przewidywanej na podstawie sekwencji [79] struktury drugorzędowej [80] enzymów manganowych z uzyskaną metodą krystalograficzną strukturę Fe-SOD z *E. coli* [81] wykazało podobieństwo enzymów żelazowych i manganowych. Porównanie modelu przestrzennego łańcucha Fe-SOD z *E. coli* z mapą gęstości elektronów tetramerycznej Mn-SOD z *Thermus thermophilus* [78], otrzymaną z rozdzielczością 4,4 Å wykazało, że upakowanie obu białek jest prawie identyczne [82]. Jediną istotną różnicą jest wstawiona w enzymie manganowym między dwie domeny sekwencja odpowiedzialna za tworzenie tetrameru.



Ryc. 3. Schemat konformacji podjednostki Fe-SOD. Na rysunku przedstawiono atom żelaza w postaci kuli i położenie jego ligandów w łańcuchu, a także różnicę konformacji C-końcowego fragmentu enzymów z *E. coli* i *P. ovalis* (wg 77)

Z porównania znanych sekwencji i danych rentgenograficznych Mn-SOD i Fe-SOD wynika, że w białkach tych ligandami są 3 reszty histydyny i jedna kwasu asparaginowego. Znajdują się one w homologicznych pozycjach His 26, His 69, Asp 148 i His 152 w enzymach żelazowych [76, 77], oraz His 26, His 81, Asp 163, i His 167 w enzymach manganowych [69, 82]. Struktura przestrzenna centrum aktywnego Fe-SOD nie jest jeszcze znana w tak drobnych szczegółach jak w przypadku Cu, Zn-SOD. Wiadomo tylko, że jest ono otwarte z jednej strony dla rozpuszczalnika a także, że jest w nim jedno [76, 77], a może być dwa [83], miejsca wiązania anionów N_3^- . Można więc przewidywać, że w nieczynnym enzymie wiąże się z nim woda, a z jednym z ich O_2^{\pm} . W cząsteczce dimeru centra aktywne skierowane są częściowo do granicy między podjednostkami, a jony Fe odległe są od siebie o 18 Å, co czyni możliwym pewne oddziaływanie między centrami aktywnymi [82]. Ostatnie badania krystalograficzne o rozdzielczości 2,4 Å [84] wykazały, miejsca wiązania atomu Mn w enzymie z *T. thermophilus* otoczone jest przez konserwatywne ewolucyjnie reszty aminokwasów hydrofobowych (Phe 86 i Trp 87, 131, 167). Ponadto w odległości mniejszej niż 7 Å znajduje się reszta Tyr 36 połączona przez mostek z glutaminy (Gln 150) z resztą Trp 131. Wydaje się, że reszta tego ostatniego jest szczególnie ważna, gdyż ulega ona zniszczeniu podczas inaktywacji enzymu żelazowego wodą utlenioną [85], podobnie jak reszta Arg 141 w erytrokuperinie, co sugeruje udział tej grupy w reakcji dysmutacji. Również reszta Tyr 36 może ułatwiać przeniesienie protonu na O_2^{\pm} . Enzym manganowy z *T. thermophilus* [86] występuje w postaci tetrameru,

w tworzenie którego zaangażowana jest nieregularna pętla wstawiona między dwiema domenami [82]. Nie występuje ona w dimerycznej Mn-SOD z *E. coli*, chociaż jest obecna w dimerycznej Mn-SOD z *B. stearothermophilus* [71].

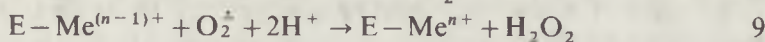
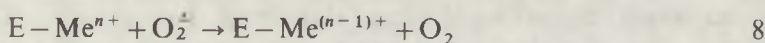
III. Mechanizm reakcji dysproporcjonacji $O_2^{\cdot-}$

III-1. Reakcja spontaniczna i wymagania reakcji katalizowanej

Reakcja dysproporcjonacji nadtlenku jest jedną z najprostszych reakcji jakie można sobie wyobrazić. Jon nadtlenkowy jest nietrwały w środowisku wodnym i ulega spontanicznej reakcji dysproporcjonacji. Ponieważ $O_2^{\cdot-}$ jest sprzężoną zasadą słabego kwasu HO_2^{\cdot} ($pK_a = 4,8$) [87] należy rozważyć 3 reakcje dysmutacji. Szybkość spontanicznej reakcji dysmutacji jest więc



największa w $pH = 4,8$ i spada o rząd wielkości wraz ze wzrostem o jednostkę pH . Ponieważ w fizjologicznym pH przeważa jednak nieuprotionowana forma nadtlenku (np. w $pH = 6,8 O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot} = 100$), rzeczywisty mechanizm katalizowanej reakcji dysmutacji powinien wykorzystywać $O_2^{\cdot-}$ i przeciwdziałać niekorzystnym cechom reakcji spontanicznej, a więc: trudności zbliżenia dwóch jednakowo naładowanych cząsteczek i mało prawdopodobnemu termodynamicznie wytworzeniu $O_2^{\cdot-}$. W takim mechanizmie powinno zatem następować przeniesienie elektronu z jednej cząsteczki $O_2^{\cdot-}$ na drugą bez konieczności ich zbliżenia do siebie. Mechanizm taki można zapisać następująco:



gdzie E oznacza apoenzym a Me jeden z metali przejściowych (Cu, Fe lub Mn). Rzeczywiście, zgodnie z danymi eksperymentalnymi, wydaje się, że jest to w ogólnych zarysach faktyczny mechanizm reakcji katalizowanych przez wszystkie rodzaje dysmutaz nadtlenkowych [88—91].

Z termodynamicznego punktu widzenia najkorzystniej będzie, gdy potencjały metalu prostetycznego w centrum reakcji będą się równały średniej potencjałów reakcji połówkowych (Reakcje 8 i 9), równych odpowiednio w $pH 7-0,17$ i $0,88 V$, a więc około $0,35 V$. W rzeczywistości tak jest [92] mimo, że potencjały metali nieskoordynowanych lub związanych z małymi ligandami, jak np. EDTA, znacznie odbiegają od tej wartości. Innym warunkiem powyższego mechanizmu, spełnianym przez wszystkie dysmutazy nadtlenkowe, jest konieczność obecności otwartej pozycji koordynacyjnej i możliwości tworzenia kompleksów metal-ponadtlenek. Dysmutaza nadtlenkowa jest niezwykle wydajnym katalizatorem. Stała szybkość reakcji wynosi w przypadku Cu, Zn-SOD z wołu około

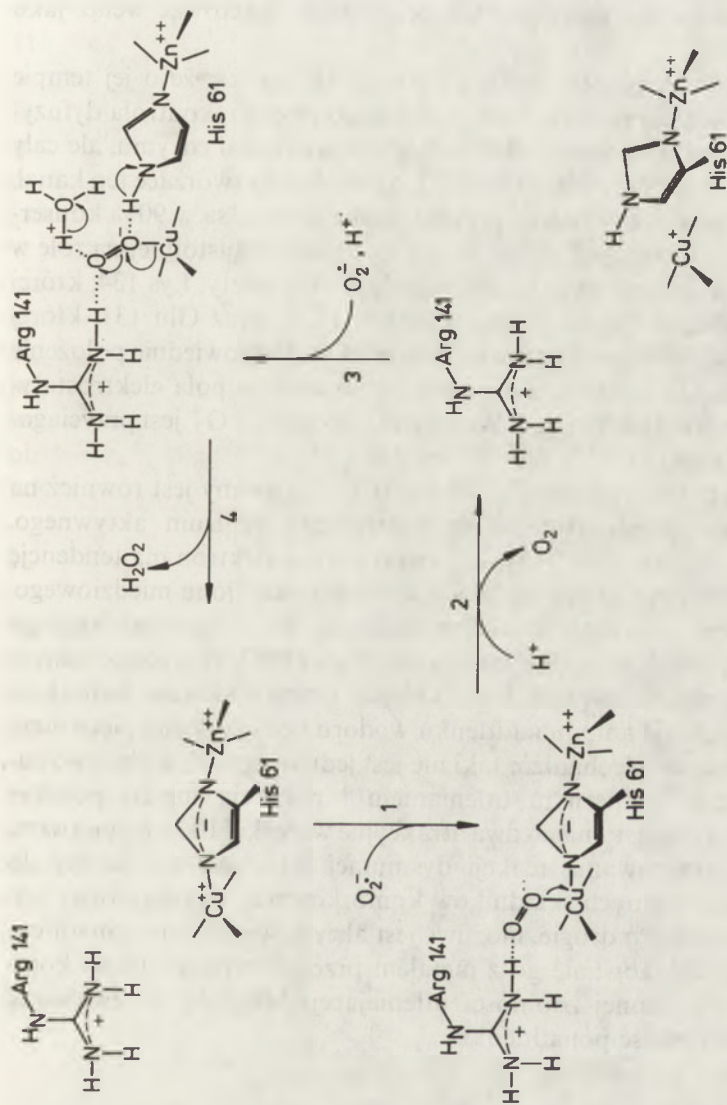
$2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [3], a w przypadku dysmutaz niewrażliwych na CN^- jest o rząd wielkości niższa [93, 94]. Wartość najwyższa zbliżona jest do granicy obszaru kontroli dyfuzyjnej [95]. W rzeczywistości, w przypadku Cu, Zn-SOD [42] proces jest kontrolowany dyfuzyjnie, natomiast w przypadku Fe-SOD, nie [90]. Badania kinetyki bydłęcego enzymu miedziowo-cynkowego, z użyciem roztworów ponadtlenku o stężeniu dochodzącym do 5mM, pozwoliły na wyznaczenie liczby obrotów (jedynie w temp 5,5°C), która wynosi $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ [96], co stanowi najwyższą do tej pory notowaną wartość. Oczyszczona z cytoplazmy liści pomidora kupreina katalizuje reakcję dysproporcjonacji ze stałą szybkości dochodzącą do $7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [97]. Kupreiny są więc, jak się wydaje, enzymami katalizującymi najszybsze reakcje.

III-2. Reakcja katalizowana przez dysmutazę miedziowo-cynkową

Poznanie szczegółów struktury centrum aktywnego dysmutazy miedziowo-cynkowej [51, 56], kinetyki jej działania oraz uwzględnienie jej właściwości biochemicznych [42, 88] pozwoliły na szczegółowe opisanie prawdopodobnego mechanizmu reakcji katalizowanej przez ten enzym (Ryc. 4.). W proponowanym mechanizmie uwzględniono takie fakty, jak: (i) znaczenie Arg 141 [53, 55], (ii) rozpad wiązania pomiędzy His 61 i jonom Cu^{2+} podczas katalizy, a także redukcji enzymu [98], połączony z pobraniem protonu [99] przez atom azotu His 61, nie będący ligandem Zn [100], (iii) brak zależności szybkości reakcji od pH w zakresie 5—9,5, co sugeruje że proton nie pochodzi z fazy wodnej oraz zależności aktywności enzymu pozbawionego Zn od pH (pK_a ok. 6,9) wskazującą na resztę histydyny jako na dawcę protonu, (iv) wypieranie wody przez anionowe inhibitory współzawodnicze [101].

Reakcja przebiega w czterech etapach. O_2^- wypiera aksjalnie związaną w nieczynnym enzymie wodę, łącząc się jednym atomem tlenu z Cu(II), a drugim przez wiązanie wodorowe z resztą guanidyny Arg 141 (etap 1). Redukcja Cu(II) przez związany O_2^- powoduje rozerwanie wiązania His 61 z miedzią, protonację azotu imidazolowego i uwolnienie cząsteczki tlenu (etap 2). Przyłączeniu następnej cząsteczki ponadtlenku do Cu(I) towarzyszy wytworzenie wiązań wodorowych z atomami tlenu. Jedno pochodzi od uprotonowanej His 61, drugie od Arg 141 a trzecie od wody związanej w centrum aktywnym (etap 3). Przeniesienie elektronu z Cu(I) na atom tlenu ponadtlenku, połączone z przeniesieniem protonów z His 61 i związanej wody, powoduje odtworzenie mostka imidazolowego między Cu^{2+} i Zn^{2+} i odłączenie cząsteczki H_2O_2 (etap 4). Cykl zamyka się. Podczas jego przebiegu atomy miedzi i cynku oraz ich ligandy ulegają niewielkim rotacjom ułatwiającym reakcję. Znalazło to potwierdzenie w badaniach spektralnych [102].

Według omawianej hipotezy, w reakcji katalizowanej przez Cu, Zn-SOD bardzo istotna jest rola cynku. W utlenionej formie enzymu wiązanie cynku poprzez pierścień imidazolowy His 61 z miedzią ma podnosić jej potencjał redukcyjny do wymaganej wartości 0,42 V [100, 101]. W drugim etapie obecność



Ryc. 4. Mechanizm reakcji katalizowanej przez Cu, Zn-SOD z erytrocytów wołu (wg 56). Szczegółowy opis w tekście

cynku ma podnosić pK_a His 61 do ok. 13 [103], czyniąc poprzez wymuszenie jej uprotonowania, ten etap niezależnym od pH. Jednak późniejsze szczegółowe badania [96, 104, 105] wykazały, że aktywność enzymu pozbawionego cynku jest niewiele mniejsza od aktywności holoenzymu, a wrażliwość na pH tej pierwszej może wynikać z migracji jonów miedzi do nieobsadzonych miejsc cynkowych [105]. Z tych też powodów powyższą hipotezę należy traktować wciąż jako tymczasową.

Reakcja katalizowana przez Cu, Zn-SOD jest tak szybka, że o jej tempie decyduje szybkość dotarcia substratu do centrum aktywnego (kontrola dyfuzyjna). Miejsce wiązania Cu stanowi zaledwie 0,1% powierzchni enzymu, ale cały kanał centrum aktywnego już około 10% [57]. Aminokwasy tworzące ten kanał, którego struktura umożliwia wydadne przyspieszenie dyfuzji, są w 90% konserwatywne w zsekwencjonowanych do tej pory kupreinach. Najistotniejszą rolę w kierowaniu substratu do centrum aktywnego odgrywają reszty: Lys 134, której ϵ -aminowa grupa odległa jest od atomu miedzi o 17 Å, oraz Glu 131, której ujemny ładunek utrudnia nieproduktywne kolizje z O_2^{\pm} . Odpowiednie położenie pary Lys 134—Glu 131 umożliwia skierowanie wektorów pola elektrostatycznego kanału do centrum aktywnego. Wewnątrz tego kanału O_2^{\pm} jest przyciągany przez dodatnie ładunki Cu^{2+} , Zn^{2+} i Arg 141 [57].

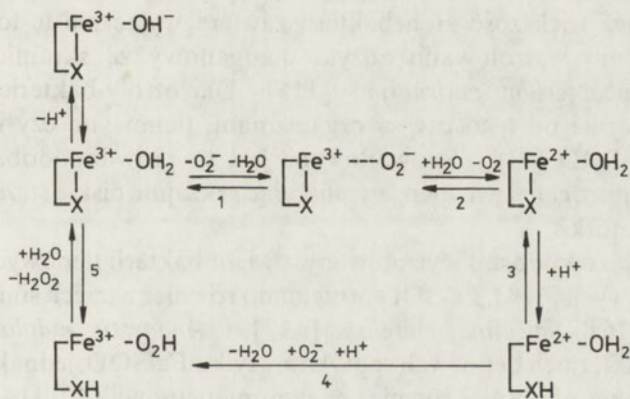
Powyższy mechanizm działania Cu, Zn-SOD krytykowany jest również na podstawie kwantowo-chemicznych obliczeń struktury centrum aktywnego. Wykazują one, że kompleks $Cu^{2+}-O_2^{\pm}-H^+$ jest trwały, a elektron ma tendencję do przebywania w części $O_2^- - H^+$ i nie powinien redukować jonu miedziowego. Kompleks taki byłby silnym utleniaczem zdolnym do utleniania drugiego anionorodnika ponadtlenkowego lub innego substratu [106]. W zredukowanym w ten sposób kompleksie zachodziłoby kolejne przegrupowanie ładunków prowadzące do uwolnienia anionu nadtlenu wodoru i odtworzenia pierwotnej utlenionej formy enzymu. Mechanizm taki nie jest jednak zgodny z obserwowanym eksperymentalnie cyklicznym utlenianiem i redukcją miedzi podczas katalizy. Wynikają natomiast z niego dwa atrakcyjne wnioski [106]. Po pierwsze, że enzym oprócz katalizowania reakcji dysmutacji O_2^{\pm} , jest też zdolny do selektywnego utlenienia innych składników komórkowych, wykorzystując ponadtlenek jako kofaktor. Po drugie, możliwe jest aktywowanie jonu ponadtlenkowego poprzez skoordynowanie go z metalem przejściowym w trwały kompleks o znacznie zwiększonej zdolności utleniającej. Mogłoby to zwiększać kwestionowaną toksyczność ponadtlenu.

III-3. Reakcja katalizowana przez dysmutazę żelazową i manganową

Ponieważ zasób informacji na temat struktury i reakcji katalizowanej przez Fe-SOD i Mn-SOD jest znacznie uboższy, nie zaproponowano do tej pory tak szczegółowej hipotezy mechanizmu ich działania, jak to ma miejsce w przypadku Cu, Zn-SOD. Podobieństwo struktury centrum aktywnego enzymów żelazowych i manganowych sugeruje podobieństwo mechanizmów reakcji katalizowa-

nych przez te enzymy. Ponadto, pomimo wcześniej podkreślanych różnic [90, 98, 107] stwierdzono uderzające podobieństwo w kinetyce tych enzymów, przynajmniej, gdy idzie o Fe-SOD z *E. coli* [93] i Mn-SOD z *P. denitrificans* [94]. I tak, w przypadku obu enzymów stała szybkości rozpadu kompleksu enzym-substrat $\left\{ k_{cat} = V_{max}/SOD = (3-7) \times 10^4 s^{-1} \right\}$ jest niezależna od pH w zakresie od 6 do 11, zaś stała Michaelisa ($K_m = (1-2) \times 10^{-4} M$) jest niezależna od pH poniżej ok. 9 i wzrasta o rząd wielkości wraz ze wzrostem pH o jedną jednostkę. Daje to w obu przypadkach dokładnie taką samą drugorzędową stałą szybkość reakcji ($k = 3,3 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$) w szerokim zakresie pH. Ponadto, w obu enzymach stwierdzono istnienie skoordynowanej z metalem cząsteczki H_2O [108, 109].

Wydaje się zatem, że mimo dość istotnej różnicy we właściwościach, jaką jest niewrażliwość Mn-SOD na H_2O_2 , mechanizm reakcji katalizowanej przez oba enzymy może być podobny. Rycina 5 przedstawia jedną z wielu proponowanych hipotez opisujących mechanizm działania Fe-SOD. Tłumaczy ona takie fakty jak: (i) obecność w cząsteczce dwóch miejsc wiązania anionowych inhibitorów współzawodniczych i taką samą zależność K_i oraz K_m (dla O_2^-) od pH, (ii) obecność w zredukowanym enzymie grupy zdolnej do jonizacji o pK_a ok. 9, a także (iii) nieodwracalność procesu przez duże stężenie H_2O_2 ($>1M$) [81].



Ryc. 5. Schematyczny mechanizm reakcji katalizowanej przez Fe-SOD (wg 81, zmienione)

Obecnie wiadomo, że ligandami Fe i Mn w obu enzymach są 3 reszty histydyny i jedna kwasu asparaginowego [84]. Jedna z tych reszt jak się przypuszcza, może przechodzić cykl jonizacji i koordynacji żelaza (jak na ryc. 5.), podobny do tego jaki przechodzi His 61 w Cu, Zn-SOD. Aby to nastąpiło drugi azot pierścienia imidazolowego musiałby być związany z elektrododatnią grupą podnoszącą pK_a wodoru azotu pierwszego przynajmniej do wartości równej 9. Ponadto jest wielce prawdopodobne, że pierścień łańcucha bocznego Trp 130

odgrywa podobną rolę jak reszta guanidynowa Arg 141 w Cu, Zn-SOD, kotwicząc jon ponadtlenkowy poprzez drugi, niezwiązany z żelazem, atom tlenu. Ponieważ prace nad rozwikłaniem mechanizmu i struktury centrum aktywnego Mn-SOD i Fe-SOD są w toku, niebawem dowiemy się, czy przypuszczenia te zostaną potwierdzone.

IV. Występowanie i filogeneza dysmutazy ponadtlenkowej

IV-1. Występowanie dysmutazy ponadtlenkowej

Poza nielicznymi wyjątkami wszystkie organizmy tlenowe, a także niektóre beztlenowe zawierają dysmutazę ponadtlenkową. Tymi wyjątkami są bakterie tlenowe *Mycoplasma pneumoniae* [110] i *Lactobacillus plantarum* [111] oraz pasożyt malaryczny *Plasmodium berghei* [112]. Dwa z nich zostały przekonywująco wyjaśnione. *L. plantarum* akumuluje Mn(II) (będący katalizatorem dysmutacji $O_2^{\cdot -}$) do niespotykanego poziomu 25 mM, zastępując nim mikromolowe stężenia SOD obecne w większości innych bakterii [113]. *P. berghei* korzysta, jak się wydaje, z dysmutazy organizmu gospodarza importując ją do wnętrza własnej komórki [112].

IV-1.1. Dysmutaza żelazowa

Fe-SOD jest jedyną formą enzymu występującą u bakterii anaerobowych [114]. Również większość archebakterii zawiera wyłącznie tę formę enzymu, chociaż ostatnio wyizolowano enzym manganowy ze skrajnie słonolubnej bakterii *Halobacterium cutirubrum* [115]. Diazotrofy-bakterie asymilujące azot — niezależnie od tego czy są organizmami tlenowymi czy nie, zawierają wyłącznie Fe-SOD [114]. Spowodowane jest to prawdopodobnie niezwykle wrażliwością nitrogezy na tlen, wymuszającą skrajnie niskie stężenie tego gazu wewnątrz komórki.

Enzym żelazowy został wyizolowany z wielu bakterii tlenowych i fakultatywnie beztlenowych [114]. Fe-SOD otrzymano również z trzech sinic: *Plectonema boryanum* [116], *Spirulina platensis* [117] i *Anacystis nidulans* [118]. W niektórych bakteriach tlenowych spotykamy tylko Fe-SOD, jednak w większości z nich występują obok niej również enzym manganowy [10, 114, 119], a w *P. leiognathi* miedziowo-cynkowy [120]. Wykazano, że bakterie gram-ujemne zawierają przeważnie Fe-SOD obok Mn-SOD, a gram-dodatnie prawie wyłącznie Mn-SOD [121], chociaż stwierdzono liczne wyjątki od tej reguły [10].

W odróżnieniu od bakterii, występowanie enzymu żelazowego u *Eukaryota* jest raczej rzadkością. Na podstawie pośrednich dowodów opartych na pomiarze wrażliwości SOD na różne inhibitory, wielokrotnie postulowano istnienie enzymu u pierwotniaków [114], a także powszechną jego obecność u glonów [114, 122, 123]. Wyniki te należy traktować z rezerwą. Nie podlega jedynie wątpliwości występowanie Fe-SOD u wiciowców, ponieważ udało się enzym ten

otrzymać (i scharakteryzować jako Fe-SOD) z *Euglena gracilis* [124] i *Crithidia fasciculata* [125]. W organizmach tych enzym występuje w cytosolu (u *Euglena gracilis* również w chloroplastach) [124, 125].

Do niedawna brak Fe-SOD u wyższych Eukaryota traktowany był jako pewnik [2, 3, 119]. Jednak w 1980 r. wyizolowano Fe-SOD z *Brassica campestris* [126], a następnie z kilku innych roślin wyższych [127—129] i stwierdzono jego lokalizację w chloroplastach [130]. Wydaje się więc, że dysmutaza żelazowa występuje w wielu roślinach, nie we wszystkich jednak ulegając wyraźnej ekspresji. Do tej pory nie udało się wykryć enzymu żelazowego u grzybów i zwierząt.

IV-1.2. Dysmutaza manganowa

Enzym manganowy występuje powszechnie w organizmach na wszystkich poziomach rozwoju ewolucyjnego. Brak go jedynie w organizmach beztlenowych i to zarówno w bakteriach jak i pierwotniakach [114]. U fakultatywnych oetlenowców, np. u *E. coli* w warunkach anaerobiozy, enzym manganowy ulega represji ustępując miejsca konstytutywnej Fe-SOD [131]. Mn-SOD jest jedyną formą dysmutazy w fotosyntetyzujących bakteriach tlenowych [114] i w większości bakterii gram-dodatnich [121].

Uważa się, że enzym manganowy występuje zasadniczo u wszystkich organizmów eukariotycznych [3, 114, 119], prawie wyłącznie w mitochondriach. I tak: grzyby, jak drożdże [132] i *N. crassa* [133]; rośliny wyższe, jak topinambur [133], kukurydza [134], szpinak [135] inne [136]. Wątoba kurczęcia i serce świni [137] — zawierają Mn-SOD w matriks mitochondrialnej, ale w wątrobie naczelnych występuje ona również w cytoplazmie [138]. Na uwagę zasługuje fakt, że oczyszczona (i scharakteryzowana) dysmutaza manganowa z liści grochu występuje tam w peroksysomach, nie zaś w mitochondriach [139], a niedawno wyizolowano z ilości szpinaku Mn-SOD związaną z tylakoidami, (stanowi ona jednak zaledwie ok. 2,5% aktywności dysmutazy chloroplastowej) [140]. Ponieważ mitochondrialne i bakteryjne Mn-SOD mają homologiczne sekwencje N-końcowych fragmentów łańcuchów polipeptydowych [141], fakt ten wykorzystywano jako argument potwierdzający tezę o endosymbiotycznym pochodzeniu mitochondriów i eukariotycznej dysmutazy manganowej [142].

IV-1.3. Dysmutaza kambialistyczna

W 1982 roku wykryto i wyizolowano z *Propionibacterium shermanii* dysmutazę inkorporującą do centrum aktywnego żelazo lub mangan w zależności od składu pożywki [143]. W latach następnych wyizolowano podobne białka z odległych filogenetycznie bakterii: *Nocardia asteroides* [144], *Bacteroides fragilis* [145, 146] i *Bacteroides thetaiotaomicron* [147]. Organizmy te produkują białko włączające żelazo lub mangan w zależności od składu pożywki, lub potencjału oksydo-redukcyjnego, preferując w warunkach anaerobowych żelazo. O małej specyficzności w stosunku do metalu niektórych dysmutaz świadczy włączanie

do centrum katalitycznego nieaktywnego cynku [144, 147]. Fakt istnienia takich dysmutaz ponadtlennokowych, zapewne liczniejszych niż się przypuszcza (kambialistyczny enzym ze *Streptococcus mutans* [148] znany był od dawna jako Mn-SOD [149]) świadczy o wspólnym pochodzeniu Mn-SOD i Fe-SOD i ich bliskim pokrewieństwie.

IV-1.4. Dysmutaza miedziowo-cynkowa

Enzym miedziowo-cynkowy występuje powszechnie i prawie wyłącznie w organizmach eukariotycznych [2, 3, 114, 119]. Przez długie lata jedynym wyjątkiem była symbiotyczna bakteria *Photobacterium leiognathi* żyjąca w rybie kucyk (ang. ponyfish), *Leiognathus splendens*. W bakterii tej obok enzymu żelazowego występuje kupreina [120]. Ponieważ inne bakterie z rodzaju *Photobacterium* nie zawierają tego enzymu wysunięto hipotezę, że przedostał się on do bakterii na skutek transferu genu kodującego białko w rybie [2]. Przypuszczenie to znalazło potwierdzenie w analizie statystycznej składów aminokwasowych Cu, Zn-SOD z różnych kręgowców i *P. leiognathi*, która wykazała ściśle pokrewieństwo enzymu bakteryjnego z kupreinaми rybimi [150].

Stwierdzenie to rozpoczęło długą dyskusję na temat możliwości, a przede wszystkim wagi, dowodów przemawiających za takim „poziomym” przekazaniem genu z ryby do bakterii [65, 151 — 153]. Oczyszczenie bakteriokupreiny z wolnożyjącej bakterii *Caulobacter crescentus* [154] i wykrycie charakterystycznej dla niej aktywności w *Pseudomonas* kilku szczepów [155] znacznie osłabiło siłę argumentacji zwolenników hipotezy transferu genów. Ostatnio opublikowana analiza filogenetyczna znanych sekwencji aminokwasów kuprein nie pozwala na jasną konkluzję; jakkolwiek za bardziej prawdopodobne w jej świetle uznać należy rozejście się enzymów z ryby i bakterii przed rozdzieleniem *Prokaryota* i *Eukaryota* [156]. Z drugiej strony dane geologiczne na temat zmiennej dostępności metali przejściowych w trakcie rozwoju życia na Ziemi sugerują raczej transfer genu [157].

Pierwotniaki [114, 119], a także większość glonów eukariotycznych [114, 119, 122], najwyraźniej nie mają dysmutazy miedziowo-cynkowej. Jedyną grupą glonów, których komórki zawierają Cu, Zn-SOD są niektóre zielenice posiadające fragmoplast [158]. Uważa się, że to właśnie zielenice fragmoplastowe mogły dać początek roślinom wyższym [159]. Grzyby i śluzowce zawierają kupreinę obok enzymu manganowego [160]. Tylko świecący podstawczak *Pleurotus olearius* jest jedynym, do tej pory znanym, grzybem nie zawierającym tego enzymu. Również przegląd prymitywnych morskich bezkręgowców wykazał, że kupreina obecna jest w nich wszystkich [114].

Najlepiej zbadano występowanie kupreiny wśród kręgowców, pośród których nie znaleziono organizmu nie posiadającego tego enzymu, mimo że przebadano ich wiele [161, 162]. Wszystkie rośliny wyższe, z wyjątkiem *Nymphaeaceae* [163], łącznie z mszakami i paprotnikami, zawierają Cu, Zn-SOD [122]. Enzym występuje w liściach, nasionach, owocach i korzeniach [114, 164, 165]. Podstawowym miejscem występowania kupreiny w komórce organizmów

wyższych jest cytoplazma [2, 114, 119, 164]. Obecność izoenzymu Cu, Zn-SOD w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów stwierdzono w komórkach topinamburu i *N. crassa* [133] oraz wątrobie kurczęcia [137]. Wydaje się więc, że enzym występuje tam powszechnie zarówno u roślin jak i u zwierząt. Natomiast, w tkankach zielonych roślin zdecydowanie przeważa chloroplastowa Cu, Zn-SOD [97, 114, 136, 164].

IV-2. Filogeneza dysmutazy nadtlenkowej

Obraz występowania różnych form SOD jest, jak to powyżej przedstawiono, dość skomplikowany, lecz mimo licznych wyjątków można go ująć w ogólne ramy [114, 119]. Enzym żelazowy, prawdopodobnie najprymitywniejszy, występuje u wielu bakterii łącznie z sinicami, archebakteriami, anaerobami (w ostatnim przypadku jest jedyną formą enzymu), oraz u niektórych pierwotniaków i glonów. Mn-SOD występuje zasadniczo jako jedyna forma enzymu w bakteriach gram-dodatnich i obok Fe-SOD w bakteriach gram-ujemnych. W komórkach eukariotycznych enzym manganowy występuje w mitochondriach, a żelazowy w chloroplastach, co zgadza się znakomicie z endosymbiotyczną hipotezą powstania tych organelli. Kupreiny są osiągnięciem Eukaryota, gdzie występują zasadniczo w cytoplazmie, ale również w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów i stromie chloroplastów. Nieliczne przypadki występowania Cu, Zn-SOD u *P. leiognathi* i pewnych bakterii można wytłumaczyć odwołując się do transferu genu z *Eukaryota* do *Prokaryota*.

Wziąwszy pod uwagę homologię sekwencji, podobieństwo struktury oraz występowanie dysmutazy żelazowej i manganowej, a także istnienie dysmutaz kambialistycznych można uważać, że Fe-SOD i Mn-SOD mają wspólnego przodka, najpewniej Fe-SOD, lub raczej enzym kambialistyczny. Powstanie enzymu manganowego mogło być odbiciem wzrastającego stężenia tlenu w biosferze, jakieś 2 do 3 miliardów lat temu, gdy stężenie tlenu w atmosferze było około 10^4 razy mniejsze niż obecnie [166]. Wydaje się, że uzyskanie Cu, Zn-SOD przez *Eukaryota* miało miejsce ponad 450 mln lat temu, przed pojawieniem się *Porifera* i *Coelenterata*. kiedy to stężenie tlenu było około 100 razy mniejsze od obecnego [166].

Obraz filogenezy dysmutazy nadtlenkowej staje się bardziej przejrzysty [153], gdy spojrzeć na nią w świetle teorii endosymbiotycznego pochodzenia komórki eukariotycznej [167—171], a także zmiennych warunków geochemicznych biosfery [157]. Konieczność detoksykacji tlenu pojawiła się najprawdopodobniej na długo przed powstaniem atmosfery utleniającej, w odpowiedzi na pojawiający się przejściowo w biosferze na skutek radiolizy wody tlen molekularny [172]. Tłumaczy to występowanie Fe-SOD w wielu ściśłych anaerobach. Z uwagi na dostępność Fe^{2+} w redukującej biosferze pierwszym enzymem była najpewniej dysmutaza żelazowa a ściślej enzym kambialistyczny, w którym miejsce metalu okupowane było przez żelazo na skutek jego znacznej przewagi w środowisku.

W miarę jak sinice zaczęły nagromadzać tlen molekularny w atmosferze

ziemskiej zagrożenie ponadtlenkiem zaczęło wzrastać. Jednocześnie składniki mineralne biosfery ulegały utlenieniu powodując dramatyczny spadek dostępności żelaza. Ponieważ wczesna dysmutaza nie wykazywała ścisłych wymagań co do rodzaju metalu przejściowego, następnym kandydatom do wykorzystania w centrum aktywnym był mangan; drugi pod względem rozpowszechnienia, rozpuszczalny w środowisku umiarkowanie utleniającym metal przejściowy, łatwo zmieniający stopień utlenienia. Z powodu wypełnienia orbitali d miedź nie może tworzyć oktaedrycznej struktury koordynacyjnej, charakterystycznej dla dysmutazy kambialistycznej. Wobec wzrastającego stężenia tlenu w atmosferze tylko organizmy wyposażone w dysmutazę mogły przetrwać. W tym czasie w jednej z linii ewolucyjnych nie zawierających tego enzymu powstała zapewne dysmutaza miedziowo-cynkowa. Linia ta, jak się wydaje, dała początek organizmom eukariotycznym.

W komórkach eukariotycznych można wyodrębnić dwie grupy dysmutaz: Cu, Zn-SOD występującą zasadniczo w cytoplazmie oraz dysmutazy typu bakteryjnego związane z organellami (Mn-SOD w mitochondriach i Fe-SOD w chloroplastach). Teoria endosymbiozy tłumaczy najprościej występowanie różnych form enzymu wśród organizmów z różnych poziomów ewolucyjnych [153]. Dość liczne wyjątki można tłumaczyć jako następstwo: (i) Przeniesienia genu kodującego SOD z jednego organizmu do innego (bakteriokupreiny); (ii) Zaniku jednego lub więcej redundantnych enzymów w trakcie ewolucji (brak Mn-SOD i lub Fe-SOD w niektórych glonach, Cu, Zn-SOD zaś w pierwotniakach i niektórych roślinach); (iii) Zasiedlania kolejnych przedziałów komórkowych przez różne formy enzymu w miarę podnoszenia się poziomu rozwoju ewolucyjnego ich gospodarzy (Cu, Zn-SOD w chloroplastach i przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, Fe-SOD w cytoplazmie *Euglena*, Mn-SOD w cytoplazmie wątroby naczelnych itd.); (iv) Powtarzalnych przejść od Fe-SOD do Mn-SOD i *vice-versa* lub małej specyficzności dysmutazy kambialistycznej (enzymy bakteryjne).

Podziękowania

Pragnę wyrazić wdzięczność osobom, które okazały mi pomoc i wsparcie w trakcie przygotowywania niniejszej pracy; przede wszystkim mojej żonie a także doc. A. Batko, dr G. Bystrzejewskiej, prof. B. Cymborowskiemu, doc. A. Drabikowskiej, dr J. Fronkowi, dr M. Gellerowi, dr A. Jerzmanowskiemu, dr M. Kalinowskiej, prof. Z. Kwiatkowskiemu, mgr L. Lipińskiej, dr J. Pijanowskiej, mgr A. Safianowskiej, prof. E. Symonides, prof. K. Toczko, doc. T. Umińskiemu, mgr C. Urbańskiemu, doc. L. Wasilewskiej, prof. P. Węgleńskiemu oraz wielu Innym, Których pominąłem lub nie jestem świadom Ich pomocy.

Artykuł otrzymano 4 listopada 1987 r.

Zaakceptowano do druku 23 czerwca 1988 r.

PIŚMIENICTWO

1. Gerschman R., Gilbert D. L., Nye S. W., Dwyer P., Fenn W. O., (1954), *Science*, **119**, 623—626.
2. Fridovich I., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 147—159.
3. Fridovich I., (1978), *Science*, **201**, 875—880.
4. Fridovich I., (1983), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 239—257.
5. Halliwell B., Gutteridge J. M. C., (1984), *Biochem. J.*, **219**, 1—14.
6. Fee J. A., Valentine J. S., (1977) w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A., McCord J.M., Fridovich I., str. 18—60; Academic Press, New York.
7. Bielski B. H. J., Gebicki J. M., (1970), *Adv. Rad. Chem.*, **2**, 177—279.
8. Bielski B. H. J., (1978), *Photochem. Photobiol.*, **28**, 645—649.
9. Haber F., Weiss J., (1934), *Proc. Roy. Soc. Lond. A*, **147**, 332—351.
10. Fridovich I., (1982) w *Pathology of Oxygen*, red. Autor A.P., str. 1—19; Academic Press, New York.
11. Renger H., (1978) w *Photosynthetic Oxygen Evolution*, red. Metzner H., str. 229—248, Academic Press, London.
12. Sawyer D. T., Valentine J. S., (1981), *Acc. Chem. Res.*, **14**, 393—400.
13. Foyer C. H., Hall D. O., (1980), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 188—191.
14. Elstner E. F., (1982), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 73—96.
15. Boveris A., Chance B., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 707—716.
16. Ikuma H., (1972), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **44**, 126—134.
17. Rich P. R., Boveris A., Bonner W. D., Jr, Moore A. L., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 695—703.
18. Rich P. R., Bonner W. D. Jr, (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 206—213.
19. Hug S., Palmer J. M., (1978), *Plant Sci. Lett.*, **11**, 351—383.
20. Boveris A., Oshino N., Chance B., (1972), *Biochem. J.*, **128**, 617—630.
21. Boveris A., Cadenas E., (1975), *FEBS Lett.*, **54**, 311—314.
22. Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R. W., (1982), *Biochem. J.*, **203**, 551—558.
23. Patton S. E., Rosen G. M., Rauckman E. J., (1980), *Mol. Pharmacol.*, **18**, 588—593.
24. Baldrige C. W., Gerard R. W., (1933), *Am. J. Physiol.*, **103**, 235—236.
25. Babior B. M., (1982) w *Pathology of Oxygen*, red. Autor A.P., str. 45—58; Academic Press, New York.
26. Iyer G. Y. N., Islam M. F., Quastel J. H., (1961), *Nature*, **192**, 535—541.
27. Curnutte J. T., Babior B. M., (1974), *J. Clin. Invest.*, **53**, 1662—1672.
28. Sbarra A. J., Karnovsky M. L., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 1355—1362.
29. Babior B. M., Curnutte J. T., McMurrich B. J., (1976), *J. Clin. Invest.*, **58**, 989—996.
30. Gabig T. G., Kipnes R. S., Babior B. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6663—6665.
31. Elstner E. F., (1984) w *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, red. Bors W., Saran, Tait D., str. 967—981; Walter de Gruyter, Berlin.
32. Cohen G., (1982) w *Pathology of Oxygen*, red. Autor A.P., str. 115—126; Academic Press, New York.
33. Parellada P. P., Planas J., Pujades A., Corrons J. V., (1983) w *Oxy Radicals and Their Scavenger Systems*, t. 2, Cellular and Medical Aspects, red. Greenwald R.A., Cohen G., str. 321—325; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
34. Descamps-Latscha B., Nguyen A.-T., Golub R., Baruchel A., Debray-Sachs M., Assan R., (1984) w *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, red. Bors W., Saran M., Tait D., str. 965—968; Walter de Gruyter, Berlin.
35. Bhuyan D., Bhuyan K., (1983) w *Oxy Radicals and Their Scavenger Systems* t. 2, Cellular and Medical Aspects, red. Greenwald R.A., Cohen G., str. 343—348; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
36. Rister M., Schneider, A. Mitrenga D., (1984) w *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, red. Bors W., Saran M., Tait D., str. 951—958; Walter de Gruyter, Berlin.

37. Chiu P., Davis P., Wong K., (1983) w *Oxy Radicals and Their Scavenger Systems*, t. 2, Cellular and Medical Aspects, red. Greenwald R. A., Cohen G., str. 379—382; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
38. Sinet P. M., (1982), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **396**, 83—94.
39. Huret I. L., Delabar J. M., Martheus F., Aurias A., Nicole A., Berthier M., Tauser J., Sinet P. M., (1987), *Human Genet.*, **75**, 251—257.
40. Hassan H. M., (1984) w *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease*, red. Armstrong i in., str. 77—85; Raven Press, New York.
41. Steinman H. M., Naik V. R., Abernethy J. L., Hill R. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7326—7338.
42. Fielden E. M., Roberts P. B., Bray R. C., Lowe D. J., Mautner G. N., Rotilio G., Calabrese L., (1974), *Biochem. J.*, **139**, 49—60.
43. Richardson J. S., Thomas K. A., Rubin B. M., Richardson D. C., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1349—1353.
44. Bannister J. V., Anastasi A., Bannister W. H., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 469—472.
45. Marmocchi F., Venardi G., Bossa F., Rigo A., Rotilio G., (1978), *FEBS Lett.*, **94**, 109—111.
46. Malinowski D. P., Fridovich I., (1979), *Biochemistry*, **18**, 5055—5060.
47. Rigo A., Terenzi M., Viglino P., Calabrese L., Cocco D., Rotilio G., (1977), *Biochem. J.*, **161**, 31—35.
48. Rigo A., Viglino P., Bonari M., Cocco D., Calabrese L., Rotilio G., (1978), *Biochem. J.*, **169**, 277—286.
49. Richardson D. C., (1977) w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A., McCord J. M., Fridovich I., str. 217—223; Academic Press, New York.
50. Keele B. B. Jr, McCord J. M., Fridovich I., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2875—2880.
51. Tainer J. A., Getzoff E. D., Beem K. M., Richardson J. S., Richardson D. C., (1982), *J. Mol. Biol.*, **160**, 181—217.
52. Pantoliano M. W., Valentine J. S., Mammone R. J., Scholler D., (1982), *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1717—1723.
53. Malinowski D. P., Fridovich I., (1979), *Biochemistry*, **18**, 5909—5917.
54. Cudd A., Fridovich I., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11443—11447.
55. Borders C. L. Jr, Saunders J. E., Blech D. M., Fridovich I., (1985), *Biochem. J.*, **230**, 771—776.
56. Tainer J. A., Getzoff E. D., Richardson J. S., Richardson D. C., (1983), *Nature*, **306**, 284—287.
57. Getzoff E. D., Tainer J. A., Weiner P. K., Kollman P. A., Richardson J. S., Richardson D. C., (1983), *Nature*, **306**, 287—290.
58. Barra D., Martini F., Bannister J. V., Shinina M. E., Rotilio G., Bannister W. H., Bossa F., (1980), *FEBS Lett.*, **120**, 53-56.
59. Lerch K., Ammer D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11545—11551.
60. Herring K., Kim S.-M. A., Michelson A. M., Otting F., Puget K., Steffens G. J., Flohe L., (1985), *Biol. Chem., Hoppe-Seyler*, **366**, 435—445.
61. Rocha H. A., Bannister W. H., Bannister J. V., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **145**, 477—484.
62. Lerch K., Schenk E., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9559—9566.
63. Johansen J. T., Overballe-Petersen C., Martin B., Hasemann V., Svendsen I., (1979), *Carlsberg Res. Commun.*, **44**, 201—217.
64. Lee Y. M., Friedman D. J., Ayala F. J., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 824—828.
65. Steffens G.-J., Bannister J. V., Bannister W. H., Flohe L., Gunzler W. A., Kim S.-M. A., Otting F., (1983), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 675—690.
66. Marmocchi F., Argese E., Rigo A., Mavelli I., Rossi L., Rotilio G., (1983), *Mol. Cell Biochem.*, **51**, 161—164.

67. Pohl F. M. (1980) w *Protein Folding*, red. Jaenicke R., str. 183—196; Elsevier/North Holland, Amsterdam.
68. Harris J. I., Auffrat A. D., Northrop F. D., Walker J. E., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **106**, 297—303.
69. Barra D., Shinina M. E., Bossa F., Bannister J. V., (1985), *FEBS Lett.*, **179**, 329—331.
70. Steinman H. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8708—8720.
71. Brock C. J., Walker J. E., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2873—2882.
72. Ditlow C., Johansen J. T., Martin B. M., Ivendsen I. B., (1982), *Carlsberg Res. Commun.*, **47**, 81—91.
73. Barra D., Schinina M. E., Simmaco M., Bannister J. V., Bannister W. H., Rotilio G., Bossa F., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12595—12601.
74. Schinina M. E., Maffey L., Barra D., Bossa F., Puget K., Michelson A. M., (1987), *FEBS Lett.*, **221**, 87—90.
75. Barra D., Schinina M. E., Bannister W. H., Bannister W. H., Bossa F., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1001—1009.
76. Stallings W. C., Powers T. B., Pattridge K. A., Fee J. A., Ludwig M. L., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3884—3888.
77. Ringe D., Petsko G. A., Yamakura F., Suzuki K., Ohmori D., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3879—3883.
78. Yamakura F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 280—294.
79. McLachlan A. D., (1977), *Int. J. Quantum Chem.*, **12**, suppl. 1, 371—385.
80. Walker J. E., Auffrat A. D., Brock C. J., Steinman H. M., (1980) w *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase*, red. Bannister J. V., Hill H. A. O., str. 212—222; Elsevier North/Holland, New York.
81. Stallings W., Bull C. H., Pattridge K. A., Powers T. B., Fee J. A., Ludwig M. L., Ringe D., Petsko G. A., (1984) w *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, red. Bors W., Saran M., Tait D., str. 779—792; Walter de Gruyter, Berlin.
82. Stallings W. C., Pattridge K. A., Strong R. K., Ludwig M. L., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 10695—10699.
83. Fee J. A., McClune G. J., Less A. C., Zidovetski R., Pecht I., (1981), *Israel J. Chem.*, **21**, 54—58.
84. Stallings W. C., Pattridge K. A., Strong R. K., Ludwig M. L., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 16424—16432.
85. Yamakura F., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 635—641.
86. Sato S., Nakasawa K., (1978), *J. Biochem.*, **83**, 1165—1171.
87. Czapski G., (1971), *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **22**, 171—208.
88. Klug D., Rabani J., Fridovich I., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4839—4842.
89. Pick M., Rabani J., Yost F., Fridovich I., (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7329—7333.
90. Lavelle F., McAdam M. E., Fielden E. M., Roberts P. B., Puget K., Michelson A. M. (1977), *Biochem. J.*, **161**, 3—11.
91. McAdam M. E., Fox R. A., Lavelle F., Fielden E. M., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 71—79.
92. Barrette W. C. Jr, Sawyer D. T., Fee J. A., Asada K., (1983), *Biochemistry*, **22**, 624—627.
93. Fee J. A., McClune G. J., O'Neill P., Fielden E. M., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 377—384.
94. Terech A., Pucheault J., Ferradini Ch., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113**, 114—120.
95. Eigen M., Hammes G. G., (1963), *Adv. Enzymol.*, **25**, 1—38.
96. Fee J. A., Bull C., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 13000—13005.
97. Kwiatowski J., Kaniuga Z., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **874**, 99—115.
98. McAdam M. E., Fielden E. M., Lavelle F., Calabrese L., Cocco D., Rotilio G., (1977), *Biochem. J.*, **167**, 271—274.

99. Lawrence G.D., Sawyer D.T., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3045—3050.
100. Morpurgo L., Giovagnoli C., Rotilio G., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 204—210.
101. Boden N., Holmes M.C., Knowles P.F., (1979), *Biochem. J.*, **177**, 303—309.
102. Beem K.M., Richardson D.C., Rajagoplan K.V., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1930—1936.
103. Martin R.B., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4346—4347.
104. O'Neil P., Fielden E.M., Cocco D., Calabrese L., Rotilio G., (1983) w *Oxy Radicals and Their Scavenger Systems*, t. 1, Molecular Aspects, red. Cohen G., Greenwald R.A., str. 316-319; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
105. Pantoliano M.W., Valentine J.S., Burger A.R., Lippard S.J., (1982), *J. Inorg. Biochem.*, **17**, 325—341.
106. Osman R., Bash H., (1983) w *Oxy Radicals and Their Scavenger Systems*, t. 1, Molecular Aspects, red. Cohen G., Greenwald R.A., str. 187—192; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
107. McAdam M.E., Lavelle F., Fox R.A., Fielden E.M., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 81—87.
108. Villafranca J.J., Yost J.F. Jr, Fridovich I., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3532—3536.
109. Villafranca J.J., (1976), *FEBS Lett.*, **62**, 230—232.
110. Lynch R.E., Cole B.C., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 98—105.
111. McCord J.M., Keele B.B. Jr, Fridovich I., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1024—1027.
112. Fairfield A.S., Meschnick S.R., Eaton J.W., (1982), *Science*, **221**, 764—766.
113. Archibald F.S., Fridovich I., (1981), *J. Bacteriol.*, **145**, 442—451.
114. Asada K., Kanematsu S., Okaka E., Hayakawa T., (1980) w *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase*, red. Bannister J.V., Hill H.A.O., str. 136—153; Elsevier North/Holland, New York.
115. May B.P., Dennis P.P., (1987), *J. Bacteriol.* **169**, 1417—1422.
116. Asada K., Yoshikawa K., Takahashi M., Maeda Y., Enmanji K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2801—2807.
117. Lumsden J., Cammack R., Hall D.O., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **438**, 380—392.
118. Cséke C., Horváth L.I., Simon P., Borbély G., Keszthely L., Farkas G.L., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 1397—1404.
119. McCord J.M. (1979) w *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, red. Rattazzi M., Scandalios J.G., Whitt G.S., t. 3, str. 1—21; Liss, New York.
120. Puget K., Michelson A.M., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 830—838.
121. Britton L., Malinowski D.P., Fridovich I., (1978), *J. Bacteriol.*, **134**, 229—236.
122. Asada K., Kanematsu S., Uchida K., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 243—256.
123. Lumsden J., Hall D.O., (1975), *Nature*, **257**, 670—672.
124. Kanematsu S., Asada K., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 535—545.
125. Le Trant N., Meshnick S.R., Kitchener K., Eaton J.W., Cerami A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 125—130.
126. Salin M.L., Bridges S.M., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 369—374.
127. Salin M.L., Bridges S.M., (1982), *Plant Physiol.*, **69**, 161—165.
128. Duke M.V., Salin M.L., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**, 305—314.
129. Kwiatowski J., Safianowska A., Kaniuga Z., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **146**, 459—466.
130. Salin M.L., Bridges S.M., (1980), *Z. Pflanzenphysiol.*, **99**, 37—45.
131. Hassan H.M., Fridovich I., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7667—7672.
132. Ravindranath S.D., Fridovich I., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6107—6112.
133. Arron G.P., Henry L., Palmer J.M., Hall D.O., (1976), *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 618—620.
134. Baum J.A., Scandalios J.G., (1979), *Differentiation*, **13**, 133—140.

135. Jackson C., Dench J., Moore A. L., Halliwell B., Foyer C. H., Hall D. O., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 339—344.
136. Foster J. G., Edwards G. E., (1980), *Plant Cell Physiol.*, **21**, 895—906.
137. Weisiger R. A., Fridovich I., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3582—3592.
138. McCord J. M., Boyle J. A., Day E. D., Rizzolo L. J., Salin M. L., (1977) w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A., McCord J. M., Fridovich I., str. 129—138; Academic Press, New York.
139. del Rio L. A., Lyon D. S., Olah I., Glick B., Salin M. L., (1983), *Planta*, **158**, 216—244.
140. Hayakawa T., Kanematsu S., Asada K., (1985), *Planta*, **166**, 111—116.
141. Steinman H. M., Hill R. L., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3725—3729.
142. Fridovich I., (1974), *Life Sci.*, **14**, 819—826.
143. Meier B., Barra D., Bossa F., Calabrese L., Rotilio G., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 13977—13980.
144. Beaman B. L., Scates S. M., Moring S. E., Deem R., Misra H. P., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 91—96.
145. Gregory E. M., Dapper C. H., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **220**, 293—300.
146. Gregory E. M., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 83—89.
147. Pennington C. D., Gregory E. M., (1986), *J. Bacteriol.*, **166**, 528—532.
148. Martin M. E., Byers B. R., Olson M. O. J., Salin M. L., Arceneaux J. E. L., Tolbert C., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9361—9367.
149. Vance P. G., Keele B. B., Rajagoplan K. V., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4782—4786.
150. Martin J. P. Jr, Fridovich I., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6080—6089.
151. Steinman H. M., (1983) w *Oxy Radicals and Their Scavenger Systems*, t. 1, *Molecular Aspects*, red. Cohen G., Greenvald R. A., str. 167—179, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
152. Bannister J. V., Parker M. W., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 149—152.
153. Kwiatowski J., (1987) w *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, red. Ratazzi M., Scandalios J. G., Whitt G. S., t. 15, str. 121—139, Liss, New York.
154. Steinman H. M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10283—10293.
155. Steinman H. M., (1985), *J. Bacteriol.*, **162**, 1255—1260.
156. Leunissen J. A. M., de Jong W. W., (1986), *J. Mol. Evol.*, **23**, 250—258.
157. Ochiai E.-I., (1983), *Biosystems*, **16**, 81—86.
158. Henry L. E. A., Hall D. O., (1977), *Plant Cell Physiol. Special Issue. Photosynthetic Organelles*, 377—382.
159. Stewart K. D., Mattox K. R., (1975), *Bot. Rev.*, **41**, 104—135.
160. Asada K., Kanematsu S. (1978) w *Evolution of Protein Molecules*, red. Matsubara H., Yamanaka T., str. 361—372; Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
161. Maral J., Puget K., Michelson A. M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1525—1535.
162. Mazeaud F., Maral J., Michelson A. M., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 1161—1168.
163. Bridges S. M., Salin M. L., (1981), *Plant Physiol.*, **68**, 275—278.
164. Rabinovich H., Fridovich I., (1983), *Photochem. Photobiol.*, **37**, 679—690.
165. Giannopolitis C. N., Ries S. K., (1977), *Plant Physiol* **59**, 309—314.
166. Berkner L. C., Marshall L. C., (1965), *J. Atmos. Sci.*, **22**, 225—261.
167. Margulis L., (1970) w *Origin of Eucariotic Cells*, Yale University Press, New Haven.
168. Doolittle W. F., (1980), *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 146—151.
169. Gray M. W., Doolittle W. F., (1982), *Microbiol. Rev.*, **46**, 1—42.
170. Wheatley J. M., Wheatley F. R., (1984) w *Encyclopedia of plant Physiology New Series*, t. 17, str. 18—58, Springer Verlag, Berlin.
171. Place N. R., Olsen G. J., Woese C. R., (1986), *Cell*, **45**, 325—326.
172. Towe K. M., (1985), *Origins Life*, **15**, 235—250.

141. ...
 142. ...
 143. ...
 144. ...
 145. ...
 146. ...
 147. ...
 148. ...
 149. ...
 150. ...
 151. ...
 152. ...
 153. ...
 154. ...
 155. ...
 156. ...
 157. ...
 158. ...
 159. ...
 160. ...
 161. ...
 162. ...
 163. ...
 164. ...
 165. ...
 166. ...
 167. ...
 168. ...
 169. ...
 170. ...
 171. ...
 172. ...
 173. ...
 174. ...
 175. ...
 176. ...
 177. ...
 178. ...
 179. ...
 180. ...
 181. ...
 182. ...
 183. ...
 184. ...
 185. ...
 186. ...
 187. ...
 188. ...
 189. ...
 190. ...
 191. ...
 192. ...
 193. ...
 194. ...
 195. ...
 196. ...
 197. ...
 198. ...
 199. ...
 200. ...

PAWEŁ LIPIŃSKI,*
TADEUSZ ZAGULSKI**

Ferytyna w metabolizmie jonów żelaza

Ferritin in iron ions metabolism

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Biosynteza ferytyny
- III. Przyłączanie i uwalnianie jonów żelaza
- IV. Biodegradacja ferytyny
- V. Biologiczna rola ferytyn tkankowych
 - V-1. Magazynowanie żelaza
 - V-2. Ferytyna w wewnątrzkomórkowym transporcie jonów żelaza
 - V-3. Regulacyjna rola ferytyny w absorpcji jonów żelaza
 - V-4. Ferytyna a toksyczność wolnych jonów żelaza
- VI. Ferytyna surowicy
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Ferritin biosynthesis
- III. Iron ions uptake and release
- IV. Ferritin biodegradation
- V. Biological role of tissue ferritins
 - V-1. Iron storage
 - V-2. Ferritin in intracellular iron ions transport
 - V-3. Regulatory role of ferritin in iron ions absorption
 - V-4. Ferritin and free iron ions toxicity
- VI. Serum ferritin
- VII. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Tf — transferyna TfR — receptor transferyny USS — układ siateczko-wo-śródbłonkowy

I. Wstęp

Reaktywność jonów żelaza leży u biologicznych podstaw życia każdej komórki, ale jednocześnie jest jedną z przyczyn jej biologicznej degradacji. Powstałe w toku ewolucji białka wiążące żelazo zapewniają organizmom żywym

* mgr, ** dr Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN Jastrzębiec 05-551 Mroków

sprawnym przebiegiem wielu procesów metabolicznych, stanowią także ochronę przed toksycznym działaniem wolnych jonów żelaza. Ferytyna jest jednym z kluczowych białek metabolizmu jonów żelaza, występującym u eukariontów we wszystkich niemal komórkach [1, 2] i płynach ustrojowych [3–6]. Wszegobeczność ferytyny w organizmie, oraz zdolność przyłączania przez jedną jej cząsteczkę średnio 2000 atomów żelaza [7] determinują jej główną funkcję biologiczną — wiązanie nadmiaru jonów żelaza w komórce.

Cząsteczka ferytyny jest zbudowana z kulistej otoczki białkowej — apoferytyny, we wnętrzu której znajdują się atomy żelaza [2, 8]. Są one komponentem polimeru uwodnionego tlenku żelazowego, który wraz z resztami fosforanowymi tworzy tzw. mineralny rdzeń ferytyny, o składzie określonym hipotetycznym wzorem: $(\text{FeOOH})_8(\text{FeOPO}_3\text{H}_2)_9$ [9]. Apoferytyna zbudowana jest z 24 symetrycznie ułożonych, polipeptydowych podjednostek dwóch rodzajów: tzw. podjednostek ciężkich, H, (ang. heavy) i podjednostek lekkich, L, (ang. light), o masach cząsteczkowych 21000 i 19000 [1]. W strukturze przestrzennej apoferytyny wyróżniono kanaliki hydrofobowe i hydrofilne, które przebiegają wzdłuż jej osi symetrii, i którymi odbywa się dwukierunkowy transport jonów żelaza [2, 10].

Zmienne ilościowo proporcje podjednostek H i L w cząsteczkach ferytyn występujących w jednej nawet tkance [11] stanowią o dużej ich heterogenności. Fizjologiczne znaczenie heterogenności ferytyny w metabolizmie komórkowym jest jednym z głównych aspektów badań tego białka.

Intensywnie badana jak również stosunkowo mało poznana w porównaniu z ferytynami tkankowymi, jest biologiczna rola ferytyny surowicy krwi. Przypuszcza się, że ferytyna surowicy krwi ma duże znaczenie regulacyjne w metabolizmie jonów żelaza [8]. Dyskutowana jest rola ferytyny surowicy krwi jako markera w niektórych chorobach nowotworowych [12, 13], a także jako mediatora stanu zapalnego [14].

II. Biosynteza ferytyny

Głównym miejscem syntezy ferytyny w komórce są wolne polirybosomy, oraz w mniejszym stopniu rybosomy związane z błoną retikulum endoplazmatycznego [15]. Białko syntetyzowane jest w formie apoferytyny, do której następnie przyłączane są jony żelaza. Mechanizm integracji podjednostek H i L w cząsteczkę apoferytyny nie został dotychczas poznany.

Przez długi czas utrzymywał się pogląd, że polipeptydy H i L są syntetyzowane na wspólnej matrycy mRNA, a następnie różnicują się pod wpływem modyfikacji, takich jak glikozylacja [16, 17] i częściowa proteoliza [18]. Wyniki badań translacji mRNA z komórek HeLa (prawie wyłącznie podjednostki H), oraz z hepatocytów szczura (dominacja podjednostek L) w lizatach kiełków pszenicy wykazały, że podjednostki H i L są syntetyzowane na odrębnych

matrycach mRNA [19]. Wyniki te potwierdzono w trakcie badań syntezy podjednostek H i L w komórkach limfoidalnych i komórkach wątroby u człowieka [20—22].

Wyizolowanie komplementarnych DNA polipeptydów H i L człowieka i szczura, pozwoliło wysnuć wniosek, że podjednostki apoferytyny są zakodowane przez odrębne, należące do różnych rodzin geny [20—23]. W genomie człowieka [24, 25] i szczura [26] występuje około kilkunastu kopii genów podjednostek H i L, lecz tylko pojedyncze kopie ulegają ekspresji; pozostałe są uważane za pseudogeny. U człowieka geny determinujące budowę podjednostek H i L zlokalizowano odpowiednio na chromosomach 11 [22] i 19 [27].

Już od ponad 40 lat wiadomo, że synteza apoferytyny pozostaje pod kontrolą jonów żelaza [28]. *In vivo* i *in vitro*, w wielu komórkach zwierząt różnych gatunków stwierdzono istotny wpływ jonów żelaza na syntezę apoferytyny [15, 29, 30]. Stymulacja syntezy apoferytyny przez jony żelaza w komórkach wątroby szczura [29, 31] i retikulocytach kijanki żaby amerykańskiej [32] miała charakter swoisty, gdyż jednocześnie nie stwierdzono w tych komórkach zwiększonej syntezy innych białek. Mechanizm oddziaływania jonów żelaza na syntezę apoferytyny nie został dotychczas wystarczająco poznany. Wiele przemawia za kontrolą na posttranskrypcyjnym etapie syntezy białka. Aktynomycyna D, inhibitor transkrypcji genów, nie znosi stymulacji syntezy apoferytyny przez jony żelaza, w wątrobie szczurów [29, 33], komórkach linii erytroleukemicznych K562 i HEL [34], oraz w komórkach HeLa [35], chociaż w komórkach HeLa obciążonych żelazem stwierdzono także kontrolę na poziomie transkrypcji [36]. Przypuszczalnym etapem, na którym jony żelaza regulują syntezę apoferytyny jest translacja [21, 29, 37, 38]. Stwierdzono, że wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów żelaza uaktywnia wolne cząsteczki apoferytynowego mRNA i przyspiesza ich przesunięcie z cytoplazmy na polirybosomy [29, 30]. Przy niedoborze zaś jonów żelaza w komórce, mRNA podjednostek H i L nie ulega translacji [21, 29].

Wewnątrzkomórkowy poziom jonów żelaza reguluje ekspresja błonowego receptora transferyny (TfR) [40]. W wielu doświadczeniach *in vitro* stwierdzono ścisłą, odwrotną zależność między syntezą apoferytyny, a ekspresją TfR [41—45]. Zjawisko to polega przypuszczalnie na hamowaniu przez jony żelaza transkrypcji genu TfR [46] i stymulacji przez nie translacji mRNA apoferytyny. Zwiększenie ekspresji TfR obserwowano w komórkach rozpoczynających cykl podziałowy [47]. Z kolei w komórkach różnicujących się odnotowano zanik TfR [48, 49]. W hodowli monocytów krwi obwodowej, w miarę ich różnicowania się do makrofagów, wzrastał stopniowo wewnątrzkomórkowy poziom ferytyny [45]. W hodowlach komórek leukemicznych HL60, różnicujących się do granulocytów lub makrofagów, stwierdzono zanik TfR i jednocześnie wzrost wewnątrzkomórkowej zawartości ferytyny [41, 50]. Przypuszcza się, że regulacja syntezy apoferytyny i TfR może stanowić istotny element w kontroli wzrostu i różnicowania się komórek.

III. Przyłączanie i uwalnianie jonów żelaza

Badania mechanizmu i kinetyki przyłączania jonów żelaza do apoferytyny przeprowadzano najczęściej przy użyciu apoferytyny uzyskanej z ferytyny śledziny końskiej, w drastycznych warunkach działania kwasu tioglikolowego. Rzeczywisty przebieg procesu przyłączania jonów żelaza do natywnej apoferytyny w komórkach jest trudny do ustalenia, a jego przypuszczalna wersja przedstawia się następująco:

Substratami w procesie rekonstrukcji ferytyny są apoferytyna i jony Fe^{2+} [51—53]. Przyłączanie jonów Fe^{3+} do apoferytyny odbywa się znacznie wolniej i w znacznie mniejszym zakresie, niż przyłączanie jonów Fe^{2+} [54]. Proces ten przebiega w tzw. centrach aktywnych, których usytuowanie w strukturze przestrzennej apoferytyny jest przedmiotem sprzecznych doniesień [51—53, 55, 56]. Pod względem chemicznym centra aktywne są skupiskami grup karboksylowych [51, 55]. Ich modyfikacja powodowała znaczne obniżenie tempa przyłączania jonów Fe^{2+} do apoferytyny [57]. Związane jony Fe^{2+} są następnie utleniane do jonów Fe^{3+} przy udziale apoferytyny jako katalizatora. Proces ten wymaga obecności tlenu cząsteczkowego, chociaż jego atomy nie są włączone w tworzący się wewnątrz apoferytyny polimer tlenku żelazowego [59]. Z centrów aktywnych jony Fe^{3+} migrują przez kanaliki do miejsc ich wiązania na wewnętrznej powierzchni otoczki białkowej [51, 52], gdzie ulegają hydrolizie, a następnie polimeryzują za pośrednictwem mostków tlenowych [60]. Jeśli centra aktywne znajdują się, jak sądzą niektórzy autorzy, na wewnętrznej powierzchni otoczki białkowej, to pełnią one jednocześnie funkcję miejsc wiązania jonów Fe^{2+} , ich utleniania, a następnie hydrolizy i polimeryzacji [55, 56]. Pierwsze związane wewnątrz apoferytyny jony Fe^{3+} mają kluczowe znaczenie w powstawaniu mineralnego rdzenia ferytyny. Przyłączenie kolejnych atomów żelaza odbywa się zarówno w miejscach znajdujących się na powierzchni (wewnętrznej lub zewnętrznej) apoferytyny, jak i bezpośrednio na powierzchni polimeru tlenku żelazowego [10, 51, 55].

W celu potwierdzenia utleniających właściwości apoferytyny, inkubowano ją z jonami Fe^{2+} i transferyną, i stwierdzono, że co najmniej 80% utlenionego przez apoferytynę żelaza w postaci jonów Fe^{3+} wiązała transferyna [53]. Ferytyny o różnym wysyceniu jonami żelaza wykazują te same właściwości utleniające co apoferytyna. Zdolność apoferytyny do utleniania jonów Fe^{2+} , które następnie mogą być związane jako jony Fe^{3+} przez transferynę przemawia za sklasyfikowaniem apoferytyny jako ferroksoydazy — Fe(II):O_2 oksydoreduktazy. Ponieważ jony żelaza utlenione przez apoferytynę mogą być łatwo związane przez transferynę przypuszcza się, że proces ten zachodzi na zewnętrznej powierzchni apoferytyny. Trudno bowiem zakładać, aby tak duża cząsteczka, jak transferyna, mogła penetrować do wnętrza ferytyny przez kanaliki o średnicy 0,9—1,2 nm [2, 10]. Potwierdzają to badania przeprowadzone przy pomocy promieni X i ultrafioletu, dzięki którym odkryto na powierzchni apoferytyny miejsca, do których mogą być przyłączone jony żelaza [55, 56]. Przypuszcza się, że miejsca te

stanowią o puli jonów Fe^{3+} luźno związanych z apoferytyną, będących efektem jej oksydacyjnej aktywności.

Podobnie jak w przypadku przyłączania, również uwalnianie jonów żelaza z ferytyny odbywa się za pośrednictwem reakcji oksydoredukcyjnych. Chociaż niemal pewnym wydaje się, że redukcja jonów Fe^{3+} do jonów Fe^{2+} jest wstępnym etapem ich uwalniania [61], to jednak miejsce tej reakcji w strukturze przestrzennej białka nie zostało określone. Stopień wysycenia ferytyny jonami żelaza wpływa na tempo ich uwalniania [62, 63]. W ściśle określonych warunkach *in vitro* frakcja białka o 30—50% wysyceniu jonami żelaza uwalnia je najłatwiej i najszybciej [8]. Wiele związków może redukować żelazo ferytyny *in vitro* [64—66]. Identyfikacja fizjologicznych reduktorów następuje jednak niemałych trudności. Sugeruje się, że mogą nimi być cysteina, kwas askorbinowy i zredukowany glutation; stężenie ich w komórce jest jednak zbyt małe, aby rzeczywiście mogły pełnić tę funkcję *in vivo* [64]. W warunkach fizjologicznych w redukcji żelaza ferytyny uczestniczą, prawdopodobnie, zredukowane enzymy flawinowe, a właściwie ich koenzymy [68]. Stwierdzono, że w różnych narządach zwierząt wysokiemu wysyceniu ferytyny jonami żelaza towarzyszy niski poziom NAD-FMN-oksydoreduktaz [67]. Zastanawiając się nad tym, jakie związki mogą redukować żelazo ferytyny, należy brać pod uwagę rozmiary ich cząsteczek (a tym samym zdolność penetracji przez kanaliki i możliwość dotarcia do wnętrza apoferytyny), a także ich potencjał redukcyjny, który w przypadku żelaza ferytyny wynosi 230 mV przy pH 7,0 [68].

Po uwolnieniu z ferytyny, jony Fe^{2+} są chelatowane przez niskocząsteczkowe związki, z którymi tworzą kompleksy tzw. labilnego żelaza. Natura tych związków nie jest dokładnie znana; np. z erytrocytów wyizolowano kompleksy chelatowe żelaza z nukleotydami [69, 70], natomiast w komórkach wątroby, przypuszcza się, że żelazo tworzy związki chelatowe z ADP [71] i cytrynianem [72].

IV. Biodegradacja ferytyny

Okres półtrwania ferytyny w komórce wynosi 50—70 godzin [73, 74]. Izoferytyny o przewodzie podjednostek H szybciej ulegają degradacji niż izoferytyny bogate w podjednostki L [2, 7]. Sugestia, że wzrastająca ilość żelaza odkładanego w cząsteczce ferytyny ma decydujący wpływ na przyspieszenie jej biologicznego rozpadu nie wszędzie znajdują potwierdzenie. Na przykład ferytyny o dużej zawartości żelaza są bardziej niż apoferytyna odporne *in vitro* na proteolityczne działanie enzymów [75]. Usuwanie żelaza z ferytyn komórkowych przy pomocy deferoksaminy wpływa na zmniejszenie ich stabilności [76], chociaż w hodowli komórek K562, po dodaniu deferoksaminy, ferytyny komórkowe były bardziej stabilne niż ferytyny z komórek hodowanych bez dodatku deferoksaminy [77]. Badania mikroskopowe wykazały, że ferytyny zawierające najwięcej jonów żelaza są jako pierwsze „wychwytywane” przez

lizosomy, gdzie dokonuje się ich biologiczna degradacja [78]. W lizosomach komórek HeLa stwierdzono występowanie cząsteczek ferytyny o dużej zawartości żelaza (ponad 2000 atomów na cząsteczkę) w 6–8 godzin po ich mikroiniekcji do cytoplazmy [79]. Nie ustalono do tej pory w jaki sposób żelazo odkładane w ferytynie przyspiesza jej przemieszczanie z cytoplazmy do lizosomów. Przypuszcza się, że żelazo sprzyja polimeryzacji cząsteczek ferytyny, który to proces prowadzi do zmniejszenia jej rozpuszczalności [80], i uważany jest za decydujący etap jej degradacji [81]. U zdrowych ludzi ferytyna śledziona występuje głównie (90–94%) w postaci monomerów. U osób przeciążonych żelazem ferytyna śledziona tworzy liczne dimery, trimery, a nawet wyższe oligomery [82]. W lizosomach przy niskim pH ferytyna ulega częściowej denaturacji [80, 83], po czym na skutek działania enzymów lizosomalnych następuje rozpad otoczki białkowej ferytyny i częściowe odsłonięcie jej mineralnego rdzenia [80, 83, 84]. U osób przeciążonych żelazem w wyniku różnych zmian patologicznych (hemochromatozy, β -talasemii) obserwuje się intensywne odkładanie w lizosomach komórek wątroby nierozpuszczalnych kompleksów żelaza z fragmentami nadtrawionej, nieregularnej otoczki białkowej, fosforanami i tłuszczami [80, 83–85]. Kompleksy te, określone mianem hemosyderyny, uważane są za produkt biologicznego rozpadu ferytyny [83, 85]. W preparatach histologicznych wątroby i śledziona złogi hemosyderyny w lizosomach widoczne są jako charakterystyczne ziarnistości, barwiące się intensywnie na obecność żelaza [84].

V. Biologiczna rola ferytyn tkankowych

V-1. Magazynowanie żelaza

Pośród białek wiążących żelazo, a także pośród innych metaloproteidów występujących w organizmie ferytyna wyróżnia się zdolnością gromadzenia dużej liczby atomów metalu (żelaza). Sumaryczna masa 2000 atomów żelaza związanych przez cząsteczkę ferytyny stanowi około 20% jej całkowitej masy cząsteczkowej [86]. Dla porównania cząsteczka hemoglobiny może związać 4 atomy żelaza, których masa stanowi około 0,347% jej całkowitej masy cząsteczkowej [86]. Transferyna i laktoferyna mogą związać swoiście po 2 atomy żelaza [87].

U dorosłego mężczyzny ilość zapasowego żelaza zgromadzonego w ferytynie wynosi około 1 g (u kobiety o połowę mniej), co stanowi 25% ilości całkowitego żelaza w ustroju [86]. W warunkach fizjologicznych ilość żelaza zapasowego ferytyny określają: aktywność erytropoetyczna organizmu, tempo syntezy hemoglobiny w komórkach erytroblastycznych, oraz, w mniejszym stopniu, absorpcja egzogenego żelaza z przewodu pokarmowego [2].

Żelazo zgromadzone w ferytynie może być wykorzystane przez organizm w warunkach ogólnoustrojowego niedoboru tego mikroelementu do utrzymania ciągłości i tempa procesów metabolicznych związanych z biologiczną aktywność-

cią jonów żelaza. Choć ferytyna występuje we wszystkich komórkach ustroju, to jednak dla pokrycia potrzeb ogólnoustrojowych, wykorzystywane jest żelazo zgromadzone w ferytynie komórek należących do układu siateczkowo-śródbłonkowego (USŚ) w wątrobie, śledzionie, szpiku kostnym, a także żelazo zgromadzone w ferytynie komórek parenchymalnych wątroby [2, 8]. W ferytynie komórek USŚ jest odkładane żelazo uwolnione w trakcie fagocytozy i katabolizmu starzejących się erytrocytów [88]. Ferytyna komórek parenchymalnych wątroby wiąże żelazo pochodzące z białek surowicy krwi: transferyny [89], kompleksu hemoglobiny z haptoglobina [90], hemu z hemopeksyną [84] i ferytyny [91]. We wczesnych stadiach rozwoju, u płodów ludzkich [92] i mysich [93], w embrionach ptasich [94] i larwach płazów [95] główną rolę w gromadzeniu zapasów żelaza odgrywa ferytyna erytrocytów krwi obwodowej.

V-2. Ferytyna w wewnątrzkomórkowym transporcie jonów żelaza

Wewnątrzkomórkowy transport jonów żelaza po uwolnieniu ich z kompleksu Tf-TfR jest podstawowym, nierozstrzygniętym do tej pory zagadnieniem komórkowego metabolizmu żelaza. Mimo, że piśmiennictwo przytacza wiele przykładów związków transportujących jony żelaza w komórce [96—98], nie ma wśród autorów zgody, które z nich rzeczywiście mogą pełnić tę funkcję *in situ*.

Rola ferytyny — wewnątrzkomórkowego nośnika jonów żelaza jest kontrowersyjna. Z jednej strony wykazano, że synteza hemu w erytroblastach trzaski (*Triturus cristatus*) odbywa się z pominięciem żelaza zgromadzonego w ferytynie [99]. Nawet w warunkach ogólnoustrojowego niedoboru żelaza, erytroblasty trzaski reagują zmniejszoną syntezą hemu, nie naruszając żelaza związanego przez ferytynę [100]. Z drugiej strony wykazano, że jony żelaza uwolnione z ferytyny komórek wątroby szczura są inkorporowane do cząsteczek mitochondrialnych enzymów z hemową grupą prostetyczną, a także innych enzymów zawierających żelazo [101, 102]. Na mitochondriach komórek wątroby szczura znaleziono swoiste dla ferytyny receptory o zmiennej sile powinowactwa [101].

Na podstawie obserwacji metabolizmu żelaza w komórkach erytroidalnych człowieka wysunięto hipotezę, że czynne metabolicznie jest żelazo związane przez, tak zwane, kwaśne izoferytyny (ferytyny o przewodze podjednostek H, punkt izoelektryczny przy pH 4,1—4,8) [103, 104]. Kwaśne izoferytyny wiążą żelazo krótkotrwale, łatwiej je przyłączają i uwalniają w porównaniu z izoferytinami zasadowymi, o profilu L, występującymi w śledzionie [105, 106]. Żelazo kwaśnych izoferytyn staje się przez to bardziej aktywne metabolicznie, a jego obrót w komórce szybszy. Kwaśne izoferytyny dominują w komórkach wczesnych stadiów erytropoezy [103, 104], w tkance serca [107], a więc tam, gdzie tempo metabolizmu jest stosunkowo wysokie i gdzie istnieje duże zapotrzebowanie na żelazo między innymi do syntezy hemu. Być może, fizjologiczna heterogenność ferytyny, wynikająca z heterogenności strukturalnej, jest źródłem sprzecznych opinii na temat roli ferytyny w wewnątrzkomórkowym transporcie jonów żelaza.

V-3. Regulacyjna rola ferytyny w absorpcji jonów żelaza

Homeostazę żelaza w ustroju reguluje przede wszystkim absorpcja jonów żelaza z jelita cienkiego (głównie z dwunastnicy), która rośnie w stanach niedoboru i maleje w stanach przeciążenia ustroju żelazem [108, 109].

Transport jonów żelaza z jelita do krwioobiegu obejmuje zasadniczo dwie fazy: przejście jonów żelaza ze światła jelita do komórek błony śluzowej jelita i przejście przez cytosol komórek błony śluzowej jelita do krwi obwodowej [108]. Żelazo w komórkach błony śluzowej jelita związane jest głównie z transferyną i ferytyną [109]. Białka te odgrywają kluczową rolę w absorpcji jonów żelaza z przewodu pokarmowego [110, 111]. Ferytyna wiąże nadmiar jonów żelaza, które następnie są wolno wymieniane do krwi; transferyna natomiast jest cząsteczką szybko transportującą jony żelaza do krwioobiegu. Wzrost poziomu transferyny w komórkach błony śluzowej jelita jest równoznaczny ze wzrostem absorpcji jonów żelaza, natomiast wzrost poziomu ferytyny hamuje przekazywanie jonów żelaza do krwi [110]. Zależności te potwierdzono w badaniach na szczurach, którym przez krótki czas zastosowano dietę o niskiej zawartości żelaza. Krótkotrwały niedobór żelaza w diecie powodował natychmiastowy wzrost poziomu transferyny i obniżenie poziomu ferytyny w komórkach błony śluzowej jelita. Zmianom tym nie towarzyszyło uszczuplenie zapasów żelaza zgromadzonych w ferytynie komórek USŚ w wątrobie i innych organach [112].

V-4. Ferytyna a toksyczność wolnych jonów żelaza

Jony żelaza, a także ich kompleksy z niskocząsteczkowymi związkami występują w komórkach z reguły przejściowo i krótkotrwanie [69, 70, 113, 114]. Toksyczność wolnych jonów żelaza wynika przede wszystkim z ich katalitycznej aktywności w procesie generowania wolnych rodników, w tym silnie reaktywnych i niszczących rodników wodorotlenowych ($\cdot\text{OH}$) [115]. Mechanizm tego procesu i rolę jaką odgrywają w nim jony żelaza ilustruje cykl reakcji H a b e r a - - W e i s s a - F e n t o n a [87]:

- 1) $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$
- 2) $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
- 3) $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$

Białka wiążące żelazo są jedynym źródłem żelaza czynnego metabolicznie, stanowią jednocześnie ochronę przed skutkami aktywności wolnych, nie związanych jonów żelaza. Ferytyna z racji swego ogromnego potencjału wiązania jonów żelaza zajmuje wśród tych białek wyjątkową pozycję. Ferytyna wiążąc nadmiar jonów żelaza w komórce eliminuje ich toksyczność i w tym powszechnie upatruje się jej zasadniczą funkcję biologiczną. Nie polemizując z tą opinią, należy jednak stwierdzić, że w określonych warunkach *in vitro* i prawdopodobnie *in vivo*, jony żelaza pierwotnie związane z ferytyną, po ich uwolnieniu mogą generować H_2O_2 i rodniki $\cdot\text{OH}$, a tym samym mogą być odpowiedzialne za destrukcję wielu organelli komórkowych, a w konsekwencji całej komórki

[113—120]. Indukcja rodników $\cdot\text{OH}$ w obecności innych białek wiążących żelazo — laktoferyny [87, 121—124] i transferyny [87, 125] — jest kontrowersyjna i nie tak oczywista jak w przypadku ferytyny.

Uwalnianie jonów żelaza z ferytyny w dużym stopniu zależy od wewnątrzkomórkowego potencjału redukcyjnego [113, 126], który zależy z kolei od stężenia w komórce różnych związków o charakterze reduktorów (w szczególności kwasu askorbinowego [76]), a także od aktywności układów enzymatycznych zdolnych takie związki generować [127]. Wysłunięto hipotezę, że rodniki ponadtlenkowe O_2^{\pm} ze względu na łatwość z jaką docierają do wnętrza białkowej otoczki ferytyny, mogą być *in vivo* idealnymi reduktorami jonów żelaza związanych z ferytyną [114]. Jednym z najbardziej efektywnych układów enzymatycznych generujących rodniki O_2^{\pm} *in vivo* jest układ oksydazy ksantyny [128, 129]. Rodniki O_2^{\pm} są stosunkowo mało reaktywne wobec składników organicznych [130]. Ich toksyczne działanie należy raczej rozpatrywać w aspekcie ich zdolności redukcji jonów Fe^{3+} związanych z ferytyną (reakcja 1), generowania H_2O_2 (reakcja 2), a pośrednio do indukowania rodników $\cdot\text{OH}$ (reakcja 3) [115, 127]. Niszczące działanie H_2O_2 i rodników $\cdot\text{OH}$ polega na utlenianiu fosfolipidowych struktur błonowych w komórkach [115, 127]. Stymulujący wpływ żelaza ferytyny na utlenianie fosfolipidowych błon liposomów obserwowano w bydłych komórkach mózgowych [116] i w żółtku jaja [119]. Jony żelaza uwolnione z ferytyny w obecności kwasu askorbinowego współdziałają w uszkodzeniu chromosomów [131]. Przypuszcza się, że przy niskim pH w lizosomach żelazo nie może być uwalniane z ferytyny bez udziału reduktorów, i może katalizować utlenianie błon lizosomalnych, co powoduje wtórną destrukcję komórki na skutek działania enzymów lizosomalnych [119].

Uwalnianie żelaza z ferytyny jest krytycznym momentem, w którym zredukowane jony żelaza, w zależności od stanu fizjologicznego komórki mogą być skierowane do cyklu przemian metabolicznych, lub mogą być źródłem patologicznych zmian prowadzących do destrukcji komórki.

VI. Ferytyna surowicy

W 1985 roku Międzynarodowy Komitet Standaryzacji w Hematologii zaproponował standard ferytyny obowiązujący przy oznaczaniu poziomu tego białka w surowicy krwi [132]. Pozwala to ujednoczyć wyniki oznaczeń, których dokonywano do tej pory przy zastosowaniu różnych standardów izoferytyn, o różnym profilu immunologicznym.

Stężenie ferytyny w surowicy krwi dorosłych ludzi waha się w granicach od 12 do 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, wzrasta z wiekiem, jest wyższe u mężczyzn niż u kobiet [133]. U ludzi i zwierząt znaleziono ścisłą zależność między poziomem ferytyny w surowicy, a ilością żelaza zgromadzonego w ferytynie komórek USŚ i ferytynie hepatocytów [133, 134]. Zależność ta jest na tyle ścisła, że oznaczanie stężenia ferytyny w surowicy służy do diagnozowania stanów niedoboru i przeciążenia

organizmu żelazem [134]. W wielu przypadkach jest to wskaźnik bardziej skuteczny niż powszechnie dotąd stosowane wysycenie transferyny jonami żelaza, oraz całkowita pojemność surowicy krwi dla jonów żelaza, gdyż przy jego pomocy można również wykryć stany tzw. ukrytego niedoboru żelaza. Mechanizm regulujący poziom ferrytyny w surowicy zlokalizowany jest w komórkach wątroby [135].

Pod wieloma względami ferrytyna surowicy różni się od ferrytyn tkankowych. W niewielkim stopniu jest wysycona jonami żelaza [136, 137], zawiera ponadto część cukrową [106, 138]. Konkanawalina A przyłącza około 70% ferrytyn surowicy krwi i zaledwie 10% ferrytyn tkankowych [138]. Badania biochemiczne wykazały, że ferrytyny surowicy, które przyłączają się do konkanawaliny A zawierają trzeci rodzaj podjednostki — glikozylowaną podjednostkę G [106]. Ostatnio wykazano, że podjednostka G rozpoznawana jest przez przeciwciała wytworzone przeciw podjednostce L ferrytyny [139]. Najbardziej widocznym, choć o nie wyjaśnionym dla organizmu znaczeniu, efektem różnic w budowie ferrytyny surowicy i ferrytyn tkankowych jest tempo ich wychwytywania z surowicy. Okres półtrwania w surowicy ferrytyn izolowanych z różnych narządów człowieka [140], szczura [141], psa [142], po ich dożylnym podaniu osobnikom odpowiednich gatunków nie przekracza 30 min., a średnio wynosi 10 min. Ferrytyny, izolowane z surowicy człowieka oraz szczura, po ich dożylnym wstrzyknięciu odpowiednio ludziom i szczurom wychwytywane są w tempie nieporównywalnie wolniejszym; okres półtrwania 30—50 godz. [141, 143].

Ferrytyna uwalniana jest do krwi przez komórki USS [142, 144] i monocyty [145], usuwana jest natomiast przez komórki perenchymalne wątroby [91, 142, 146]. Na hepatocytach szczurów wykryto swoisty dla ferrytyny receptor, odpowiedzialny za wychwytywanie tkankowych ferrytyn podanych dożylnie [91]. Ferrytyna surowicy traktowana lizosomalnymi glikozydazami jest przyłączana przez receptor znacznie silniej niż natywna ferrytyna surowicy [91].

W 1985 roku na podstawie szczegółowej analizy sedymentacji ferrytyny surowicy w gradiencie gęstości sacharozy, wysunięto dość śmiałą i zaskakującą hipotezę, że ferrytyna surowicy jest bogata w żelazo, i jako taka może pełnić obok transferyny funkcję nośnika jonów żelaza do wszystkich komórek organizmu [147]. Dla poparcia swojej tezy autorzy zwracają uwagę na to, że receptory ferrytyny znaleziono na retikulocytach [148], hepatocytach [91], makrofagach [149], limfocytach T [150], i w łożysku [151].

VII. Uwagi końcowe

W piśmiennictwie pierwsza wzmianka o ferrytynie pochodzi z 1937 roku [152]. W ciągu 50 lat pogląd na główną biologiczną rolę ferrytyny nie uległ zmianie, ale liczne badania ujawniły szereg nowych funkcji ferrytyny w organizmie, często nie związanych z metabolizmem jonów żelaza. Do takich należy między innymi, intensywnie badana, rola ferrytyny w regulacji hemopoezy [153].

Wydaje się, że ferrytyna pozostając przede wszystkim białkiem metabolizmu żelaza, ma oprócz tego bardziej uniwersalne znaczenie w ustroju. Można sądzić, że nad tym zagadnieniem skupią się przyszłe badania.

Artykuł otrzymano 1 grudnia 1987 r.

Zaakceptowano do druku 17 czerwca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Clegg C.A., Fitton J.E., Harrison P.M., (1980), *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **36**, 56—86.
2. Crichton R.R., Charlotheaux-Wauters M., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **164**, 485—506.
3. Birgegard G., (1980), *Clin. Chim. Acta*, **103**, 277—285.
4. Fehling C., Qvist I., (1985), *Acta Neurol. Scand.*, **71**, 510—512.
5. Zuyderhoudt F.M.J., Vos F., Jorning G.G.A., van Gool J., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **838**, 381—386.
6. Klockers M., Weber T., Tanner P., Hellstrom P.E., Petterson T., (1985), *J. Clin. Pathol.*, **38**, 818—824.
7. Crichton R.R., (1982), *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **24**, 49—53.
8. Jacobs A., (1985), w: *Current Topics in Hematology*, 5, 25—62. Alan R. Liss, Inc.
9. Pongor S., Ulrich P.C., Bencsath F.A., Cerami A., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2684—2688.
10. Ford G.C., Harrison P.M., Rice P.W., Smith J.M.A., Treffry A., White J.L., Yariv J., (1984), *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **304**, 551—565.
11. Arosio P., Adelman T.G., Drysdale J.W., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4451—4458.
12. Jones B.M., Worwood M., Jacobs A., (1980), *Clin. Chim. Acta.*, **166**, 203—214.
13. Zavagno G., Nitti D., Marchet A., Moshit N., Belluco G., De Marchi F., Serafini F., Lise M., (1987), *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **23**, 1077—1078.
14. Rubin C., Wood P.J., Archer T., Rowe D.J.F., (1984), *Ann. Clin. Biochem.*, **21**, 290—294.
15. Bomford A.B., Munro H.N., (1980), w: *Iron in Biochemistry and Medicine II*, str. 173—202, red. Jacobs A., Worwood M., Acad. Press, London.
16. Lavoie D.J., Marcus D.M., Ishiawa K., Listowsky I., (1977), w: *Protein of Iron Metabolism*, str. 71—78, red. Brown E.B., Aisen P., Fielding J., Crichton R.R., Grune and Stratton, New York.
17. Cinkin M.H., Knowlton M., (1977), w: *Proteins in Iron Metabolism* str. 115—120, red. Brown E., Aisen P., Fielding I., Crichton R.R., Grune and Stratton, New York.
18. Ishitani K., Niitsu Y., Listowsky I., (1975), *J. Biol. Chem.* **250**, 3142—3148.
19. Watanabe N., Drysdale J., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 507—511.
20. Jain S.K., Barret K.J., Boyd D., Farreau M.F., Crampton J., Drysdale J.W., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11762—11768.
21. Cairo G., Vezzoni P., Bardella L., Schiaffonati L., Rappociolo E., Levi S., Arosio P., Bernelli-Zazzera A., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 652—657.
22. Hantze M.W., Keim S., Papadopoulos P., O'Brian S., Modi W., Drysdale J., Leonard W.J., Harford J.B., Klausner R.D., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7226—7230.
23. Brown A.J.P., Leibold E.A., Munro H.N., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1265—1269.
24. Constanzo F., Colombo M., Staempfli S., Santoro C., Marone M., Minganti C., Cortese R., Silengo L., (1986) *Nucleic Acids Res.*, **14**, 721—735.

107. Powell L.W., Alpert E., Isselbacher K.J., Drysdale J.W., (1975), *Brit. J. Haematol.*, **30**, 47—55.
108. Rao B.S.N., (1981), *Brit. Med. Bull.* **37**, 25—30.
109. Johnson G., Jacobs P., Purves L.R., (1983), *J. Clin. Invest.* **71**, 1467—1476.
110. El-Shobaki F.A., Rummel W., (1977), *Res. Exp. Med.* **171**, 243—253.
111. Savin M.A., Cook J.D., 1980, *Blood* **56**, 1029—1035.
112. Topham R.W., Joslin S.A., Prince J.S., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 1092—1097.
113. Kozlov A.V., Shinkarenko L.T., Vladimirov Y.A., Azizova O.A., (1985), *Byull. Eksp. Biol. Med.*, **99**, 38—41.
114. Thomas C.E., Morehouse L.A., (1985), *J. Biol. Chem.* **260** 3275—3280.
115. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 501—516.
116. Gutteridge J.M.C., Halliwell B., Treffry A., Harrison P.M., Blake D., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 557—560.
117. Stake P.E., Farber J.L., (1985), *Biot. Biol. Chem.* **260**, 10099—10104.
118. Thomas C.E., Aust S.D., (1986), *J. Biol. Chem.* **261**, 13064—13070.
119. O'Connell M.J., Ward R.J., Baum H., Peters T.J., (1985), *Biochem. J.* **229**, 135—139.
120. Biemond P. van Eijk H.G., Swaak A.J.G., Koster J.F., (1984), *J. Clin. Invest.* **73**, 1576—1579.
121. Ambruso D.R., Johnston R.B., (1981), *J. Clin. Invest.* **67**, 352—360.
122. Bannister J.V., Bannister W.H., Hill M.A.O., Thornalley P.J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **715**, 116—120.
123. Winterbaurn C.C., (1981), *Biochem. J.*, **198**, 125—131.
124. Baldwin D.A., Jenny E.R., Aisen P., (1984), *J. Biol. Chem.* **259**, 13391—13394.
125. Motohasi M., Mori I., (1983), *FEBS Lett.* **157**, 197—199.
126. Vanin A.F., Kubrina L.N., Kiladze S.V., (1977), *Biofizika* **22**, 646—649.
127. Halliwell B., (1981), w Age Pigments, str. 1—62, red. Sohal R.S., Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
128. Topham R.W., Walker M.C., Calish M.P., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1240—1246.
129. Bolland B.J., Ulvik R.J., (1987), *Biochem J.*, **243**, 55—59.
130. Fridovich I., (1983), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 239—257.
131. Whiting R.F., Wei L., Stick H.F., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 1682—1636.
132. International Comitee for Standarization in Haematology Expert Panel on Iron., (1985), *Brit. J. Haematol.* **61**, 61—63.
133. Jacobs A., (1977), *Fed. Proc.*, 2024—2027.
134. Ward C., Saitman P., Ripley L., Ostrup R., Hegenauer J., Hatlen L., Christopher J., (1987), *Am. J. Clin. Nutr.*, **30**, 1054—1063.
135. Mack U., Cooksley W.G.E., Ferris R.A., Powell L.W., Halliday J.W., (1981), *Brit. J. Haematol.*, **47**, 403—412.
136. Worwood M., Dawkins S., Wagstaff M., Jacobs A., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 97—103.
137. Zuyderhault F.M.J., Lindhorst C., Hengeveld P., (1978), *Clin. Chim. Acta* **90**, 93—99.
138. Worwood M., Cragg S.T., Wagstaff M., Jacobs A., (1979), *Clin. Sci.* **56**, 83—87.
139. Santambrogio P., Cozzi A., Levi S., Arosio P., (1987), *Brit. J. Haematol.*, **65**, 235—238.
140. Cragg S.J., Covell A.M., Burch A., Owen G.M., Jacobs A., Worwood M., (1983), *Brit. J. Haematol.*, **55**, 83—92.
141. Halliday J.W., Mack U., Powell L.W., (1979), *Brit. J. Haematol.* **42**, 535—546.
142. Pollack A.L., Lipschitz D.A., Cook J.D., (1978), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **157**, 481—485.

143. Worwood M., Cragg S.J., Williams A.M., Wagstaff M., Jacobs A., (1982), *Blood*, **60**, 827—833.
144. Saaó G., Green R., Jurjus A., Sarrou E., (1986), *Scand. J. Haematol.*, **36**, 65—70.
145. Woorwood M., Hourahane P., Jones B.M., (1984), *Brit. J. Haematol.*, **56**, 31—43.
146. Mack U., Powell L.W., Haliiday J.W., (1983), *J. Biol. Chem.* **258**, 4672—4675.
147. Niitsu V., Adachi C., Takahashi F., Goto Y., Kohogo Y., Urushizaki I., Listowsky I., (1985), *Am. J. Haematol.*, **18**, 363—371.
148. Pollack S., Campana T., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1667—1672.
149. Lagunoff D., Curran D.E., (1972), *Exp. Cell Res.*, **75**, 337—346.
150. Renau-Piqueas J., Miragall S., Cervers J., (1985), *Cell. Tissue Res.*, **240**, 743—746.
151. Takami M., Mizumoto K., Kasuya I., Kino K., Ussman H.H., Tsunoo H., (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **884**, 31—38.
152. Laufberger V., (1937), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **19**, 1575—1582.
153. Broxmeyer H.E., Bognacki J., Ralph P., Dorner M.H., Lu L., Castro-Malspina H., (1982), *Blood*, **60**, 595—607.

BOGDAN SIELIWANOWICZ*

Składanie jądrowych prekursorów mRNA

Splicing of nuclear messenger RNA precursors

Spis treści

- I. Przebieg dojrzewania eukariotycznego pre-mRNA
- II. Spliceosom
 - II-1. Konserwatywne ewolucyjnie sekwencje intronów
 - II-2. Udział jądrowych RNP
 - II-3. Powstawanie struktury spliceosomu
- III. Uwagi końcowe

Contents

- I. General description of the processing of eukaryotic pre-mRNA
- II. Spliceosome
 - II-1. The evolutionary conserved sequences of introns
 - II-2. Contribution of nuclear RNP
 - II-3. Assembly of a spliceosome structure
- III. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: pre-mRNA, prekursor mRNA; hnRNA (RNP), heterogeny jądrowy RNA (rybonukleoproteid zawierający hnRNA); snRNA (RNP), niskocząsteczkowy jądrowy RNA (rybonukleoproteid zawierający snRNA).

Heterogeny jądrowy RNA (hnRNA) różni się od cytoplazmatycznych RNA znacznie większą masą cząsteczkową, wynikającą z bardziej skomplikowanego składu nukleotydowego. W roku 1978, stosując metodę hybrydyzacji i mikroskopii elektronowej stwierdzono, że jądrowy pre-mRNA β -globiny, o stałej sedymentacji 15S, zawiera sekwencje intronowe, precyzyjnie wycinane przed jego przekształceniem w cytoplazmatyczny RNA o stałej sedymentacji 10S [1]. Dzisiaj, dzięki udoskonalonym metodom hybrydyzacyjnym i zastosowaniu do badań pulsowo wyznakowanego hnRNA wiadomo, że wszystkie typy transkryptów, przepisywane z DNA przez odpowiednie polimerazy, ulegają w jądrze modyfikacjom. Najmniejszym zmianom ulegają transkrypty polimerazy III (prekursory cytoplazmatycznych tRNA), największym polimerazy II, do których

* Doc. dr hab., Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

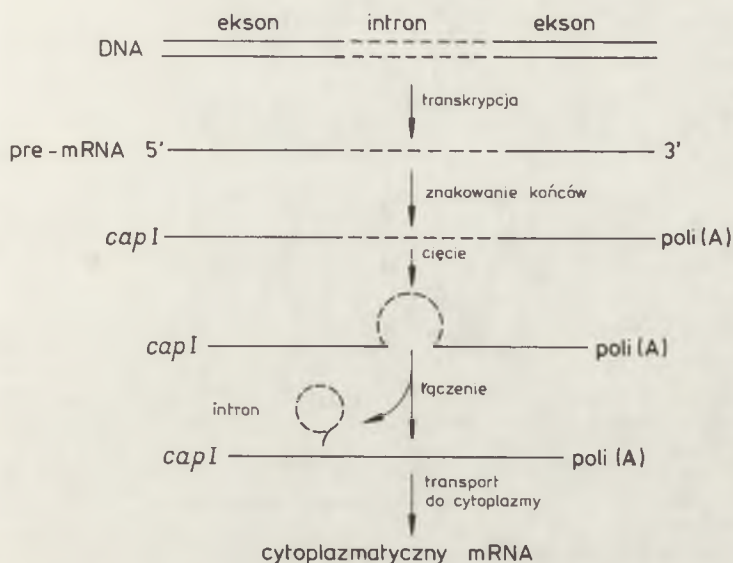
zalicza się większość pre-mRNA [2]. Niemal wszystkie zbadane dotychczas pre-mRNA są transkryptami genów nieciągłych i zawierają od kilku do kilkudziesięciu intronów o zróżnicowanej długości. Łączna ich długość przekracza na ogół kilka do kilkunastu razy długość zawierających informację strukturalną eksonów. Wyczerpujące dane porównawcze na ten temat zawiera obszerne opracowanie monograficzne [3].

Zespół zdarzeń, które zachodzą w jądrze po transkrypcji i prowadzą do przetworzenia pre-mRNA w funkcjonalne cytoplazmatyczne formy mRNA, określany jest w piśmiennictwie anglojęzycznym terminem „processing”. W piśmiennictwie polskim coraz powszechniej stosowane jest określenie „dojrzwianie”, oddające wprawdzie mało precyzyjnie znaczenie terminu angielskiego, ale doskonale opisujące istotę jądrowych przekształceń pre-mRNA. Proces ten jest uważany obecnie za drugi co do ważności etap regulacji ekspresji informacji genetycznej. O intensywności badań w tej dziedzinie najdobitniej świadczy opublikowanie kilkuset prac eksperymentalnych w ciągu niespełna dziesięciu lat. Od roku 1985 szczególne zainteresowanie badaczy wzbudza mechanizm precyzyjnego wycinania intronów z pre-mRNA, określane terminem angielskim „splicing”. W języku polskim stosowane jest najczęściej określenie „składanie”. Dominującą część znaczących prac na ten temat została wykonana w ośrodkach naukowych Cambridge, USA. Niniejszy artykuł przedstawia aktualne poglądy dotyczące tego zagadnienia.

I. Przebieg dojrzwiania eukariotycznego pre-mRNA

Na początku lat osiemdziesiątych wykazano, że dojrzwianie eukariotycznego pre-mRNA jest skomplikowanym strukturalnie, wieloetapowym procesem rozpoczynającym się jeszcze w czasie trwania transkrypcji [4, 5]. Cytologicznie powiązane jest z jądrową matriks. Ustalono, że najważniejszymi momentami tego procesu są: modyfikacje końców transkryptu, wycinanie intronów i łączenie eksonów (Ryc. 1). Dalsze przemiany strukturalne pre-mRNA mają bardziej ograniczony charakter i zachodzą w czasie transportu do cytoplazmy komórki. Dotyczą one jak się wydaje, przede wszystkim zmian długości 3'-końcowego fragmentu poliadenylowego cząsteczki.

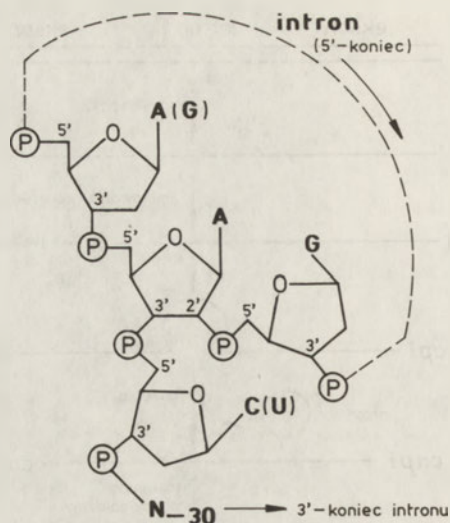
Bezpośrednio po zsyntetyzowaniu pierwszych 30—40 nukleotydów rozpoczyna się stopniowo modyfikacja 5'-końcowa pre-mRNA, prowadząca w efekcie do wytworzenia struktury cap I ($m^7Gppp^mXpYp...$). Ciąg reakcji katalizowany jest przez enzymy: fosfatazę, guanozylotransferazę i metylotransferazę. Jego bardziej szczegółowy opis przedstawia opracowanie monograficzne [6]. Po ukończeniu transkrypcji modyfikowany jest 3'—koniec cząsteczki. Reakcja polega na przyłączaniu kolejnych nukleotydów adenylowych i katalizowana jest, bez udziału matrycy, przez specyficzne polimerazy poliadenylujące. Dokładniej przebieg i znaczenie poliadenylacji dyskutowane już było na łamach Postępów Biochemii [7, 8]. Podkreślić należy, że odległość miejsca poliadenylacji od cap



Ryc. 1. Diagram procesu dojrzewania pre-mRNA. Liniją przerywaną oznaczono introny i ich transkrypty

ogranicza strukturalnie zasięg dalszych etapów przetwarzania pre-mRNA. Opisane zostały przypadki powstawania z tego samego transkryptu, w wyniku zmiany miejsca rozpoczęcia poliadenylacji, mRNA kodującego różne białka. Sytuacja taka ma miejsce w przysadce mózgowej podczas syntezy niektórych hormonów [5], oraz w limfocytach podczas syntezy ciężkiego łańcucha immunoglobulin [9].

Wycinanie intronów z pre-mRNA jest najbardziej skomplikowanym i powodującym największe zmiany struktury I-rzędowej transkryptu etapem dojrzewania pre-mRNA. Najnowsze opracowania dotyczące tego zagadnienia podkreślają uorganizowany, wieloskładnikowy, charakter następujących kolejno przemian [10]. Kompleks w którym one zachodzą nosi nazwę spliceosomu i zbudowany jest z rybonukleoprotein zawierających pre-mRNA i niskocząsteczkowy jądrowy RNA (snRNA). Budowa i powstawanie spliceosomu zostaną dokładniej omówione w dalszej części artykułu. Cechą charakterystyczną procesu usuwania intronów z pre-mRNA jest powstawanie niespotykanej gdzie indziej w kwasach nukleinowych, struktury o kształcie pętli lassa i związane z tym rozgałęzienie łańcucha RNA (Ryc. 2). W tworzeniu rozgałęzienia zaangażowana jest zawsze grupa 2'-OH adenosyny, ułożonej w odległości około 30 nukleotydów od 3'-końca intronu i grupa 5'-OH guanaozyny, będącej jednocześnie pierwszym nukleotydem intronu. W efekcie połączenia wiązaniem fosfodwuesterowym tych grup hydroksylowych powstaje rozgałęzienie pętli lassa. Struktury takie wykrywane są powszechnie w produktach reakcji dojrzewania *in vitro* pre-mRNA komórek ssaków [11].



Ryc. 2. Budowa miejsca rozgałęzienia intronu w pre-mRNA

Bezpośrednio po odłączeniu pętli intronu rozpoczyna się reakcja łączenia sąsiadujących eksonów. Enzym katalizujący łączenie końców cząsteczek polinukleotydów, zwany ligazą, oczyszczono jeszcze w latach siedemdziesiątych z zainfekowanych fagiem T4 komórek *E.coli*. Obecnie stosowany jest on laboratoryjnie w technikach inżynierii genetycznej. Najdokładniej poznana ligaza eukariotyczna jest enzym z ekstraktu kiełków pszenicy, zbadany w pracowni prof. G r o s s a przy współudziale polskich uczonych [12, 13]. Katalizuje on łączenie dwóch końców RNA wiązaniem 3'5'-fosfodwuestrowym, tworząc dodatkowo 2'-fosfomonoester przy 3'-końcowym nukleotydzie. Reakcja ligacji poprzedzona jest fosforylacją 5'-końca przez specyficzną kinazę polinukleotydową. Wiązanie 3'5'-fosfodwuestrowe łączące końce RNA jest, dzięki obecności 2'-fosfomonoestru, niewrażliwe na działanie rybonukleaz. Brak jest jakichkolwiek doniesień świadczących o związku aktywności ligazowej ze strukturą spliceosomu.

Końcowe etapy procesu dojrzewania pre-mRNA, związane z jego transportem do cytoplazmy są bardzo słabo poznane. Zachodzące wtedy modyfikacje 3'-końca cząsteczki łączy się z aktywnością specyficznych jądrowych rybonukleaz [14].

II. Spliceosom

II-1. Konserwatywne ewolucyjnie sekwencje intronów

Jednym z najwcześniej poznanych faktów wiążących się z usuwaniem sekwencji intronowych z pre-mRNA, było stwierdzenie wysokiego stopnia zgodności w składach nukleotydowych końców intronów. W roku 1982

muszą być wycinane samorzutnie [26—28]. W produktach reakcji odnajdywane są jednak zawsze w formie pętli lassa. Na tej podstawie sugeruje się ewolucyjny związek tych mechanizmów z dojrzewaniem pre-mRNA w jądrach komórek ssaków.

Zbadane w pracowni Cecha samorzutne eliminowanie intronów [23—25], jest pierwszym bezpośrednim dowodem katalicznych funkcji cząsteczek RNA. Wcześniejsze sugestie na ten temat pochodziły z prac Altmana [29—31] nad rybonukleazą P—enzymem uczestniczącym w dojrzewaniu tRNA wielu grup organizmów. Niewątpliwie stymulujące były także analogie wysnute z badań nad rolą rRNA w mechanizmie funkcjonowania rybosomu [32].

II-2. Udział jądrowych RNP

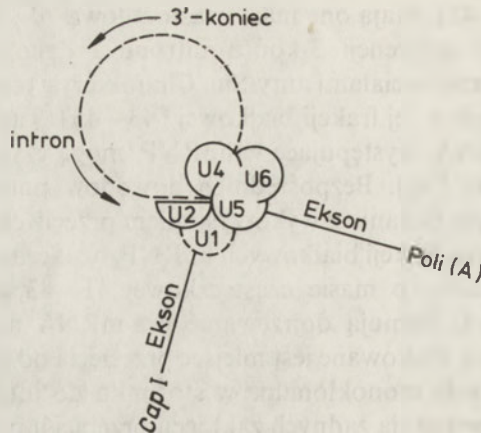
RNA wchodzący w skład snRNP wyższych eukariontów stanowi frakcję niskocząsteczkowych jądrowych kwasów rybonukleinowych charakteryzujących się dużą zawartością urydyny. Obecnie poznano 10 różniących się masą cząsteczkową frakcji snRNA. Wszystkie powstają w wyniku transkrypcji prowadzonej przez polimerazę II i zawierają od 60 do 217 nukleotydów. Dodatkowymi ich cechami charakterystycznymi są: wysoka stabilność metaboliczna, występowanie pseudourydyny i struktura cap na 5'-końcu cząsteczki. Spośród tych RNA tylko U3 snRNA występuje w jąderku, pozostałe są pochodzenia nukleoplazmatycznego. W skład odpowiednich snRNP wchodzi ponadto do dziesięciu białek różniących się znacznie masami cząsteczkowymi. U4 i U6 snRNA występują w składzie tego samego rybonukleoproteidu. SnRNP zawierające: U1, U2, U5, U4 i U6 snRNA stanowią charakterystyczny element budowy spliceosomu wyższych organizmów eukariotycznych [33—36]. Ich kwasy rybonukleinowe zawierają charakterystyczną, konserwatywną sekwencję AUUUUUG, która jest miejscem przyłączenia polipeptydu rdzeniowego rozpoznawanego poli- i monoklonalnymi przeciwciałami anti-Sm [37]. Nie można także wykluczyć, że niektóre klasy jądrowego pre-mRNA wyróżniające się na przykład brakiem odpowiednio długiego fragmentu poliadenelowego, dojrzewają w spliceosomach o innym składzie. Świadczy o tym występowanie U7 snRNA w kompleksie z 3'-końcem pre-mRNA histonu H3 u jeżowca morskiego [38]. W jądrach komórek drożdży, u których zdecydowana większość genów nie zawiera intronów, występują zupełnie odmienne klasy snRNP [21]. Ich wyróżniającą cechą jest znacznie większa masa cząsteczkowa snRNA (od 120 do około 1000 nukleotydów), a przede wszystkim brak reakcji immunologicznej z przeciwciałami anti-Sm. Wyjątkiem jest jedynie LSR 1 RNP określane także jako snR20, który reaguje z tymi przeciwciałami i ze względu na swoją budowę, może być uważany za poli (snRNP) zawierający łącznie: U2, U5, U4 i U6 snRNA [39].

Stosując metody genetyczne wykazano, że kompletność zasad pomiędzy różnymi rodzajami RNA występujących w strukturze spliceosomu jest istotnym, ale nie wystarczającym warunkiem prawidłowego dojrzewania pre-mRNA [40]. Konieczna jest obecność i współdziałanie specyficznych klas białek występują-

cych w snRNP [41, 42]. Mają one masę cząsteczkową 70—100 kDa, wykazują powinowactwo do sekwencji 3-końca intronu i dają pozytywną reakcję immunologiczną z przeciwciałami anty-Sm. Charakterystyczny jest brak aktywności enzymatycznych w tej frakcji białkowej [43—45]. Także białka natywnie połączone z pre-mRNA, występujące w hnRNP, mogą czynnie uczestniczyć w procesie dojrzewania [46]. Bezpośrednich dowodów potwierdzających taką możliwość dostarczyły badania z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych [47]. Jedną z głównych frakcji białkowych hnRNP, oznaczana w piśmiennictwie literą C, zawiera białka o masie cząsteczkowej 41—43 kDa. Przeciwciała monoklonalne anty-C hamują dojrzewanie pre-mRNA na etapie wycinania intronów. Dokładniej, blokowane jest miejsce przecięcia od strony 3' i tworzenie pętli lassa. Przeciwciała monoklonalne w stosunku do innych białek hnRNP (68—120 kDa) nie powodują żadnych zakłóceń przebiegu procesu dojrzewania. Można na tej podstawie przypuszczać, że jedynie białka frakcji C czynnie uczestniczą w tym procesie. Istnieją sugestie [47], że stanowią one swoisty „stół operacyjny” umożliwiający właściwą organizację przestrzenną składników spliceosomu.

II-3. Powstawanie struktury spliceosomu

Wycinanie „zbędnych” sekwencji z pre-mRNA przebiega dwuetapowo: I. 5'-koniec intronu wytwarza rozgałęzienie łącząc się z grupą 2'-OH andenozyiny leżącej w okolicy 3'-końca (rozdz. II-1). II. następuje przecięcie połączenia: 3'-koniec intronu-exon, odłączenie pętli lassa i łączenie sąsiednich eksonów [48—51]. Każdemu etapowi towarzyszy występowanie charakterystycznego i możliwego do wydzielenia kompleksu, stopniowo tworzącego się, funkcjonalnego spliceosomu. Zależnie od wybranej metody izolowania, kompleksy mają stałą sedymentacji 40 — 60 S, a podczas elektroforezy w obecności heparyny 15—35 S. Zmniejszenie wielkości spliceosomu w obecności heparyny, tłumaczy się odłączeniem białek związanych elektrostycznie [52]. Dzięki badaniom tego typu możliwe stało się ustalenie kolejności dołączania poszczególnych składników struktury spliceosomu. Najpierw, do pre-mRNA połączonego z rdzeniowymi białkami hnRNP, przyłączają się U1 i U5 sn-RNP. Następuje to odpowiednio na 5' i 3'-końcu wycinanego intronu i przebiega bez dodatkowego nakładu energii. Następnie, do rejonu przyszłego miejsca rozgałęzienia przyłącza się U2 sn-RNP. Powstanie tego kompleksu uzależnione jest od ATP. Na koniec, także przy współdziałaniu ATP, przyłącza się snRNP zawierający U4 i U6 snRNA. Schemat budowy ostatecznego kompleksu przedstawiony jest na Ryc. 4. Za wyjątkiem U1 snRNP, wszystkie pozostałe występują w ilościach równomolowych [53]. Występujący w wyraźnie mniejszej ilości U1 SnRNP wyobrażono na rycinie linią przerywaną. Zastrzec należy, że spliceosomy, o takiej budowie występują jedynie w jądrach komórek ssaków. Jak już wspomniano, u organizmów niższych ewolucyjnie budowa spliceosomu jest inna [21].



Ryc. 4. Schemat budowy spliceosomu. U1 snRNP wykrywany jest w ilościach śladowych. Oznaczenia sekwencji intronów jak na Ryc. 1

III. Uwagi końcowe

Omówione tu fakty doświadczalne wskazują, że proces rozcinań jądrowych pre-mRNA został dzięki wykonanym pracom dosyć dokładnie zbadany. Podkreślenia wymaga udokumentowanie przebiegu procesu w wieloskładnikowym, ściśle uorganizowanym kompleksie. Termodynamicznie stwarza to warunki optymalnego przebiegu reakcji, „wyodrębniając” ją spośród innych przemian jądrowych. Wyjątkiem w tym względzie jest reakcja łączenia eksonów, drugi kluczowy etap składania pre-mRNA. Jak już wspomniano, nie udało się dotychczas udokumentować jej strukturalnego związku ze spliceosomem.

Szczególnie doniosłe znaczenie poznawcze miało potwierdzenie katalitycznych funkcji cząsteczek RNA (rozdział II-1). Spowodowało to istotne zmiany w poglądach na przebieg wczesnych procesów ewolucyjnych. Coraz powszechniej uważa się, że pierwotne cząsteczki RNA spełniały wyłącznie funkcje katalityczne. Udział w ekspresji informacji genetycznej to wynik znacznie późniejszej specjalizacji. Zgodnie z tymi poglądami zachowane współcześnie katalityczne funkcje RNA są reliktem ewolucji abiotycznej [54]. Sugeruje się także, że składanie pre-mRNA to jeden z najbardziej pierwotnych mechanizmów związanych z ekspresją informacji genetycznej [5].

Artykuł otrzymano 25 lutego 1988 r.

Zaakceptowano do druku 10 czerwca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Tilghman S. M., Curtis P. J., Tiemeia D. C., Leder P., Weissman C., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1309—1313.
2. Buchowicz J., (1987) w *Biologii Molekularnej*, (red. Lassota Z.), t. 1, str. 225—266, PWN, Warszawa.

3. Gusaryan K. G., Tarantul V. Z., (1983), Eukaryotic genome. Molecular organisation and expression., Izdatielstwo Moskovskogo Uniwersitieta, Moskwa.
4. Knowler T. J., (1982), *Biochem. Education*, **10**, 130—137.
5. Darnel J. E., Jr., (1985), *Scien. American*, **253**, 54—64.
6. Shatkin A. J., (1985), *Cell*, **40**, 223—224.
7. Olszańska B., (1985), *Post. Biochem.*, **31**, 365—384.
8. Sieliwanowicz B., (1986), *Post. Biochem.*, **32**, 173—183.
9. Nevins J. R., (1982), *Cell*, **28**, 1—2.
10. Seiler S., Sharp P. A., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 1019—1050.
11. Padgett R. A., Grabowski P. J., Konarska M. M., Sharp P. A., (1985), *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 154—157.
12. Konarska M., Filipowicz W., Domdey H., Gross H. J., (1981), *Nature*, **293**, 112—116.
13. Konarska M., Filipowicz W., Gross H. J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1474—1478.
14. Bachmann M., Schroder H. C., Messer R., Muller W. E. G., (1984), *FEBS Lett.*, **171**, 25—30.
15. Mount S. M., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 459—472.
16. Aebi M., Horning H., Padgett R. A., Reiser J., Weissman C., (1986), *Cell*, **47**, 555—565.
17. Keller E. B., Noon W. A., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7417—7420.
18. Padgett R. A., Konarska M. M., Aebi M., Horning H., Weissman C., Sharp P. A., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8349—8353.
19. Rautmann G., Breathnach R., (1985), *Nature*, **315**, 430—432.
20. Ruskin B., Greene J. M., Greene M. R., (1985), *Cell*, **41**, 833—844.
21. Maniats T., Reed R., (1987), *Nature*, **325**, 673—678.
22. Sharp P. A., (1987), *Science*, **235**, 766—771.
23. Zuag A. J., Cech T. R., (1986), *Science*, **231**, 470—475.
24. Cech T. R., (1986), *Scien. American*, **255**, 76—84.
25. Cech T. R., (1986), *Cell*, **44**, 207—210.
26. Peebles C. L., Periman P. S., Mecklenburg K. L., Petrillo M. L., Tabor J. H., Jarrel K. A., Cheng H. L., (1986), *Cell*, **44**, 213—223.
27. Van der Veen R., Arnberg A. C., Van der Horst G., Bonen L., Tabak H. F., Grivell L. A., (1986), *Cell*, **44**, 225—234.
28. Arnberg A. C., Van der Horst G., Tabak H. F., (1986), *Cell*, **44**, 235—242.
29. Altman S., (1984), *Cell*, **36**, 237—239.
30. Altman S., Baer M., Guerriertakada C., Vioque A., (1986), *Trends. Biochem. Sci.*, **11**, 515—518.
31. Gold H. A., Altman S., (1986), *Cell*, **44**, 243—249.
32. Burma D. P., Tewan D. S., Srivastawa A. K., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**, 427—435.
33. Frendewey D., Keller W., (1985), *Cell*, **42**, 355—367.
34. Grabowski P. J., Seiler S. R., Sharp P. A., (1985), *Cell*, **42**, 345—353.
35. Berget S. M., Robertson B. L., (1986), *Cell*, **46**, 691—696.
36. Black D. L., Steitz J. A., (1986), *Cell*, **46**, 697—704.
37. Reddy R., Henning D., Busch H., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10930—10935.
38. Schaufele F., Gilmartin G. M., Baunwarth W., Birnstiel M. L., (1986), *Nature*, **323**, 777—781.
39. Ares M., Jr., (1986), *Cell*, **47**, 49—59.
40. Zhuang Y., Weiner A. M., (1986), *Cell*, **46**, 827—835.
41. Gerke V., Steitz J. A., (1986), *Cell*, **47**, 973—984.
42. Tazi J., Albert Ch., Tamsamani J., Reveillaud J., Cathala G., Brunel C., Jeanteur P., (1986), *Cell*, **47**, 755—766.

43. Black D.L., Chabot B., Steitz J.A., (1985), *Cell*, **42**, 737—750.
44. Chabot B., Black D.L., Le Master D.M., Steitz J.A., (1985), *Science*, **230**, 1344—1349.
45. Ruskin B., Green M.R., (1985), *Cell*, **43**, 131—142.
46. Pederson T., (1983), *J. Cell Biol.*, **97**, 1321—1326.
47. Choi Y.D., Grabowski P.J., Sharp P.A., Dreyfuss G., (1986), *Science*, **231**, 1534—1539.
48. Krainer A.R., Maniatis T., Ruskin B., Green M.R., (1984), *Cell*, **36**, 993—1005.
49. Grabowski P.J., Padgett R.A., Sharp P.A., (1984), *Cell*, **37**, 415—427.
50. Padgett R.A., Konarska M.M., Grabowski P.J., Harda S.F., Sharp P.A., (1984), *Science*, **225**, 893—903.
51. Ruskin B., Krainer A.R., Maniatis T., Green M.R., (1984), *Cell*, **38**, 317—331.
52. Konarska M.M., Sharp P.A., (1986), *Cell*, **46**, 845—855.
53. Grabowski P.J., Sharp P.A., (1986), *Science*, **233**, 1294—1299.
54. Gilbert W., (1986), *Nature*, **319**, 618—618.

EWA WILAND*

Charakterystyka ubikwityny

Characteristics of ubiquitin

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Kodowanie ubikwityny
- III. Udział ubikwityny w procesie degradacji białek
- IV. Ubikwityna jako białko szoku termicznego
- V. Ubikwitynacja białek jądrowych
- VI. Ubikwitynacja białek powierzchni komórkowej

Contents

- I. Introduction
- II. Encoding of ubiquitin
- III. Participation of ubiquitin in protein degradation
- IV. Ubiquitin as a heat-shock protein
- V. Ubiquitination of nuclear proteins
- VI. Ubiquitination of cell surface proteins

I. Wstęp

Charakterystykę ubikwityny, białka o masie cząsteczkowej 8451 daltonów (76 reszt aminokwasowych), można by zamknąć w jednym zdaniu: jest wszędzie i funkcjonuje wszędzie [1—3]. Stąd wyjątkowo uzasadniona i trafna była zmiana poprzednich nazw tego białka, tj. „tyminy” [4] lub tymopoetyny [5] na ubikwitynę, czyli „wszędobylską”. Wkrótce po wyizolowaniu ubikwityny (pierwotnie z grasicy bydłowej) i ustaleniu sekwencji aminokwasów ubikwityny z różnych źródeł, zwrócono uwagę na jej niezwykle konserwatywną ewolucyjnie strukturę pierwszorzędową (Ryc. 1) [1, 2, 6]. Stwierdzono obecność ubikwityny we wszystkich badanych tkankach eukariontów, a także sugerowano jej występowanie w bakteriach [1, 2, 6, 7]. W obrębie komórki występowanie ubikwityny wydaje się także nieograniczone: została zlokalizowana w jądrze

* Dr, Zakład Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

człowiek	1	Met-Gln-Ile-Phe-Val-Lys-Thr-Leu-Thr-Gly-Lys-Thr-Ile-Thr-Leu-	15
drożdże
człowiek	16	Glu-Val-Glu-Pro-Ser-Asp-Thr-Ile-Glu-Asn-Val-Lys-Ala-Lys-Ile-	30
drożdże Ser Asp Ser
człowiek	31	Gln-Asp-Lys-Glu-Gly-Ile-Pro-Pro-Asp-Gln-Gln-Arg-Leu-Ile-Phe-	45
drożdże
człowiek	46	Ala-Gly-Lys-Gln-Leu-Glu-Asp-Gly-Arg-Thr-Leu-Ser-Asp-Tyr-Asn-	60
drożdże
człowiek	61	Ile-Gln-Lys-Glu-Ser-Thr-Leu-His-Leu-Val-Leu-Arg-Leu-Arg-Gly-	75
drożdże
człowiek	76	Gly	
drożdże	...		

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasów ubikwityny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i człowieka, wydedukowanych na podstawie sekwencji nukleotydów genów. Sekwencja aminokwasów ludzkiej ubikwityny jest identyczna z sekwencją ubikwityny bydłowej, pstrąga oraz owadów [3]

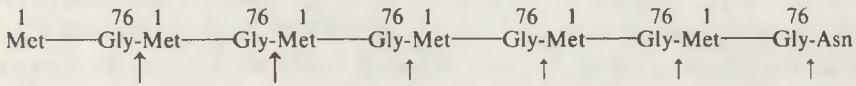
komórkowym [8, 9], cytoplazmie [10, 11] oraz na powierzchni błony komórkowej [12, 13]. Wykryto także, że ubikwityna jest składnikiem tzw. *paired helikal filaments (PHF)*, występujących w mózgu chorych na chorobę Alzheimara [14].

Nieustające od lat badania nad ubikwityną umożliwiły, szczególnie w ostatnich latach, wykazanie jej związku z szeregiem procesów komórkowych, takich jak specyficzna degradacja białek, transkrypcja, naprawa DNA, podziały komórkowe. Mimo, że wszystkie te doniesienia wskazują na fundamentalne znaczenie ubikwityny dla różnych aktywności komórkowych, przypisywane ubikwitynie mechanizmy działania mają jedynie charakter sugestii (wcześniejsze dane dotyczące ubikwityny — patrz przeglądy 15—18).

II. Kodowanie ubikwityny

Dotychczas sklonowano sekwencje nukleotydowe DNA kodujące ubikwitynę drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [3], *Xenopus leavis* [19], muszki owocowej [20], kury [21], człowieka [20—24] oraz jęczmienia [25]. Jak przystało na to niezwykle białko, organizacja genów kodujących ubikwitynę jest także nietypowa. Geny ubikwityny występują w genomie w kilku kopiach leżących bezpośrednio jedna za drugą (w układzie „head-to-tail”) bez żadnych odcinków przerywających, tworząc gen poliubikwityny. Produktem transkrypcji, a następnie translacji, tak uorganizowanych podjednostek jest cząsteczka poliubikwityny. Liczba podjednostek kodujących ubikwitynę w genie poliubikwityny jest różna u różnych gatunków, np. u drożdży wynosi 6 [3], a u człowieka 9 [22]. Godny podkreślenia jest fakt, że chociaż poszczególne podjednostki kodujące ubikwity-

nę w genie poliubikwityny znacznie różnią się między sobą sekwencją nukleotydów, kodują takie same sekwencje aminokwasów [3, 19, 21, 22]. Jedynie u muszki owocowej, w której haploidalnym genomie zlokalizowano dwa poliubikwitynowe geny stwierdzono, że w jednej z podjednostek, zamiast izoleucyny, w pozycji 23 występuje treonina [20].



Ryc. 2. Strukturalna organizacja prekursorowej poliubikwityny drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, wydedukowana na podstawie sekwencji nukleotydów genu. Strzałkami wskazano miejsca proteolitycznych cięć niezbędnych do powstania dojrzałej ubikwityny [38]

Na rycinie 2 przedstawiono strukturalną organizację prekursorowej poliubikwityny drożdży, wydedukowaną na podstawie sekwencji nukleotydów genu sklonowanego w laboratorium A. V a r s h a v s k y ' e g o [3]. Częsteczka poliubikwityny drożdży składa się z pięciu podjednostek identycznych z dojrzałą ubikwityną oraz z szóstą podjednostką, która zawiera na C-końcu dodatkowy aminokwas — asparaginę. W przypadku ludzkiej poliubikwityny tym dodatkowym aminokwasem jest walina [22], u jęczmienia lizyna [25], a u kury tyrozyna [21]. Znaczenie dodatkowego aminokwasu „blokującego” C-koniec poliubikwityny nie jest wyjaśnione; okazało się bowiem, że koniec poliubikwityny *Xenopus laevis* jest identyczny z C-końcem dojrzałej cząsteczki ubikwityny [19]. Dojrzała cząsteczka ubikwityny powstaje poprzez proteolizę wiązań peptydowych między glicyną i metioniną, katalizowaną przez C-końcową hydrolazę ubikwityny [27].

Wspólną cechą genów kodujących ubikwitynę jest brak intronów w części kodującej [3, 22]. Dotychczas zlokalizowano jedynie sekwencję wtrąconą długości 715 par zasad w „regionie flankującym” koniec 5' genu ludzkiego.

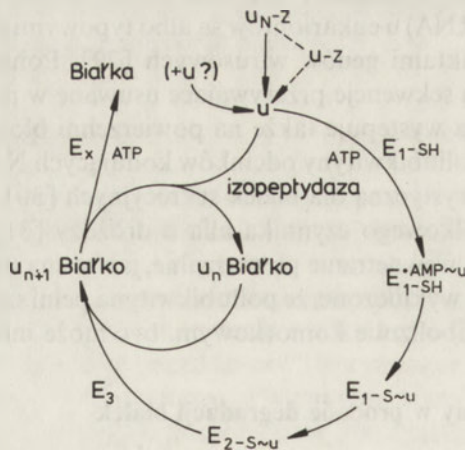
Wszystkie opisane dotychczas poli-białka (tzn. syntetyzowane na matrycy policistronowego mRNA) u eukariontów są albo typowymi białkami sekrecyjnymi [28], albo produktami genów wirusowych [29]. Ponadto, geny kodujące poli-białka zawierają sekwencje przerywające usuwane w procesie dojrzewania. Mimo, że ubikwityna występuje także na powierzchni błony komórkowej [12, 13], brak w genach poliubikwityny odcinków kodujących N-końcową sekwencję sygnałową, charakterystyczną dla białek sekrecyjnych [30]. Ponadto, za wyjątkiem prekursora białkowego czynnika alfa u drożdży [31], żadne inne znane poli-białka nie są tak wewnętrznie powtarzalne, jak to ma miejsce w poliubikwitynie. Nie jest zresztą wykluczone, że poliubikwityna pełni samą jakąś fundamentalną funkcję w metabolizmie komórkowym, być może inną niż ubikwityna.

III. Udział ubikwityny w procesie degradacji białek

Degradacja wewnątrzkomórkowych białek jest odzwierciedleniem stanu fizjologicznego komórki i wydaje się kontrolowana w zróżnicowany sposób dla poszczególnych białek. Ani mechanizmy, ani funkcje selektywnej, wewnątrzko-

mórkowej degradacji białek nie są jeszcze całkowicie wyjaśnione. Przynajmniej jednak w stosunku do białek eksperymentalnie krótko żyjących, do których należy wiele białek regulatorowych, wydaje się oczywiste, że regulacyjna funkcja tych białek może zależeć od ich selektywnej degradacji [32, 33].

W komórkach eukariontów białka degradowane są w lizosomach oraz na drodze metabolicznej niezależnej od lizosomów. Lizosomy są miejscem degradacji białek ulegających endocytozie, niektórych białek długo żyjących ($t_{1/2} > 10$ godzin) oraz różnych wewnątrzkomórkowych białek w okresach niedożywienia komórki. Natomiast większość selektywnego obrotu metabolicznego białek wewnątrzkomórkowych (w tym także tych ekstremalnie krótko żyjących oraz nieprawidłowych) odbywa się poza lizosomami, na drodze metabolicznej zależnej od ATP [17, 34, 35]. Modelowym układem do badania mechanizmów degradacji białek jest ekstrakt z retikulocytów królika [17, 36]. Wykazano, że ubikwityna jest specyficznym, niezbędnym czynnikiem w procesie zależnej od ATP, pozalizosomalnej proteolizy białek ekstraktu z retikulocytów królika [11]. Wówczas wysunięto hipotezę, że ubikwityna tworzy liczne kowalencyjne koniugaty z akceptorowymi białkami, które dopiero po ubikwitynacji mogą stanowić substraty dla proteolizy [17]. Sugerowano, że ubikwityna może służyć jako sygnał dla protez specyficznych dla koniugatów białko-ubikwityna. Zarówno w badaniach *in vitro* jak *in vivo* stwierdzono, że w tych koniugatach ubikwityna łączy się wiązaniem izopeptydowym z grupą ϵ -aminową wewnętrznej lizyny akceptorowego białka tworząc rozgałęzioną cząsteczkę [37]. Hersh o i w s p. zaproponowali schemat wieloenzymatycznej drogi koniugacji ubikwityny z białkami (Ryc. 3). Według tego schematu tworzenie wiązania izopeptydowego przebiega w czterech etapach z udziałem następujących enzymów (zwanym układem ubikwityny): 1) enzym E1 — aktywacja C-końca łańcucha ubikwityny; 2) ponownie enzym E1 — tworzenie wiązania tioestrowego; 3) enzymy E1 oraz



Ryc. 3. Drogi metaboliczne systemu ubikwityny. U_{n-2} — prekursorowa poliubikwityna; u — ubikwityna; $u-z$ — nieudokumentowany etap pośredni w dojrzewaniu ubikwityny z poliubikwityny; $n = 0, 1, 2, \dots$. Kolejne etapy ubikwitynacji białek opisano w tekście [38]

E2 — transestryfikacja; 4) enzymy E2 oraz E3 — koniugacja ubikwityny z białkowym substratem. W ekstraktach z retikulocytów królika zidentyfikowano pięć homologicznych enzymów E2 (tzw. nośniki białkowe), które prawdopodobnie różnią się specyficznością substratową. Tylko jeden spośród nich wymaga współdziałania z enzymem E3 podczas koniugacji ubikwityny z substratowym białkiem [24].

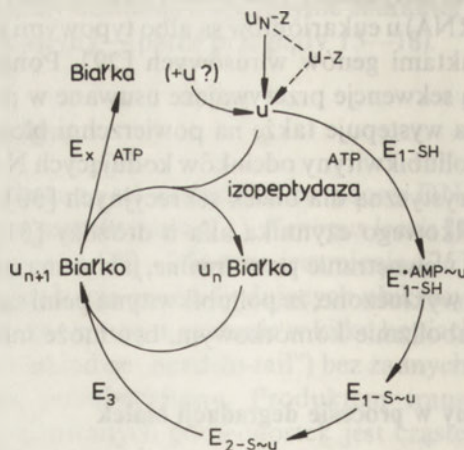
Enzym E3 prawdopodobnie zawiera specyficzne dla substratu miejsce wiązania, rozpoznające strukturalne cechy substratu, co umożliwia jego proteolizę zależną od układu ubikwityny [39].

Przynajmniej niektóre z izopeptydowych wiązań ubikwityny z substratowymi białkami mogą być odwracalne, dzięki działaniu izopeptydazy (wyzolowana i dobrze scharakteryzowana) [40]. Do opisanego wyżej wieloenzymatycznego układu ubikwityny prawdopodobnie należy także niezidentyfikowana dotąd proteaza, degradująca przy udziale ATP koniugaty ubikwityny z substratowymi białkami do peptydowych fragmentów, z których mogłaby być uwalniana ubikwityna [38].

W dalszych badaniach stwierdzono, że *in vitro* ubikwityna może tworzyć koniugaty z akceptorowymi białkami nie tylko poprzez wiązanie z grupami ϵ -aminowymi tych białek. W tym drugim rodzaju koniugatów ubikwityna miałaby się wiązać z grupą α -NH₂ N-końcowego aminokwasu akceptorowego białka [41]. Sugerowano wówczas, że właśnie ubikwitynacja N-końca białek jest niezbędną i wystarczającą modyfikacją białek przeznaczonych do degradacji (substratów proteolizy) [38]. Intensywne badania, prowadzone w laboratorium Varshavsky'ego, zmierzające do potwierdzenia *in vivo* schematu degradacji białek poprzez ubikwitynację N-końca substratów proteolizy, doprowadziły do zupełnie nieoczekiwanych, wręcz sensacyjnych wyników i pozwoliły na sformułowanie tzw. zasady N-końca [42]. Jak Varshavsky dowcipnie to skomentował „wykonano dobre doświadczenia kierując się złymi przesłankami” [cyt. za 43]. Otóż, posługując się metodami inżynierii genetycznej, połączono fragment genu poliubikwityny drożdży kodujący tylko jedną ubikwitynę, z genem β -galaktozydazy *E. coli*. Podczas ekspresji tak skonstruowanego genu w komórkach *E. coli* uzyskiwano chimerowe białko, będące połączeniem: ubikwityna-Met- β -galaktozydaza (Met na granicy ubikwityna- β -galaktozydaza jest pierwszym aminokwasem β -galaktozydazy). Natomiast kiedy ten sam gen ulegał ekspresji w komórkach drożdży, proteaza momentalnie odtrawiała ubikwitynę z nowosyntetyzowanego białka, w rezultacie czego produktem translacji była zawsze β -galaktozydaza. Brak reakcji odtrawiania ubikwityny w komórkach *E. coli* wynika z braku u prokariotów specyficznych dla układu ubikwityny enzymów, a być może nawet braku samej ubikwityny [cyt. za 42]. Chcąc „oszukać” enzym odcinający ubikwitynę w chimerowym białku, postanowiono zmienić aminokwas łączący ubikwitynę z β -galaktozydazą. Z jednym wyjątkiem (proliny) nie udało się tego procesu zahamować. Odcinanie ubikwityny, w zależności od sekwencji aminokwasów jej C-końca, uwalniało β -galaktozydazę z różnymi aminokwasami na N-końcu. Pozwoliło to na wysunięcie przypuszczenia, że aminokwas występują-

mórkowej degradacji białek nie są jeszcze całkowicie wyjaśnione. Przynajmniej jednak w stosunku do białek eksperymentalnie krótko żyjących, do których należy wiele białek regulatorowych, wydaje się oczywiste, że regulacyjna funkcja tych białek może zależeć od ich selektywnej degradacji [32, 33].

W komórkach eukariontów białka degradowane są w lizosomach oraz na drodze metabolicznej niezależnej od lizosomów. Lizosomy są miejscem degradacji białek ulegających endocytozie, niektórych białek długo żyjących ($t_{1/2} > 10$ godzin) oraz różnych wewnątrzkomórkowych białek w okresach niedożywienia komórki. Natomiast większość selektywnego obrotu metabolicznego białek wewnątrzkomórkowych (w tym także tych ekstremalnie krótko żyjących oraz nieprawidłowych) odbywa się poza lizosomami, na drodze metabolicznej zależnej od ATP [17, 34, 35]. Modelowym układem do badania mechanizmów degradacji białek jest ekstrakt z retikulocytów królika [17, 36]. Wykazano, że ubikwityna jest specyficznym, niezbędnym czynnikiem w procesie zależnej od ATP, pozalizosomalnej proteolizy białek ekstraktu z retikulocytów królika [11]. Wówczas wysunięto hipotezę, że ubikwityna tworzy liczne kowalencyjne koniugaty z akceptorowymi białkami, które dopiero po ubikwitynacji mogą stanowić substraty dla proteolizy [17]. Sugerowano, że ubikwityna może służyć jako sygnał dla protez specyficznych dla koniugatów białko-ubikwityna. Zarówno w badaniach *in vitro* jak *in vivo* stwierdzono, że w tych koniugatach ubikwityna łączy się wiązaniem izopeptydowym z grupą ϵ -aminową wewnętrznej lizyny akceptorowego białka tworząc rozgałęzioną cząsteczkę [37]. Hersh o i w s p. zaproponowali schemat wieloenzymatycznej drogi koniugacji ubikwityny z białkami (Ryc. 3). Według tego schematu tworzenie wiązania izopeptydowego przebiega w czterech etapach z udziałem następujących enzymów (zwanym układem ubikwityny): 1) enzym E1 — aktywacja C-końca łańcucha ubikwityny; 2) ponownie enzym E1 — tworzenie wiązania tioestrowego; 3) enzymy E1 oraz



Ryc. 3. Drogi metaboliczne systemu ubikwityny. U_{n-z} — prekursorowa poliubikwityna; u — ubikwityna; $u-z$ — nieudokumentowany etap pośredni w dojrzewaniu ubikwityny z poliubikwityny; $n = 0, 1, 2, \dots$. Kolejne etapy ubikwitynacji białek opisano w tekście [38]

E2 — transestryfikacja; 4) enzymy E2 oraz E3 — koniugacja ubikwityny z białkowym substratem. W ekstraktach z retikulocytów królika zidentyfikowano pięć homologicznych enzymów E2 (tzw. nośniki białkowe), które prawdopodobnie różnią się specyficznością substratową. Tylko jeden spośród nich wymaga współdziałania z enzymem E3 podczas koniugacji ubikwityny z substratowym białkiem [24].

Enzym E3 prawdopodobnie zawiera specyficzne dla substratu miejsce wiązania, rozpoznające strukturalne cechy substratu, co umożliwia jego proteolizę zależną od układu ubikwityny [39].

Przynajmniej niektóre z izopeptydowych wiązań ubikwityny z substratowymi białkami mogą być odwracalne, dzięki działaniu izopeptydazy (wyzolowana i dobrze scharakteryzowana) [40]. Do opisanego wyżej wieloenzymatycznego układu ubikwityny prawdopodobnie należy także niezidentyfikowana dotąd proteaza, degradująca przy udziale ATP koniugaty ubikwityny z substratowymi białkami do peptydowych fragmentów, z których mogłaby być uwalniana ubikwityna [38].

W dalszych badaniach stwierdzono, że *in vitro* ubikwityna może tworzyć koniugaty z akceptorowymi białkami nie tylko poprzez wiązanie z grupami ϵ -aminowymi tych białek. W tym drugim rodzaju koniugatów ubikwityna miałaby się wiązać z grupą α -NH₂ N-końcowego aminokwasu akceptorowego białka [41]. Sugerowano wówczas, że właśnie ubikwitynacja N-końca białek jest niezbędną i wystarczającą modyfikacją białek przeznaczonych do degradacji (substratów proteolizy) [38]. Intensywne badania, prowadzone w laboratorium Varshavsky'ego, zmierzające do potwierdzenia *in vivo* schematu degradacji białek poprzez ubikwitynację N-końca substratów proteolizy, doprowadziły do zupełnie nieoczekiwanych, wręcz sensacyjnych wyników i pozwoliły na sformułowanie tzw. zasady N-końca [42]. Jak Varshavsky dowcipnie to skomentował „wykonano dobre doświadczenia kierując się złymi przesłankami” [cyt. za 43]. Otóż, posługując się metodami inżynierii genetycznej, połączono fragment genu poliubikwityny drożdży kodujący tylko jedną ubikwitynę, z genem β -galaktozydazy *E. coli*. Podczas ekspresji tak skonstruowanego genu w komórkach *E. coli* uzyskiwano chimerowe białko, będące połączeniem: ubikwityna-Met- β -galaktozydaza (Met na granicy ubikwityna- β -galaktozydaza jest pierwszym aminokwasem β -galaktozydazy). Natomiast kiedy ten sam gen ulegał ekspresji w komórkach drożdży, proteaza momentalnie odtrawiała ubikwitynę z nowosyntetyzowanego białka, w rezultacie czego produktem translacji była zawsze β -galaktozydaza. Brak reakcji odtrawiania ubikwityny w komórkach *E. coli* wynika z braku u prokariotów specyficznych dla układu ubikwityny enzymów, a być może nawet braku samej ubikwityny [cyt. za 42]. Chcąc „oszukać” enzym odcinający ubikwitynę w chimerowym białku, postanowiono zmienić aminokwas łączący ubikwitynę z β -galaktozydazą. Z jednym wyjątkiem (proliny) nie udało się tego procesu zahamować. Odcinanie ubikwityny, w zależności od sekwencji aminokwasów jej C-końca, uwalniało β -galaktozydazę z różnymi aminokwasami na N-końcu. Pozwoliło to na wysunięcie przypuszczenia, że aminokwas występują-

Tabela 1

Zasada N-końca: zależność między N-końcowym aminokwasem a stabilnością białka [42].

N-końcowy aminokwas	$t_{1/2}$ białka
Met	} > 20 godzin
Ala	
Ser	
Thr	
Val	
Gly	
Ile	} ~ 30 minut
Glu	
Tyr	} ~ 10 minut
Gln	
Phe	} ~ 3 minuty
Leu	
Asp	
Lys	
Arg	~ 2 minuty

cy na N-końcu β -galaktozydazy wpływa na jej trwałość. W tabeli 1 zestawiono $t_{1/2}$ (półokres trwania) β -galaktozydazy, który w zależności od N-końcowego aminokwasu wynosił od około 3 minut do ponad 20 godzin. Porównując dane literaturowe dotyczące ponad 200 różnych białek potwierdzono zależność między N-końcowym aminokwasem a stabilnością białka. Ustalono, że jeśli N-końcowym aminokwasem jest metionina, lub alternatywnie seryna, alanina, treonina, walina, glicyna, to $t_{1/2}$ białek wynosi ponad 20 godzin; izoleucyna, kwas glutaminowy — ponad 30 minut; tyrozyna — ponad 10 minut; fenyloalania, leucyna, kwas asparaginowy, lizyna — około 3 minuty; arginina — około 2 minuty. Na tej podstawie sformułowano tzw. zasadę N-końca, która głosi, że stabilność białek *in vivo* zależy od N-końcowego aminokwasu [42]. Przyjmuje się, że grupa α -NH₂ jest rozpoznawana przez enzymy „czytające N-koniec” degradowanego białka. Cząsteczki zaś ubikwityny, przyłączane do wewnętrznych reszt lizynowych degradowanego białka, pomagają je destabilizować [42].

W dalszych badaniach wykazano, że niektóre aminokwasy (np. kwas asparaginowy, kwas glutaminowy) pełnią swą destabilizującą funkcję jedynie pośrednio, będąc miejscem przyłączenia innych „destabilizujących” aminokwasów (histrydyny, argininy) [44, 45]. To posttranslacyjne przyłączanie specyficznych aminokwasów do N-końca akceptorowych białek zachodzi z udziałem transferaz aminoacylo tRNA [46]. Wyjaśnia to obserwowaną już wcześniej *in vitro*, a mało zrozumiałą, zależność degradacji w układzie ubikwityny pewnych białek od obecności tRNA (His-tRNA^{His}, Arg-tRNA^{Arg}) [44, 47].

IV. Ubikwityna jako białko szoku termicznego

Dane, uzyskane przede wszystkim w doświadczeniach z użyciem linii komórkowej *ts85*, pozwoliły grupie *V a r s h a v s k y ' e g o* na sformułowanie hipotezy, że układy białek szoku termicznego i ubikwityny są wzajemnie zależne, a nawet określić ubikwitynę jako białko szoku termicznego [38].

Linia komórkowa *ts85* została wyprowadzona z komórek linii *FM3A*, pochodzącej ze spontanicznego nowotworu mysiego gruczołu mlecznego [48]. W odróżnieniu od macierzystych komórek *FM3A*, w komórkach linii *ts85*, w temperaturze 39°C zachodzą równocześnie dwa charakterystyczne zjawiska: zahamowanie syntezy koniugatów ubikwityny z akceptorowymi białkami oraz zahamowanie zależnej od ATP degradacji białek krótkożyjących [49, 50]. Okazało się, że komórki linii *ts85* różnią się od komórek macierzystych *FM3A* jedynie mutacją genu kodującego enzym *E1* (porównaj Ryc. 3) [49]. Na skutek tej mutacji, w temperaturze 39°C enzym *E1* staje się termolabilny. Linia komórkowa *ts85* jest jedną z nielicznych linii komórkowych powstałych przez mutację w układzie ubikwityny. Dzięki doświadczeniom prowadzonym z użyciem tej linii komórkowej potwierdzono bezpośredni związek między ubikwitynacją substratów proteolizy a ich degradacją.

Dalszą konsekwencją mutacji genu enzymu *E1* są także inne fenotypowe zmiany, charakteryzujące linię *ts85* w temperaturze 39°C. Między innymi, w jądrze komórkowym następuje gwałtowne obniżenie poziomu fosforylacji histonu *H1* przy niezmienionej aktywności kinazy jądrowej oraz cytoplazmatycznej. Ponadto, z chromatyny znika ubikwitynowany histon (tzw. *uH2A*). Zahamowaniu ulegają podziały komórkowe we wczesnym etapie fazy G_2 cyklu komórkowego, lub, w późnej fazie *S* [48, 51, 52]. Na podstawie tych obserwacji sugeruje się, że degradacja białek zależna od ubikwityny może odgrywać regulacyjną funkcję w przebiegu cyklu komórkowego [38]. U eukariontów w procesach regulujących wzrost i podziały komórkowe prawdopodobnie bierze udział szereg białek o bardzo szybkim obrocie metabolicznym [53, 54], do których należą np. tzw. *cykliny* [55] oraz czynnik *MPF* („maturation promoting factor”) w oocytach gadów [56]. W komórkach linii *ts85* niezdolność do degradacji analogicznych białek jest, być może odpowiedzialna za zahamowanie podziałów komórkowych.

Najbardziej jednak interesująca jest obserwacja, że przeniesienie komórek linii *ts85* do temperatury 39°C indukuje syntezę tzw. białek szoku termicznego, które nie są syntetyzowane w macierzystych komórkach typu dzikiego [49, 50]. Białka szoku termicznego, nazywane także białkami *stresu* lub *HSP* (heat shock proteins), syntetyzowane są w komórkach w odpowiedzi na niekorzystne czynniki, takie jak podwyższona o kilka stopni ponad normalną temperatura, jony metali ciężkich, nadtlenek wodoru, wbudowywane do białek analogi aminokwasów, etanol i inne (patrz przegląd 57). Synteza większości pozostałych białek komórkowych ulega zahamowaniu w okresie syntezy białek szoku termicznego. Natomiast w komórkach linii *ts85*, a także w fibroblastach

embrionów kurczenia indukcji syntezy białek szoku termicznego towarzyszy gwałtowny wzrost syntezy ubikwityny i jej mRNA [21, cyt. za 38]. Sugeruje się, że w komórkach linii *ts85*, w temperaturze 39°C, indukcja syntezy białek szoku termicznego ma ścisły związek z termolabilnością enzymu E1 oraz inaktywacją układu ubikwityny. Indukcja syntezy białek szoku termicznego zachodzi w tych komórkach prawdopodobnie na skutek niemożności degradacji jakiegoś białkowego aktywatora transkrypcji genów szoku termicznego, który jest równocześnie substratem układu proteaz zależnych od ubikwityny. Degradacja tego hipotetycznego białkowego aktywatora regulowałaby zatem indukcję genów szoku termicznego [49]. Także inni autorzy sugerują, że indukcja genów szoku termicznego występuje dopiero po zahamowaniu proteolizy aktywnej formy czynnika aktywującego transkrypcję tych genów [58]. W komórkach niezmutowanych, w których zachodzi ubikwitynacja substratów proteolizy, zahamowanie proteolizy tego czynnika mogłoby mieć miejsce wówczas, gdy na skutek preferencyjnej degradacji zdenaturowanych białek wewnątrzkomórkowych (pojawiających się pod wpływem stresu) wyczerpaniu ulegałby jeden ze składników układu proteolitycznego. Prawdopodobna wydaje się także możliwość, że inaktywacja czynnika regulującego transkrypcję genów szoku termicznego polega na jego ubikwitynacji [59]. Aktywny czynnik, zdolny do indukcji transkrypcji genów szoku termicznego, miałby pojawiać się w komórce dopiero przy braku wolnej ubikwityny. Taka sytuacja może mieć miejsce w komórce w warunkach stresu, kiedy licznie pojawiające się zdenaturowane białka ulegają preferencyjnej ubikwitynacji poprzedzającej ich degradację. Natomiast w komórkach linii *ts85* w temperaturze 39°C mogłoby pojawiać się aktywny czynnik transkrypcji genów szoku termicznego na skutek zahamowania enzymów układu ubikwityny. Uważa się, że zależna od ubikwityny degradacja białek oraz synteza białek szoku termicznego są kompletnymi systemami służącymi, między innymi, do ochrony komórki przed uszkodzeniami mogącymi wynikać z obecności patologicznie zmienionych białek [49]. Za obecnością wspólnych mechanizmów regulacyjnych przemawiają dane uzyskane drogą analizy genomu. Stwierdzono [cyt. za 38], że region „flankujący” koniec 5' poliubikwitynowego genu drożdży [3] zawiera sekwencję dokładnie homologiczną z sekwencją nukleotydową tzw. „*heat-shock box*” lub *HSE* (Heat-Shock Element = sekwencja nukleotydów: C--GAA--TTC--G) [60]. Badania izolowanych jąder komórkowych muszki owocowej wykazały, że *HSE* jest miejscem regulacji transkrypcji, bowiem delecja tego regionu powodowała gwałtowną redukcję transkrypcji podczas szoku termicznego [61]. Z sekwencją *HSE* wiąże się białkowy czynnik transkrypcji, tzw. *HSTF* [62, 63], który jest niezbędny do transkrypcji genów szoku termicznego, lecz wydaje się nie mieć wpływu na inne geny [61]. Czynnik *HSTF* występuje, co prawda, w komórkach nie poddawanych działaniu czynników stresujących, ale dopiero po ich zadziałaniu czynnik *HSTF* ulega modyfikacji na bliżej nieznaną drogę, która powoduje ponad 6-krotny wzrost jego aktywności [61].

V. Ubikwitynacja białek jądrowych

Nieprzypadkowe rozmieszczenie chromosomowych białek wraz z ich modyfikacjami stanowi o funkcjonalnym i strukturalnym zróżnicowaniu różnych regionów chromatyny. Modyfikację białek chromatyny poprzez ubikwitynację stwierdzono dziesięć lat temu [9], kiedy okazało się, że opisane wcześniej w nukleosomach tzw. białko *A24* [64, 65] zawiera sekwencje ubikwityny. Białko *A24*, którego nazwę zmieniono z czasem na *semihiston* lub *uH2A*, złożone jest z histonu *H2A* i ubikwityny. Ubikwityna połączona jest kowalencyjnie swoim C-końcem wiązaniem izopeptydowym z ϵ -aminową grupą lizyny w pozycji 119 histonu *H2A* — w efekcie *semihiston* jest rozwidlonym białkiem zawierającym dwa C-końce i jeden N-końiec. Zauważono, że sekwencja pięciu reszt aminokwasowych, obejmujących miejsce ubikwitynacji histonu *H2A*, jest wysoce konserwatywna we wszystkich wariantach histonu *H2A*, także u odległych ewolucyjnie gatunków [67].

Ubikwitynowana może być jedna lub obydwie cząsteczki *H2A* tego samego nukleosomu, podwójna jednak modyfikacja wydaje się rzadsza [4, 5]. Ubikwitynowane mogą być wszystkie główne warianty histonu *H2A* [70], a także histon *H2B*, choć w znacznie mniejszym stopniu [70, 71]. Ogółem 10—30% nukleosomów zawiera *semihistony* [66, 71]. Cząsteczka ubikwityny w *semihistonie H2A* ma obrót metaboliczny szybszy, aniżeli cząsteczka histonu *H2A* [71, 72]. podczas kondensacji chromosomów przed mitozą poziomu *uH2A*, a także *uH2A* gwałtownie obniża się, prawdopodobnie jako rezultat enzymatycznej deubikwitynacji nukleosomów. *Semihistony* pojawiają się w chromatynie ponownie w fazie G_1 [73, 74]. Początkowo próbowano interpretować zaobserwowane znikanie *uH2A* przed mitozą jako sygnał do kondensacji mitotycznych chromosomów. Jednakże fakt, że chromatyna nie dzielących się komórek linii *ts85* (w temperaturze 39°C), w której nie ma ubikwityny, wykazuje typowy dla interfazy rozproszony charakter sugeruje, że brak *uH2A* jest niewystarczającym czynnikiem do kondensacji chromatyny [48].

Szereg danych wskazuje na to, że podczas interfazy ubikwitynacja dotyczy przede wszystkim regionów genomu aktywnie transkrybowanych [75—77]. Na przykład stwierdzono, że w genomie muszki owocowej połowa aktywnie transkrybowanych genów *copia* ora *hsp 70* zamiast histonu *H2A* zawiera *uH2A*, podczas gdy w nietranskrybowanym satelitarnym DNA *uH2A* występuje jedynie sporadycznie [75]. Wykazano także preferencyjną ubikwitynację nukleosomów blisko końca 5' aktywnie transkrybowanego genu mysiej reduktazy dihydrofolanowej [77].

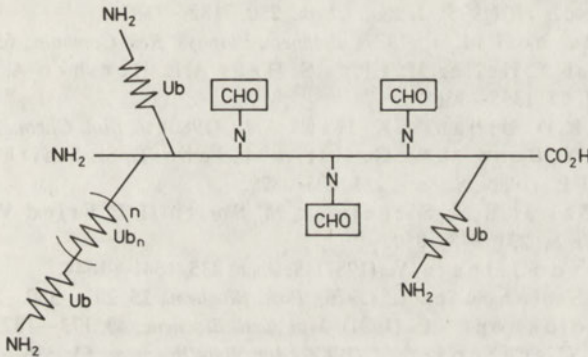
Strukturalne konsekwencje zastąpienia histonów *H2A* (albo *H2B*) w nukleosomach przez *uH2A* (lub *uH2B*) są stosunkowo nieznaczne. Przede wszystkim monokluesomy zawierające *uH2A* są strukturalnie bardzo podobne do nukleosomów zawierających histony *H2A* [69, 78] i przy braku dodatkowych modyfikacji nie są preferencyjnie trawione, ani przez DNAazę I [69], ani przez

nukleazę gronkowcową [75]. Jednak, zarówno dane krystalograficzne, jak i dane uzyskane za pomocą metody chemicznego sprzęgania, wskazują na lokalizację ubikwityny w cząsteczkach *uH2A* na powierzchni nukleosomów [79, 80]. Takie położenie ubikwityny prawdopodobnie umożliwia modyfikowanie przez nią interakcji nukleosomów, co może wpływać na przebieg transkrypcji. Na podstawie tych danych sugerowano, że obecność semihistonów w chromatynie ma bezpośredni związek z zależną od ubikwityny degradacją histonów [75, 76]. Ale jednocześnie zwrócono uwagę, że te same dane doświadczalne nie wykluczają innej roli ubikwitynacji nukleosomów, nie związanej z degradacją histonów. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że w cząsteczce *uH2A* obrót metaboliczny ubikwityny jest szybszy niż histonu *H2A* [71, 72]. Sugeruje się w nowszych pracach, że ubikwityna może wyznaczać specyficzne regiony chromatyny do wiązania niezidentyfikowanych czynników (ligandów), niekoniecznie zaangażowanych w procesy proteolizy, lecz na przykład w takie, jak transkrypcja lub naprawa DNA [37, 49]. Dogodnym materiałem do badania udziału ubikwityny w procesach naprawy DNA jest gen *RAD6* drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [81, 82, 83]. Duża zmienność fenotypów uzyskiwanych mutantów tego genu sugerowała, że jego białkowy produkt może być niezbędny do takich procesów jak naprawa DNA czy sporulacja. Stwierdzono, że gen *RAD6* rzeczywiście koduje jeden z kilku strukturalnie zbliżonych enzymów, katalizujących kowalencyjne przyłączanie ubikwityny do różnych białek (tzw. enzymy E2, Ryc. 3) [81]. Drożdże syntetyzują co najmniej 5 oddzielnych enzymów typu E2, których geny tworzą rodzinę genów *UBC* (ubiquitin-conjugating enzymes). W związku ze stwierdzoną *in vitro* substratową specyficznością białka *RAD6* (katalizuje ubikwitynację histonu H2B) wysunięto przypuszczenie, że białko *RAD6* indukuje *in vivo* strukturalne zmiany chromatyny (określane terminem „chromatin remodelling”), które umożliwiają enzymom naprawczym dostęp do uszkodzonych regionów DNA [81]. Pozostaje jednak nadal do wyjaśnienia, czy proces ten jest rezultatem proteolitycznej degradacji ubikwitynowanych histonów, czy też jest bezpośrednią konsekwencją strukturalnych zmian wywołanych ubikwitynacją białek chromatyny. Ze względu na ewolucyjny konserwatyzm metabolizmu ubikwityny można przypuszczać, że wnioski odnośnie roli ubikwitynacji u drożdży dotyczą również komórek innych eukariontów. Stwarza to interesującą możliwość spekulacji, czy niektóre typy choroby *Xenoderma pigmentosum* u człowieka, które cechują defekty naprawczej syntezy DNA, nie wynikają z mutacji genu kodującego jeden z enzymów biorących udział w koniugacji ubikwityny [81]. Spekuluje się także, że być może przynajmniej niektóre rodzaje komórek nowotworowych mają zmieniony metabolizm ubikwityny [82].

VI. Ubikwitynacja białek powierzchni komórkowej

Mimo, że wyniki badań nad ubikwityną przyzwyczyli badaczy do jej nadzwyczaj szerokiej strefy wpływów w komórce, wykrycie jej obecności na powierzchni błony komórkowej stanowiło sporą niespodziankę [12, 13, 84].

Okazało się, że ubikwityna jest częścią specyficznego receptora, określanego w literaturze jako "homing receptor", występującego na powierzchni limfocytów penetrujących tkanki limfoidalne przed nabyciem immunologicznej kompetencji. Penetracja tkanek limfoidalnych przez te limfocyty odbywa się poprzez pokapilarny układ żylny (HEV). Obecność "homing receptor" na powierzchni specyficznych limfocytów umożliwia utrzymanie się ich w danej tkance aż do pełnego zróżnicowania [85, 86]. W pracowni Weissmana uzyskano przeciwciało, tzw. MEL-14, które rozpoznawało "homing receptor" mysich węzłów chłonnych [12, 13]. Rozpoznawany przez przeciwciało MEL-14 "homing receptor" okazał się glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 90 000 (określona jako białko $gp90^{MEL-14}$), której jeden z końców odpowiada dokładnie N-końcowi ubikwityny. Na rycinie 4 przedstawiono hipotetyczną strukturę białka $gp90^{MEL-14}$, w której cząsteczki ubikwityny połączone są wiązaniem izopeptydowym z rdzeniem polipeptydowym tworząc rozgałęzioną strukturę [12]. Nie ustalono jeszcze liczby cząsteczek ubikwityny związanej z rdzeniem tego receptora. Pewne dane wskazują, że determinanta antygenowa receptora $gp90^{MEL-14}$ obejmuje sekwencje ubikwityny znajdujące się blisko C-końca glikoproteinowego rdzenia.



Ryc. 4. Hipotetyczna struktura białka $gp90^{MEL-14}$. Ub — ubikwityna, CHO — miejsce glikozylacji 12

Przypuszcza się, że ubikwityna uczestniczy w zachodzących z udziałem "homing receptor" interakcjach specyficznych limfocytów [12, 13]. Nie można jednak wykluczać jej udziału w szybkiej degradacji receptorów, czego następstwem byłoby uwalnianie specyficznych limfocytów po ukończonym dojrzewaniu.

Dane uzyskane dzięki użyciu monoklonalnych przeciwciał wskazują, że także inne białka błonowe mogą ulegać ubikwitynacji [12, 85], jak na przykład receptor płytkowego czynnika wzrostowego [87].

Nie wyjaśniono drogi, którą ubikwityna dostaje się na powierzchnię komórki. Biorąc pod uwagę, że ubikwityna nie zawiera typowej dla sekrecyjnych N-końcowej sekwencji sygnałnej, wydaje się prawdopodobne, że receptory ulegają ubikwitynacji jeszcze podczas syntezy w cytoplazmie [12].

W związku z prowadzeniem w wielu wiodących laboratoriach intensywnych badań nad ubikwitiną należy przypuszczać, że wkrótce poznamy bliższe szczegóły dotyczące roli i mechanizmów działania tego niezwykle, wszędzie obecnego białka.

Artykuł otrzymano 24 listopada 1987 r.

Zaakceptowano do druku 19 maja 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Schlesinger D.H., Goldstein G., Niall D., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2214—2218.
2. Goldstein G., Hemmerling U., Boyse E.A., Schlesinger D.H., Niall H.D., (1975), *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 11—15.
3. Ökaynak E., Finley D., Varshavsky A., (1984), *Nature*, **312**, 663—666.
4. Goldstein G., (1974), *Nature*, **274**, 11—14.
5. Busch R.S., Goldstein G., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**, 1474—1478.
6. Gavilanes J.G., DeBuitrago G.G., Perez-Castells R., Rodriques R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10276—10270.
7. Watson D.C., Levy B.W., Dixon G.H., (1978), *Nature*, **267**, 196—198.
8. Goldknopf I.L., Taylor C.W., Baum R.M., Yeoman L.C., Olson M., Prestayko A.W., Busch H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7182—7187.
9. Hunt L.J., Dayhoff M.O., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 951—960.
10. Ciechanover A., Heller H., Elias S., Haas A.L., Hershko A., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1365—1368.
11. Wilkinson K.D., Urban M.K., Haas A.L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7529—7532.
12. Siegelman M., Bond M.W., Gallatin M., John T., St., Smith H.T., Fried V., Weissman I.L., (1986), *Science*, **231**, 823—829.
13. John T. St., Gallatin M., Siegelman M., Smith H.T., Fried V.A., Weissman I.L., (1986), *Science*, **231**, 845—850.
14. Mori H., Kondo J., Ihara Y., (1987), *Science*, **235**, 1641—1644.
15. Klyszejko-Stefanowicz L., (1979), *Post. Biochem.*, **25**, 287—350.
16. Busch H., Goldknopf I.L., (1981), *Mol. Cell. Biochem.*, **40**, 173—187.
17. Hershko A., Ciechanover A., (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 335—364.
18. Hershko A., (1983), *Cell*, **34**, 11—12.
19. Dworkin-Rastl E., Shrutkowski A., Dworkin M.B., (1984), *Cell*, **39**, 321—325.
20. Arribas C., Sampedro J., Izquierdo M., (1986), *Nucl. Acids Res.*, **14**, 119—127.
21. Bond U., Schlesinger M.J., (1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 949—956.
22. Wiborg O., Pedersen M.S., Wind A., Berlung L.E., Marcker K.A., Vuust J., (1985), *EMBO J.*, **4**, 755—759.
23. Lund P.K., Moats-Staats B.M., Simmons J.G., Hoyt E., D'Ercole A.J., Van Wyk J.J., (1985), *J. Biol. Chem.* **260**, 7609—7613.
24. Baker R., Board P., (1987), *Nucl. Acids Res.*, **15**, 443—463.
25. Gausing K., Barkardottir R., (1986), *Eur. J. Biochem.*, **158**, 57—62.
26. Marx J.L. (1986), *Science*, **231**, 797.
27. Pickart C.M., Rose I.A., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7903—7910.
28. Scheller R.H., (1983), *Cell*, **34**, 7—22.
29. Hanecak R., (1984), *Cell*, 1063—1073.
30. Campbell P.N., Blobel G., (1976), *FEBS Lett.*, **72**, 215—226.
31. Kurjan J., Herskowitz I., (1982), *Cell*, **3**, 933—943.
32. Hoyt M.A., Knight D.M., Das A., Miller H.I., Echols H., (1982) *Cell*, **31**, 565—573.
33. Little J.W., Mount D.W., (1982), *Cell*, **29**, 11—12.

34. Goldberg A. L., John A. C. St., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 747—803.
35. Hershko A., Ciechanover A., Heller H., Haas A. L., Rose I. A., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1783—1786.
36. Hershko A., Heller H., Elias S., Ciechanover A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 8206—8214.
37. Atidia J., Kulka R. G., (1982), *FEBS Lett.*, **142**, 72—76.
38. Finley D., Varshavsky A., (1985), *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 343—347.
39. Hershko A., Heller H., Eytan E., Reiss Y. J., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 11992—11999.
40. Matsui S., Sandberg A. A., Negoro S., Seon B. K., Goldstein G., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1535—1539.
41. Hershko A., Heller H., Eytan E., Kaklij E. G., Rose I. A., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7021—7025.
42. Bachamir A., Finley D., Varshavsky A., (1986), *Science*, **234**, 179—186.
43. Kolata G., (1986), *Science*, **234**, 151—152.
44. Ciechanover A., Wolin S. L., Steitz J. A., Lodish H. F., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1341—1345.
45. Ferber S., Ciechanover A., (1987), *Nature*, **326**, 808—810.
46. Kaji A., Kaji H., Novelli G. D., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 1185—1190.
47. Ferber S., Ciechanover A., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 3128—3134.
48. Mita S., Yasuda H., Marunoucki T., Ishoko S., Yamada M., (1980), *Exp. Cell Res.*, **126**, 407—417.
49. Finley D., Ciechanover A., Varshavsky A., (1984), *Cell*, **37**, 43—55.
50. Ciechanover A., Finley D., Varshavsky A., (1984), *Cell*, **37**, 57—66.
51. Yasuda H., Matsumoto Y., Mita S., Marunoucki T., Yamada M., (1981), *Biochemistry*, **20**, 4414—4419.
52. Matsumoto Y., Yasuda H., Marunoucki T., Yamada M., (1983), *FEBS Lett.*, **151**, 139—142.
53. Croy R. G., Perdee A. B., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4699—4703.
54. Oren H., Levina A. J., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 56—59.
55. Evans T., Rosenthal E. T., Youngblom J., Distel D., Hunt T., (1983), *Cell*, **33**, 389—396.
56. Masui Y., Markert C. I., (1971), *J. Exp. Zool.*, **177**, 129—145.
57. Pelham H., (1985), *Trends Genet.*, **1**, 31—35.
58. Anathan J., Goldberg A. L., Voellmy R., (1986), *Science*, **232**, 522—524.
59. Munro S., Pelham H., (1985), *Nature*, **317**, 477—478.
60. Pelham H., (1982), *Cell*, **30**, 517—528.
61. Parker C. S., Topol J., (1984), *Cell*, **37**, 273—283.
62. Wu C., (1984), *Nature*, **311**, 81—84.
63. Wu C., (1984), *Nature*, **309**, 229—234.
64. Goldknopf I. L., Busch H., (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 864—868.
65. Goldknopf I. L., French M. E., Musso R., Busch H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5492—5495.
66. Goldknopf I. L., Busch H., (1978), w *The Cell Nucleus*, w red. Busch C. H., część IV, 149—180, Academic Press, New York.
67. Choe D. T., Kolodrubetz D., Grunstein M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1484—1487.
68. Levinger L., Varshavsky A., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3244—3248.
69. Kleinschmidt A. M., Martinson H. G., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 2423—2431.
70. Hatch C. L., Bonner W. M., Moudrinakis E. N., (1984), *Science*, **221**, 468—470.
71. Wu R. S., Kohn K. W., Bonner W. M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5916—5920.
72. Seale R. L., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 3151—3158.
73. Matsui S., Seon B. K., Sandberg A. A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6386—6390.

74. Mueller R.D., Yasuda H., Hatch C.L., Bonner W.M., Bradbury E.M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5147—5153.
75. Levinger L., Varshavsky A., (1982), *Cell*, **28**, 375—385.
76. Varshavsky A., Levinger L., Sundin O., Barsoum J., Özkaynak E., Swerdlow P., Finley D., (1983), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 511—528.
77. Barsoum J., Varshavsky A., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7688—7697.
78. Levinger L., Barsoum J., Varshavsky A., (1981), *J. Mol. Biol.*, **146**, 287—304.
79. Carter C.W. Jr., Levinger L., Birinyi F., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 748—754.
80. Klug A., Rhodes D., Smith J., Finch J.T., Thomas J.O., (1980), *Nature*, **287**, 509—515.
81. Jentsch S., Mc Grath J.P., Varshavsky A., (1987), *Nature*, **329**, 132—134.
82. Sedgwick S., Johnston L., (1987), *Nature*, **329**, 109.
83. Reynolds P., Weber S., Prakash L., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 168—172.
84. Marx J.L., (1986), *Science*, **231**, 797.
85. Gallatin M., John T.P. St., Siegelman M., Reichert R., Burcher E.C., Weissman I.L., (1986), *Cell*, **44**, 673—680.
86. Gallatin W.M., Weissman I.L., Butcher E.C., (1983), **304**, 30—34.
87. Kuang W.J., Yang-Feng T.L., Daniel T.O., Tremple P.M., Cleu E.Y., Ando M.E., Harkins R.N., Francke U., Friend V.A., Williams L.T., (1986), *Nature*, **323**, 227—232.

MAŁGORZATA PORĘBSKA-BUDNY*, JACEK P. DWORZAŃSKI**

Tyrozynaza-oksydoreduktaza; monofenol, o-difenol : O₂

Tyrosinase-oxidoreductase; monophenol, o-diphenol : O₂

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Występowanie tyrozynazy
- III. Właściwości enzymu
 - III-1. Polimorfizm
 - III-2. Masa cząsteczkowa, skład aminokwasowy enzymu, glikoproteinowy charakter tyrozynazy
 - III-3. Struktura centrum aktywnego enzymu
- IV. Katalityczna funkcja tyrozynazy
 - IV-1. Specyficzność substratów
 - IV-2. Inhibitory
 - IV-3. Mechanizmy reakcji enzymatycznych
- V. Biologiczna rola tyrozynazy
 - V-1. Melanogeneza u ssaków
 - V-2. Sklerotyzacja kutikuli owadów
 - V-3. Metabolizm u roślin
- VI. Uwagi końcowe

Contents

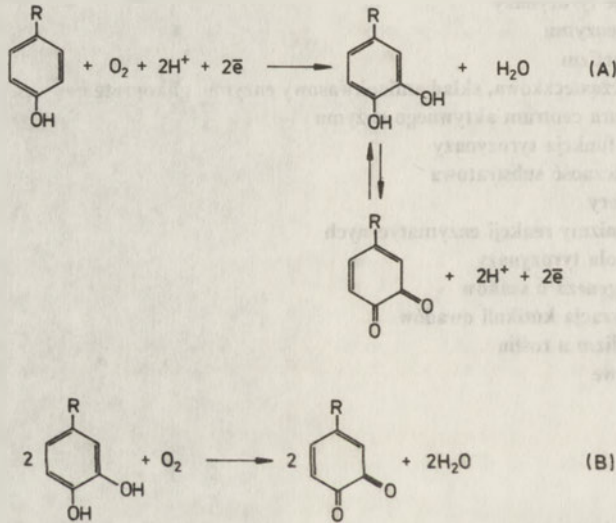
- I. Introduction
- II. Occurrence of tyrosinase
- III. Properties of the enzyme
 - III-1. Polymorphism
 - III-2. Molecular mass, amino acids composition of the enzyme, and its glycoprotein nature
 - III-3. Structure of the active site of the enzyme
- IV. Catalytic function of tyrosinase
 - IV-1. Substrate specificity
 - IV-2. Inhibitors
 - IV-3. Mechanisms of enzymatic reactions
- V. Biological role of tyrosinase
 - V-1. Melanogenesis in mammals
 - V-2. Sclerotization of insects cuticle
 - V-3. Metabolism in plants

*Mgr, **Dr, Katedra Biochemii i Biofizyki, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec.

Wykaz stosowanych skrótów: acetyloCoA — acetylokoenzym A; cysteinilo-DOPA — cysteinilo-3, 4-dihydroksyfenyloalanina; DOPA — 3, 4-dihydroksyfenyloalanina; DOPA-chinon-4-/2-karboksy-2-aminoetylo/-1, 2-benzochinon; DOPA-chrom — 2-karboksy-2, 3-dihydroindolo-5, 6-chinon; dopamina — 2-/3, 4-dihydroksyfenylo/-etyloamina; EDTA — etylenodiaminotetraoctan; Fuk — fukoza; Gal — galaktoza, GERL — układ: aparat Golgiego-siateczka endoplazmatyczna-lizosom; GluNAc — N-acetyloglukozoamina; leuko-DOPA-chrom — kwas 2, 3-dihydro-5, 6-dihydroksyindolo-2-karboksyowy; Man — mannoza; NADPH — zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; Sia — kwas sjałowy.

I. Wprowadzenie

Tyrozynaza jest enzymem biorącym udział w biosyntezie melanin i innych związków polifenolowych zarówno u roślin jak i u zwierząt [1—4]. Enzym jest miedzioproteiną katalizującą hydroksylację monofenoli do o-difenoli (Reakcja A na Ryc. 1) oraz utlenianie o-difenoli do o-chinonów (Reakcja B na Ryc. 1) [5].



Ryc. 1. Reakcje katalizowane przez tyrozinazę: A — hydroksylacja monofenoli do o-difenoli (aktywność monofenolazowa (krezolazowa) enzymu), B — utlenianie o-difenoli do o-ochinonów (aktywność difenolazowa (katecholazowa) enzymu)

W klasyfikacji Międzynarodowej Unii Biochemicznej tyrozinaza, jako enzym dwufunkcyjny, otrzymała dwa numery: EC 1.14.18.1 jako hydroksylaza (monooksygenaza) monofenolowa i EC 1.10.3.1 jako oksydaza katecholowa [6]. Hydroksylaza p-kumaranu (EC 1.14.17.2), zgodnie z wynikami badań McIntyre i Vanghana [7], jest typową tyrozinazą, której aktywność hydroksylazowa pojawia się w obecności askorbinianu jako kofaktora redukującego.

Monooksygenazy zawierają grupy prostetyczne o różnej strukturze, wśród których dominują flawiny (np. hydroksylaza fenolowa, EC 1.14.13.7 [8]), żelazo

hemowe (np. peroksydaza, EC 1.11.1.7. [9]) i niehemowe (np. hydroksylaza tyrozynowa, EC 1.14.16.2 [10]). Natomiast miedź, wchodząca w skład grupy prostetycznej tyrozynazy, występuje jedynie w nielicznych innych monooksygenazach (np. β -hydroksylaza dopaminowa, EC 1.14.17.1 [11]). Tyrozynaza nie wymaga współdziałania zewnętrznych kofaktorów do ujawnienia swej aktywności enzymatycznej, co obserwujemy w przypadku hydroksylazy tyrozynowej (tetrahydropterydyna) cytochromu P-450 (NADPH), a także innych „zewnętrznych” hydroksylaz. Monofenolazowa aktywność tyrozynazy jest bowiem sprzężona z aktywnością difenolazową, dostarczającą dwu elektronów niezbędnych dla aktywności enzymatycznej jako hydroksylazy (Reakcja A na Ryc. 1). Stąd tyrozynaza bywa również określana jako „wewnętrzna” monooksygenaza. Tyrozynaza będąca przedmiotem niniejszego opracowania to oksydoreduktaza; monofenol, o-difenol: O₂.

II. Występowanie tyrozynazy

Tyrozynaza jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Tyrozynaza występuje w różnych grzybach, a zwłaszcza w promieniowcach (*Streptomyces glaucescens*, *nigrificans*) [12], [13], workowcach (*Neurospora crassa*) [14—16] i podstawczakach (*Boletus*, *Russula*, *Agaricus bisporus*) [17—19], oraz w mniejszym stopniu w bakteriach (*Vibrio tyrosinaticus*) [20] i glonach. Enzym ten jest również rozpowszechniony u roślin wyższych, przy czym bulwy ziemniaka [21, 22], owoce jabłoni [23], bobu i korzenie buraka [24] są szczególnie bogatym źródłem enzymu. U bezkręgowców tyrozynaza występuje głównie w hemolimfie i kutikuli stawonogów (*Cancer pagurus*, różne gatunki owadów) [25], [26] i gruczole atramentowym kałamarnicy (*Sepia officinalis*) [1]. Z kolei u niższych kręgowców, enzym ten znajduje się zwłaszcza w melanoforach ryb (*Xiphophorus*) oraz naskórku płazów (*Rana esculenta ridibunda*, *Xenopus laevis*) [27—29]. U wyższych kręgowców, tyrozynaza występuje w w melanosomach i pęcherzykach cytoplazmatycznych melanocytów naskórka, mieszków włosowych, niektórych upigmentowanych tkankach oka, ucha i centralnego układu nerwowego ssaków oraz w piórach ptaków. Melanosomy są subkomórkowymi organellami znajdującymi się w cytoplazmie komórek barwnikowych (melanocytów) [30], [31]. Składnikami melanosomów są, oprócz tyrozynazy, białka strukturalne matriks, fosfolipidy oraz melanina. Należy jednak podkreślić, że tyrozynaza jest najbardziej aktywna w premelanosomie, tj. najwcześniejszej postaci melanosomu oraz w melanosomie znajdującym się w stadium I rozwoju [32]. W miarę melanizacji melanosomu (stadia II—IV rozwoju), aktywność tyrozynazy maleje [33, 34]. Obecność tego enzymu w innych frakcjach subkomórkowych, a zwłaszcza we frakcji mikrosomalnej, wynika z występowania połączeń tyrozynazy z gładkimi lub szorstkimi błonami siateczki endoplazmatycznej oraz z jej gromadzenia w aparacie Golgiego [30, 35—37]. Tyrozynaza jest syntetyzowana na powierzchni układu: aparat Golgiego — siateczka endoplazmatyczna — lizosom (GERL) [38 — 41], w rybosomach

związanych z błonami szorstkimi siateczki w postaci proenzymu [34]. Glikozylacja tyrozynazy, a w szczególności przyłączenie kwasu sjałowego zachodzi przed osiągnięciem przez enzym aparatu Golgiego [42, 43].

Obecność tyrozynazy w melanocytach czerniaka złośliwego (melanoma malignum) u ludzi, ujawnia się także znacznie podwyższonym poziomem aktywności enzymu w plazmie krwi oraz występowaniem tyrozynazy w moczu u pacjentów [44—50].

III. Właściwości enzymu

III-1. Polimorfizm

Oczyszczone preparaty tyrozynazy charakteryzują się znaczną heterogennością [19, 44, 51]. Niejednorodność tyrozynazy z pieczarek (*Agaricus bisporus*) ujawniono stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym oraz chromatografię na hydroksypatycie [52]. Przy zastosowaniu tych metod można wydzielić cztery frakcje o właściwościach tyrozynazowych, oznaczane cyframi rzymskim (I—IV) lub literami alfabetu greckiego (α , β , γ , δ), S t r o t h k a m p i w s p. [53] wykazali obecność podjednostki ciężkiej (H) o masie cząsteczkowej 43 000 oraz lekkiej (L) o masie cząsteczkowej 13 400, które mogą tworzyć agregaty typu M_2L_2 , ML, M_2L , itp. determinujące heterogenność tyrozynazy z pieczarek. Badania nad tyrozynazą z *Neurospora crassa* pozwoliły na wyizolowanie i scharakteryzowanie dwu allelicznych postaci enzymu, oznaczanych jako TL (termolabilna) i TS (termostabilna), które różnią się również ruchliwością

Tabela 1

Charakterystyka izoenzymów tyrozynazy wyizolowanych z czerniaka złośliwego ssaków

Izoenzym	Charakterystyka	Masa cząsteczkowa
T3	Izoenzym prekursorowy w odniesieniu do tyrozynazy T1 i T4	54000—70000 [44, 57, 58] (56000—62000 [55, 58, 59])
T1	Izoenzym powstający przez przyłączenie kwasu sjałowego i cukrów obojętnych (mannoza, galaktoza, fukoza) do tyrozynazy T3	70000—85000 [44, 57, 58] (65000—81000 [55, 58, 59])
T4	Izoenzym powstający przez zespolenie tyrozynazy T1 ze składnikami błony melanosomu	około 102000 [55, 58, 59]
T2	Prawdopodobnie artefakt powstający przez dezamidację tyrozynazy T3 w warunkach elektroforezy	—

elektroforetyczną [54]. Z tkanek czerniaka złośliwego ssaków wyizolowano cztery izomery tyrozynazy (T1, T2, T3, T4), których charakterystykę podano w tabeli 1. Enzym nierozpuszczalny, związany z melanosomem, określane jako tyrozynaza T4, stanowi około 80% całkowitej aktywności tyrozynazowej, podczas gdy rozpuszczalne izoenzymy T1, T2, T3 stanowią pozostałe 20%.

Badania elektroforetyczne, kinetyczne oraz analiza aminokwasowa ujawniły, że komponenta białkowa poszczególnych izoenzymów nie różni się ani składem aminokwasowym, ani właściwościami kinetycznymi, ani też selektywnością substratową. Przyczyną różnic są głównie zmiany potranslacyjne, które uwidaczniają się w zawartości składników węglowodanowych [55, 56].

III-2. Masa cząsteczkowa, skład aminokwasowy enzymu, glikoproteinowy charakter tyrozynazy

Masy cząsteczkowe tyrozynaz różnego pochodzenia wynoszą od 30 900 (*Streptomyces glaucescens*) do 80 000 (człowiek) w przeliczeniu na monomer enzymu (Tab. 2). Można zauważyć, że masy cząsteczkowe enzymu wzrastają w miarę rozwoju ewolucyjnego organizmu.

W ostatnich latach przeprowadzono szczegółowe badania nad strukturą pierwszorzędową tyrozynaz z promieniowca *Streptomyces glaucescens* [60], workowca *Neurospora crassa* [61, 62] oraz melanocytów naskórka myszy [63]. Pozwoliły one na porównanie struktury pierwszorzędowej enzymu wraz z zestawieniem homologicznych sekwencji. Dane literaturowe umożliwiły również porównanie położenia reszt histydyny wiążących miedź w centrum aktywnym enzymu oraz położenia, ulegających glikozylacji, reszt asparaginy (Ryc. 2).

Stwierdzono, że cząsteczka tyrozynazy ze *Streptomyces glaucescens* składa się z 273 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 30 900 [60]. Enzym ten nie zawiera cysteiny, a zawiera wiele reszt argininy (9,9%). Dziesięć spośród 27 reszt argininy występuje w parze z resztą argininy lub lizyny. Tyrozynaza z *Neurospora crassa* jest monomerycznym białkiem zawierającym 407 reszt aminokwasowych o łącznej masie cząsteczkowej 46 000 [61], [62]. Tyrozynaza ta nie zawiera cysteiny, a zawiera wiele reszt seryny [14], 12 reszt tryptofanu i 20 reszt tyrozyny [64] oraz 10 ugrupowań histydyny [65] (niekiedy w pracach autorzy podają 9 pomimo, że na rycinach wpisują 10 reszt histydyny). Ocena właściwości fluorescencyjnych enzymu ujawniła niejednorodność w otoczeniu ugrupowań tryptofanu [66]. Wykazano, że jedna trzecia takich reszt jest bezpośrednio połączona z kwasem asparaginowym, a pozostałe dwie trzecie stanowią zewnętrzne ugrupowania tryptofanu [64]. Z kolei, tyrozynaza melanocytów naskórka myszy składa się z 513 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej 57 873 [63]. Podczas jej dojrzewania, odłącza się od protyrozynazy 24—aminokwasowy peptyd sygnałowy [67], który zawiera głównie aminokwasy o charakterze hydrofobowym.

Analizując sekwencje aminokwasowe tyrozynaz ze *Streptomyces glaucescens*, *Neurospora crassa* oraz melanocytów naskórka myszy, które przedstawiono na rycinie 2, można wyróżnić 6 fragmentów łańcuchów polipeptydowych zawierają-

Tabela 2

Charakterystyka tyrozynaz różnego pochodzenia

Pochodzenie tyrozynazy	Łańcuch	Masa cząsteczkowa	Liczba aminokwasów	Liczba atomów Cu	Piśmiennictwo
<i>Streptomyces glaucescens</i>	Monomer	30900	273	2	60
<i>Neurospora crassa</i>	Monomer	46000	407	2	61, 62
<i>Agaricus bisporus</i>	Tetramer	123000	—	4	68
<i>Rana esculenta ridibunda</i>	Tetramer	210000	—	—	29
Mysz (melanocyty naskórka)	Monomer	57873	513+24 — aminokwasowy peptyd sygnałowy	2	63, 68
Mysz (czerniak linii Harding-Passey)	Monomer	72700±500* 74000±1800**	—	2	69
Mysz (czerniak linii B16)	Monomer	73000±800* 74000±1000**	—	2	69
Chomik (czerniak)	Monomer (4 łańcuchy cukrowe przyłączone do łańcucha polipeptydowego enzymu poprzez cząst. Asn)	69000	—	2	70
Człowiek (melanocyty naskórka)	Monomer (13% cukrów oboj. i 4,8% kw. sjałowego)	80000	—	2	71, 72

* Wyniki oznaczania metodą poliakryloamidowej elektroforezy żelowej.

** Wyniki oznaczania metodą filtracji żelowej (Sephadex G-150).

cych sekwencje aminokwasowe o znacznej homologii. W cząsteczkach wszystkich trzech tyrozynaz, w wymienionych fragmentach łańcuchów polipeptydowych można wyróżnić, oprócz identycznie zestawionych pojedynczych aminokwasów takich jak: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, arginina, walina, tryptofan, leucyna i prolina, homologicznie ułożone pary aminokwasów takie

1	QFPRECANI EALRRGVCCPDLL PSSGPGT DPCGSSSSGRGRCVAVI ADSR	I
50	PHSRHYPHDGKDDREAWPLRF FNR TCQCND N FSGHNCGTCRPGWRGAA	I
1	STDIKFAITGVPT TPSSNGA	II
98	CNQKIL TVRRNL DL SPEEKSHFVRAL DMAKRT THPOFV IATRRELDI	I
21	VPLRREL RDL QONYPEQF NL YL L GLR DFQGLD EAKL	II
1	TVRKNQAT LTAD EKRRFV AAVL	III
147	GPDGNTPOF ENI SVVNYF VVTHYYSVKK TFLGTGQESFG	I
57	DS YQVA GIHGMPFKPWAGVPSDTQWSQ	II
23	EL KRSGR YDEFVTTHNAFI	III
192	EGPA	I
85	PGSSGFGGYYCTHSSILFITWHRPYLALYEQALYASVQAVAKFPVEGGL	II
47	AGER TGRSPSFLPWHRYLLEFERAL OSVDA	III
229	TGKNVC DVCTDDL MGRSINFDSL ISPNSVFSQWRVYVCE SLEEYD	I
134	RAKYVAAAKDFRAPHYFDWASQPP KGTLAFPESSSR TIQVVDVDGKTK	II
79	SVALPYWDW SADRTARASLWA	III
274	TL GTLC NSTEGGP IRRNPA GNVGRP AVORLPEPQDVTQCL EVRV	I
182	SINNPLH RFT FHPV NPSPGNFS AAWSRYPSTVRYPNRLPGASRD	II
100	PDFLGGTGRSL DGRV MDGP FA ASAGNWEINVRVD GRAYLRSL	III
318	FDTPPFYS NSTDSFRNTVEGYSAPT GKYDP AVRSLH	I
226	ERIALPILAD ELASLRINNVISLLL SYKDFDAFSYNRWDPTNP GDFGSLE	II
143	GTA VR EL PTRA EIVGSVLGMATYDTAPWNSASDGRFNHLEGWRGV	III
354	NLAHLFLNGTGGQTHLS PNDPIFVLLHITFTDAVFDWM	I
275	AVHNEI HDRTGGNGHMSSELEVSAPDPLFWLHIVNYDRLWSI WCDLN PMS	II
187	NLHNRVHVWVGG RM ATGMSPNDPFWLHHAYVDRLWAEWDRRHPGS	III
391	LRRYNA DISTFPLENAPIGHNROYNMVPFWP PVTN TEMFVTAPD	I
324	FMTPRPA PYSTFYAQEG ESQSKSTPLEPFWDKSAANFWITSEQVKDSI	II
233	GYLPAAGTPOVDLNDRM KPWNDSPADLL DHTAHYTFDID	III
435	NLGYAY EVQ WPGQEFV SEIITI AVVAALLLVAAIFGVASCLIR	I
371	TFGYAYPETQKW KYSSVKEYQAARKSVTALY GSNVF	II
479	SRSTKNEANQPLL TDHYQR YAEDYEELPNP N HSMV	I

Ryc. 2. Sekwencja aminokwasowa tyrozynazy wyizolowanej z: I — melanocytów naskórka myszy, II — *Neurospora crassa*, III — *Streptomyces glaucescens* [wg 60—63, zmodyf.]. ● — aminokwasy identyczne; + — aminokwasy podobne chemicznie; N — miejsca glikozylacji enzymu przy udziale cząsteczki asparaginy; H (histydyna) — prawdopodobne ligandy wiążące miedź w centrum aktywnym enzymu. Duże prostokąty oznaczają fragmenty łańcuchów polipeptydowych enzymu zawierające sekwencje aminokwasowe o znacznej homologii

jak: glicyna-glicyna, kwas asparaginowy-prolina, fenyloalanina-leucyna. Na uwagę zasługuje występowanie sekwencji tripeptydowej: tryptofan-histydyna-arginina (WHR) oraz pentapeptydowej: fenyloalanina-tryptofan-leucyna-histydyna-histydyna (FWLHH), które powtarzają się we wszystkich trzech białkach enzymatycznych (z tym wyjątkiem, że w tyrozynazie melanocytów myszy tryptofan w pozycji 275 tej sekwencji jest zastąpiony walina). Ponadto należy zaznaczyć, że dwie z wymienionych sekwencji zawierają histydyny, które są ligandami dwu jonów miedzi w centrum aktywnym tyrozynazy.

Tyrozynaza jest glikoproteiną zawierającą kwas sjałowy oraz cukry obojętne (mannoza, galaktoza, fukoza) [72—75], które razem stanowią około 20% masy cząsteczkowej enzymu. Budowa łańcuchów cukrowych tyrozynazy wyizolowanej z upigmentowanych tkanek ssaków została stosunkowo dobrze poznana (Tab. 2). Dla przykładu, tyrozynaza wyizolowana z czerniaka chomika zawiera 4 łańcuchy cukrowe przyłączone do łańcucha polipeptydowego enzymu poprzez cząsteczkę asparaginy. Jeden z nich jest łańcuchem typu wysokomannozowego [$\text{Man}_3 \sim \text{GluNAc}_2$], a trzy pozostałe są łańcuchami typu złożonego [$\text{Man}_3 \cdot \text{GluNAc}\beta 1 \rightarrow 4 (\pm \text{Fuk}\alpha 1 \rightarrow 6)$]. Rozgałęzienia łańcuchów typu złożonego zbudowane są głównie z $\pm \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GluNAc}\beta \rightarrow$ [70].

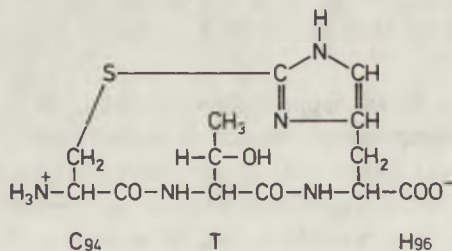
W cząsteczce tyrozynazy melanocytów myszy wykazano 7 miejsc, w których może ona ulegać glikozylacji. Są to miejsca typu Asn-X-Thr [76], gdzie X może być każdym z aminokwasów oprócz proliny [77]. Miejscami glikozylacji są reszty asparaginy w pozycjach 72, 80, 157, 280, 326, 361 i 509 tej tyrozynazy [63] (Ryc. 2).

III-3. Struktura centrum aktywnego enzymu

Jony miedzi są istotnymi kofaktorami wielu białek zaangażowanych w reakcje redoks oraz w wiązanie i aktywację tlenu cząsteczkowego. Antyferromagnetycznie sprzężona para jonów miedzi w tyrozynazie warunkuje jej pełną aktywność enzymatyczną [68], [78—80]. Ligandami wiążącymi obydwie jony miedzi są reszty histydyny w centrum aktywnym tyrozynazy [81], przy czym wyróżnia się miejsce o większym i miejsce o mniejszym powinowactwie wobec jonów miedzi (CuA i CuB) [60, 82].

Tyrozynaza *Neurospora* zawiera w pozycji 96 histydynę, która połączona jest z cysteiną w pozycji 94 poprzez wiązanie tioeterowe [62] (Ryc. 3). Takie wiązanie najprawdopodobniej wyklucza oddziaływanie grupy sulfhydrylowej z jonami miedzi. Przypuszcza się, że histydyna w położeniu 96 bierze udział w regulacji aktywności enzymu *Neurospora*.

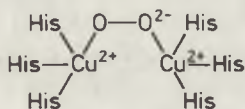
Wykorzystując reakcje fotoutleniania w obecności błękitu metylenowego zbadano rolę reszt histydyny jako ligandów dwu jonów miedzi w tyrozynazie



Ryc. 3. Struktura chemiczna mostka tioeterowego w tyrozynazie *Neurospora crassa*. Siarka reszty cysteiny w położeniu 94 jest kowalencyjnie połączona z pierścieniem imidazolowym reszty histydyny w położeniu 96 [wg 62, zmodyf.]

Neurospora crassa [65]. Wykazano, że wybiórcze zniszczenie trzech reszt histydyny (w pozycjach 188, 193 i 289) w apoenzymie *Neurospora* jest odpowiedzialne za częściową utratę aktywności enzymatycznej [65]. Fakt odporności fotoutlenionych reszt histydyny na działanie bezwodnika etoksymrówkowego (czynnika wykazującego specyficzne powinowactwo do histydyny) nasuwa przypuszczenie, że reszty histydyny mogą znajdować się w zagłębieniu hydrofobowym enzymu [83, 84]. Taki hydrofobowy charakter miejsca wiążącego jony metalu w centrum aktywnym enzymu zapewnia również stabilność kompleksów tlenowych. Analiza widm Ramana oksytyrozynazy *Neurospora* wykazała obecność pasma przy niskich częstotliwościach, które zinterpretowano jako drgania miedź-imidazol [85].

Na podstawie danych wynikających z analizy absorpcji promieni X oraz spektroskopii rezonansowej Ramana [86, 87], zaproponowano schemat struktury miejsca wiążącego tlen z każdym z dwóch jonów miedzi, zawierającego 3 ligandy histydyny i jony miedzi połączone mostkiem nadtlenkowym. Na ryc. 4 przedstawiono przypuszczalny schemat budowy centrum aktywnego oksytyrozynazy *Neurospora crassa* [80].



Ryc. 4. Schemat przypuszczalnej budowy centrum aktywnego oksytyrozynazy *Neurospora crassa* [wg 80, zmodyf.]. Jon miedzi wiązany przez His w pozycjach 188, 193 i 289 określamy jako CuA, natomiast jon miedzi wiązany przez His w pozycjach 277, 281 i 306 — jako CuB

Przypuszcza się, że reszty histydyny w pozycjach 188, 193 i 289 wiążą jeden jon miedzi (Cu A), podczas gdy reszta histydyny w położeniu 306, obok histydyn w położeniach 277 i 281, uczestniczy w wiązaniu drugiego jonu miedzi (CuB) w tyrozynazie *Neurospora crassa* [60, 61, 65, 82]. Histydyna w położeniu 306 łańcuszka białkowego enzymu *Neurospora* jest homologiczna z histydyną w położeniu 380 tyrozynazy melanocytów myszy oraz z histydyną w położeniu 208 tyrozynazy *Streptomyces glaucescens* (Ryc. 2). W przypadku tyrozynazy *Streptomyces glaucescens* histydyny w pozycjach 53 i 62 są prawdopodobnie ligandami CuA, podczas gdy histydyna w położeniu 214 jest ligandem CuB [60]. W tyrozynazie melanocytów myszy, dwie reszty histydyny w położeniach 368 i 380 są ligandami jonów miedzi [63], przy czym histydyna w pozycji 368 odpowiada histydynie w pozycji 289 tyrozynazy *Neurospora*, a reszta histydyny w położeniu 380 jest homologiczna z histydyną w położeniu 306 tyrozynazy *Neurospora* [63] (Ryc. 2).

Wnioskuje się, że w tyrozynazach różnego pochodzenia miejsca CuA mogą być bardzo różne. Wydaje się że, mogły one powstać w toku ewolucji niezależnie i w różnym czasie. Miejsca CuB, natomiast, stanowią odcinki łańcucha peptydowego tyrozynazy o strukturze wysoce zachowawczej [82].

IV. Katalityczna funkcja tyrozynazy

IV-1. Specyficzność substratowa

Tyrozynazy wyizolowane z roślin, owadów lub płazów wykazują bardzo zróżnicowaną specyficzność substratową w stosunku do difenoli. Stąd, wartości stałej Michaelisa (K_m) i szybkości maksymalnej (V_m) wyznaczone dla tyrozynaz różnego pochodzenia są różne i zależą od natury chemicznej podstawników w pierścieniu benzenowym. Wzrostowi zdolności przyciągania elektronów przez podstawniki towarzyszy zmniejszanie się wartości zarówno K_m jak i V_m [88—90]. Tyrozynazy ssaków wykazują optymalną aktywność w stosunku do DOPA i jej bliskich analogów typu: dopamina, 3, 4-dihydroksyfenyloseryna, 5-S-cysteinylo-DOPA [91], a wraz z tyrozynazami niektórych niższych organizmów (*Streptomyces*, *Neurospora*) cechują się częściową stereospecyficznością w stosunku do DOPA [13, 14, 92]. Znamioną cechą aktywności oksydazowej tyrozynazy jest towarzysząca tej reakcji inaktywacja enzymu, która prowadzi do nieliniowego przebiegu krzywych postępu reakcji [93].

Specyficzność hydroksylazowa tyrozynazy jest podobna do aktywności oksydazowej enzymu i jest najwyższa dla tyrozynazy ssaków, a najniższa dla tyrozynazy roślin. Substratami tyrozynazy mogą być różne monofenole, w tym reszty tyrozyny białek i peptydów [94, 95]. W przypadku użycia monofenoli jako substratów tyrozynazy, aktywność hydroksylazowa enzymu nie pojawia się bezpośrednio po wprowadzeniu substratu, lecz poprzedzona jest typową lag-fazą. Długość trwania tej fazy jest proporcjonalna do stężenia substratu, a odwrotnie proporcjonalna do stężenia enzymu w mieszaninie reakcyjnej [96]. Tyrozynaza dla swej aktywności enzymatycznej wymaga również obecności tlenu w środowisku reakcji, jednakże w przypadku jego braku, enzym może zachowywać się jako peroksydaza. Taką pseudoperoksydazową aktywność tyrozynazy z pieczarek wykazano przy użyciu nadtlenu etylu jako akceptora elektronów [97].

IV-2. Inhibitory

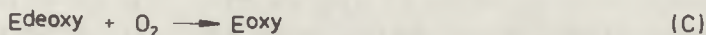
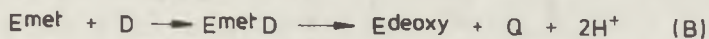
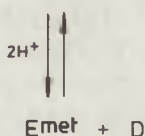
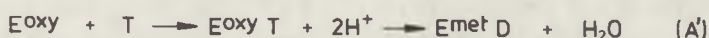
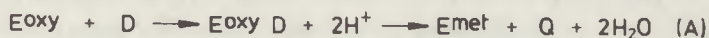
Jako inhibitory kompetycyjne w stosunku do fenoli należy wymienić: kwas benzoesowy [16, 88, 98], fenyloalaninę [99—101] 4-nitrokatechol [13, 102], L-mimozynę [103] oraz kwasy arylohydroksamowe. Natomiast, inhibitorami niekompetycyjnymi w odniesieniu do substratów fenolowych są: tlenek węgla, aniony cyjankowe [13, 84, 104], azydkowe [102] i halogenkowe [102, 105] pochodne 5-hydroksyindolu (5-hydroksyindol, 5-hydroksytryptofan, kwas 5-hydroksyindolo-3-octowy) [99] oraz substancje chelatujące miedź (dietyloditiokarbaminian [10, 99], fenylotiomocznik [3], merkaptobenzotiazol [106], EDTA).

IV-3. Mechanizmy reakcji enzymatycznych

Tyrozynaza występuje w trzech postaciach, które określamy jako: oksytyrozynaza, mettyrozynaza i deoksytyrozynaza w zależności od stopnia utlenienia

miedzi w centrum aktywnym enzymu oraz obecności cząsteczki tlenu [107, 108]. W centrum aktywnym deoksytyrozynazy znajdują się dwa jony miedzi na stopniu utleniania +1, natomiast w centrum aktywnym mettyrozynazy-dwa jony miedzi na stopniu utleniania +2. Budowę centrum aktywnego oksytyrozynazy przedstawiono wcześniej na Ryc. 4. (Rozdz. III-3).

Na rycinie 5 zostały przedstawione mechanizmy reakcji katalizowane przez tyrozynazę.



Ryc. 5. Mechanizmy reakcji katalizowane przez tyrozynazę. E^{oxy} — oksytyrozynaza; E^{met} — mettyrozynaza; E^{deoxy} — deoksytyrozynaza; D — DOPA; T — tyrozyna; Q — chinon [wg 108, zmodyf.]

Kluczowe znaczenie zarówno dla aktywności hydroksylazowej, jak i oksydazowej tyrozynazy ma, według hipotezy L e r c h a [108], obecność oksytyrozynazy. Zarówno bowiem DOPA jak i tyrozyna reagują z oksytyrozynazą tworząc kompleksy zgodnie z reakcją A i A' przedstawioną na rycinie 5. W przypadku kompleksu E^{oxy} , w centrum aktywnym enzymu zachodzi hydroksylacja tyrozyny równoczesna z uwolnieniem cząsteczki wody oraz pobraniem dwóch protonów ze środowiska. Szczegółowy mechanizm tego procesu nie został wyjaśniony, wydaje się wielce prawdopodobnym, że polaryzacja wiązania tlen-tlen pod wpływem jonów miedzi prowadzi do jonowego rozszczepienia nadtlenu w centrum aktywnym oksytyrozynazy, a w konsekwencji do hydroksylacji monofenolu przez jony OH^+ w reakcji podstawienia nukleofilowego [108]. W rezultacie powstaje kompleks mettyrozynazy z DOPA, który jak się wydaje może ulegać rozpadowi z uwolnieniem DOPA i wolnej mettyrozynazy. Jednocześnie, w wyniku redukcji mettyrozynazy przez DOPA, do środowiska reakcyjnego uwolniony zostaje chinon, a powstająca deoksytyrozynaza może reagować z tlenem cząsteczkowym dając wyjściową postać oksytyrozynazy. W obecności

czynników redukujących, mettyrozynaza występująca w postaci kompleksu z DOPA może ulec redukcji, a wówczas w środowisku reakcyjnym pojawia się DOPA [108]. W przypadku kompleksu oksytyrozynazy z DOPA obserwuje się, oprócz utleniania chinonu, równoczesną redukcję tlenu oraz powstawanie mettyrozynazy. E^{met} tworząc z kolei kompleks z DOPA może ulegać identycznym przemianom, jak to przedstawiono powyżej w przypadku aktywności hydroksylazowej tyrozynazy (reakcja B i C na Ryc. 5). Obserwowany w toku przebiegu reakcji oksydazowej stopniowy zanik aktywności enzymu należy przypisać niepełnej redukcji tlenu [109], która towarzyszy powstawaniu mettyrozynazy, zgodnie z reakcją A na rycinie 5. Niepełna redukcja tlenu, która zdarza się raz na kilka tysięcy obrotów enzymu [108], stwarza możliwość powstawania rodników hydroksylowych w centrum aktywnym enzymu, które hydroksylują pierścień imidazolowy histydyny, a więc aminokwasu o kluczowym znaczeniu dla pełnej aktywności tyrozynazy. Wykazanie obecności hydroksyhistydyny zamiast histydyny w strukturze pierwszorzędowej inaktywowanego enzymu wydaje się przemawiać za udziałem rodników hydroksylowych w procesie inaktywacji tyrozynazy. Inaktywację enzymu można również obserwować w obecności czynników redukujących typu askorbinianu, które redukują powstający chinon z powrotem do wyjściowej DOPA. Nie można wykluczyć również innych mechanizmów procesu inaktywacji tyrozynazy, jak np. tworzenia trwałych połączeń enzymu z produktami pośrednimi biorącymi udział w melanogenezie [110].

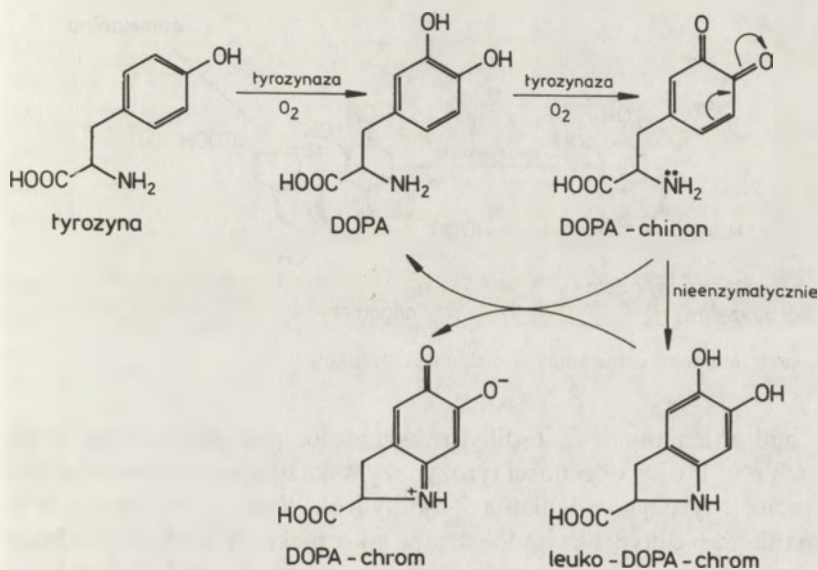
Jak już wspomniano w rozdziale IV-1., aktywność hydroksylazowa tyrozynazy nie przejawia się bezpośrednio po wprowadzeniu substratu do mieszaniny reakcyjnej. Zaobserwowany przebieg opóźnienia w hydroksylacji fenolu (lag-faza), wyjaśniono przyjmując obecność DOPA jako intermediatu w toku przebiegu reakcji następczych, tj. procesu hydroksylacji tyrozyny do DOPA, a następnie utleniania DOPA do DOPA-chinonu [111]. Jednakże takie wytłumaczenie obserwowanego zjawiska nie wydaje się w pełni poprawne. Zgodnie z przedstawioną koncepcją, akumulacja DOPA powinna mieć przebieg paraboliczny aż do osiągnięcia stanu stacjonarnego, przy którym szybkość procesu utleniania DOPA jest równa szybkości jej powstawania w wyniku hydroksylacji tyrozyny. Według danych C a l b a n e s i w s p. [112], krzywa akumulacji DOPA nie jest jednak paraboliczna, lecz sigmoidalna, przy czym wyrażone molowo ilości DOPA oraz DOPA-chinonu pozostają identyczne w początkowym etapie przebiegu procesu. Sugeruje to, że DOPA nie opuszcza centrum aktywnego enzymu $E^{met}D$, lecz bezpośrednim produktem aktywności hydroksylazowej tyrozynazy jest odpowiedni chinon. Związek ten, w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji oraz utleniania przez następną cząsteczkę chinonu, daje DOPA-chrom oraz wyjściwą DOPA. Uwzględniając te obserwacje można przyjąć, że nagromadzeniu DOPA w toku tego procesu towarzyszyć będzie współzawodnictwo z tyrozyną o centrum aktywne oksytyrozynazy, która zachowuje stałe stężenie w stanie stacjonarnym w rezultacie zarówno aktywności hydroksylazowej jak i oksydazowej.

V. Biologiczna rola tyrozyzny

Tyrozynaza uczestniczy w biosyntezie barwników melaninowych ssaków, w sklerotyzacji kutikuli owadów oraz katalizuje niektóre przemiany biochemiczne zachodzące w tkankach roślinnych.

V-1. Melanogeneza u ssaków

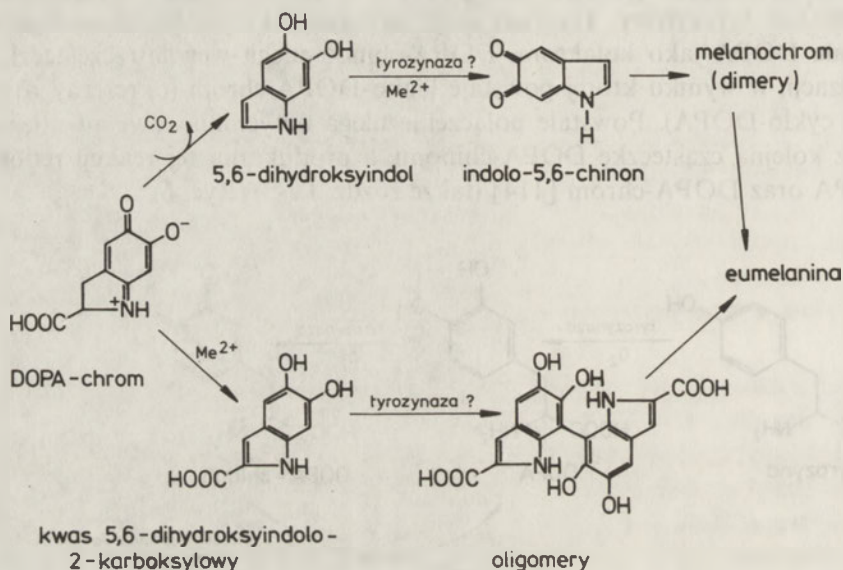
U ssaków, obecna w melanosomach tyrozynaza uczestniczy w tworzeniu czarno-brązowej eumelaniny i żółto-czerwonej feomelaniny [5]. Początkowe etapy melanogenezy opisuje schemat R a p e r a - M a s o n a [113]. Rozpoczyna ją przekształcenie tyrozyny do DOPA i DOPA do DOPA-chinonu pod działaniem tyrozyzny. Hydroksylacja tyrozyny do DOPA przebiega przy udziale DOPA jako kofaktora. DOPA-chinon ulega wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, w wyniku której powstaje leuko-DOPA-chrom (określany również jako cyklo-DOPA). Powstałe połączenie ulega natychmiastowemu utlenieniu przez kolejną cząsteczkę DOPA-chinonu, a produktami tej reakcji redoks są DOPA oraz DOPA-chrom [114] (także rozdz. IV-3) (Ryc. 6).



Ryc. 6. Przekształcenie tyrozyny do DOPA-chromu w melanocytye ssaków

DOPA-chrom ulega wewnątrzcząsteczkowemu przegrupowaniu, w wyniku którego w obecności tzw. czynnika konwersji DOPA-chromu (określanego również jako oksydoreduktaza DOPA-chromu) lub też śladowych ilości jonów metali przejściowych (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}), powstaje kwas 5, 6-dihydroksyindolo-2-karboxylowy [115]. W przypadku nieobecności wymienionych czynników, reakcji przegrupowania DOPA-chromu towarzyszy dekarboksylacja, a w rezultacie

pojawia się, 5, 6-dihydroksyindol. Obydwie substancje indolowe mogą być substratami tyrozynazy, jednakże jej udział w ich oksydacji nie został w pełni wyjaśniony. Obydwa wymienione związki mogą ulegać nienzymatycznemu utlenianiu, którego katalizatorem są śladowe ilości jonów metali przejściowych. Jednocześnie kluczowe znaczenie dla szybkości przebiegu tych procesów ma obecność DOPA-chinonu powstającego w wyniku aktywności tyrozynazy, który może z powodzeniem pełnić funkcję utleniacza pochodnych 5, 6-dihydroksyindolu. Ocena struktur powstających dimerów pozwala przypuszczać, że reakcja polimeryzacji ma charakter wolnorodnikowy, w wyniku czego tworzą się barwniki melaninowe o różnym udziale jednostek wywodzących się z 5, 6-dihydroksyindolu i kwasu, 5, 6-dihydroksyindolu-2-karboksylowego (Ryc. 7).



Ryc. 7. Powstawanie polimeru eumelaniny w melanocycie ssaków

Badania nad utlenianiem 5, 6-dihydroksyindolu, przeprowadzone przez K ö r n e r i w s p . [116] w obecności tyrozynazy wskazują na niekompetycyjne hamowanie przez L-tyrozinę utleniania 5, 6-dihydroksyindolu. Wydaje się, że w tej przemianie 5, 6-dihydroksyindol działa jako niekompetycyjny inhibitor hydroksylacji tyrozyny. Poczynione obserwacje sugerują, że względne stężenia tyrozyny i 5, 6-dihydroksyindolu w rezultacie ich wzajemnego oddziaływania z tyrozynazą są zdolne do regulacji melanogenezy w obrębie upigmentowanej komórki [116].

Czynnikiem łączącym przemiany eumelaniny ze szlakiem feomelaninowym jest obecność w komórkach barwnikowych cysteiny, zawierającej wysoce reaktywną grupę SH [117, 118]. Gdy stężenia tego aminokwasu w melanocycie są niskie, wówczas w reakcji katalizowanej przez tyrozynazę powstaje w szlaku R a p e r r a - M a s o n a eumelanina (Ryc. 6 i 7) [5]. Jeśli stężenia cysteiny w komórce

barwnikowej są wysokie, tyrozynaza katalizuje przekształcenie tyrozyny do DOPA-chinonu. Związek ten łącząc się z cysteiną daje cysteinilo-DOPA [119], która ulega dalszym przemianom, dając poprzez metabolity, 1, 4-benzotiazyny, polimer feomelaniny [120, 121].

Powstająca melanina wypełnia stopniowo wnętrze melanosomu. Wysoka w niedojrzałych, „niezmelanizowanych” melanosomach aktywność tyrozynazy, w miarę akumulacji melaniny zmniejsza się. Można przyjąć, że istnieje odwrotnie proporcjonalna zależność pomiędzy zawartością melaniny, a aktywnością tyrozynazy w melanosomach ssaków [33, 34].

V-2. Sklerotyzacja kutikuli owadów

U owadów, po każdym linieniu larwalnym oraz poczwarkowym, nowa chitynowa kutikula twardnieje w wyniku procesu zwanego sklerotyzacją [122, 123]. W twardniejącej kutikuli można wykazać zarówno obecność fenoli jak również oksydazy fenolowej. Przypuszcza się, że wytwarzanie chinonów stanowi istotnie ważną część tego procesu. W waniku przemian tyrozyny powstają chinony, które sieciują łańcuchy polipeptydowe białek, co w konsekwencji prowadzi do twardnienia kutikuli owadów [124].

Podczas sklerotyzacji kutikuli, tyrozyna ulega hydroksylacji do DOPA. Jednakże w przeciwieństwie do procesu melanogenezy, podczas sklerotyzacji DOPA ulega dekarboksylacji, gdyż w odpowiedzi na linienie następuje synteza dekarboksylazy DOPA, która wytwarza dopaminę. Reakcja z acetylo CoA prowadzi do powstania N-acetylodopaminy, która utleniana do N-acetylodopaminochinonu nie ulega wewnątrzcząsteczkowej addycji z uwagi na zablokowanie azotu aminowego w wyniku acetylacji. Taki chinon jest szczególnie podatny na nukleofilową addycję grup aminowych białek, a zwłaszcza ϵ -aminową grupę lizyny — co prowadzi do powstania podstawionego difenolu. Związek ten jest utleniany do formy chinonowej poprzez N-acetylodopaminochinon, który z kolei ulega redukcji do N-acetylodopaminy. Jednoprastawiony chinon z kolei, przyłącza kolejną grupę aminową lub sulfhydrylową białka, sieciując tym samym łańcuchy polipeptydowe. W powstałym w ten sposób białku, zwanym sklerotyliną, sieciowanie objęło także dwusiarczkowe i dwutyrozyłowe białek twardniejącej kutikuli [124].

V-3. Metabolizm u roślin

We wcześniejszych opracowaniach [89, 125, 126] przypisywano tyrozynazie udział w wielu przemianach substancji roślinnych, jednak współczesne badania wskazują na ograniczoną rolę tego enzymu w metabolizmie u roślin. Dla przykładu, udział tyrozynazy w syntezie ligininy [127] ogranicza się do katalizowania hydroksylacji kwasu p-kumarowego do kwasu kawowego (Ryc. 8). W reakcji tej, NADPH lub asorbinian działają jako czynniki redukujące, które umożliwiają hydroksylację kwasu p-kumarowego oraz zapobiegają powstawaniu chinonu kwasu kawowego [128].

PIŚMIENICTWO

1. Nicolaus R. A., (1968), *Melanins*, Ser. VI., str. 28—29; Hermann, Paris.
2. Kertesz D., Zito R., (1962) w *Oxygenases*, red. Hayaishi O., str. 307; Academic Press, New York and London.
3. Lerner A. B., Fitzpatrick T. B., (1950), *Physiol. Rev.*, **30**, 91—126.
4. Mason H. S., (1957), *Advan. Enzym.*, **19**, 79—84.
5. Prota G., (1980), *J. Invest. Dermatol.* **75**, 122—127.
6. Mason H. S., Fowlks W. B., Peterson E. W., (1955), *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 2914—2915.
7. Mc Intyre R., Vanghan P. E. T., (1975), *Biochem. J.*, **149**, 447—452.
8. Neujahr H. Y., Varga J. M., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **13**, 37—41.
9. Rathmell W. G., Bendall D. S., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 125—129.
10. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S., (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 2910—2918.
11. Lerch K., (1981), w *Metal Ions in Biological Systems*, red. Sigel H., t. 13. str. 143—186; Marcel-Dekker, New York.
12. Nambudiri A. M. D., Bhat J. V., Subba Rao P. V., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 425—433.
13. Lerch K., Ettliger L., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 427—437.
14. Fling M., Horowitz N. H., Heinemann S. F., (1963), *J. Biol. Chem.*, **283**, 2045—2053.
15. Katan T., Galum E., (1975), *Anal. Biochem.*, **67**, 485—492.
16. Gutteridge S., Robb D., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 107—116.
17. Kertesz D., Zito R., (1965), *Biochem. Biophys. Acta*, **96**, 447—462.
18. Smith J. L., Kruger R. C., (1962), *J. Biol. Chem.* **237**, 1121—1130.
19. Bouchilloux S., Mc Mahill P., Mason H. S., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1699—1707.
20. Pomerantz S. H., Murthy V. V., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* **16**, 73—82.
21. Kubowitz F., (1938), *Biochem. Z.*, **299**, 32—97.
22. Patil S. S., Zucker M., (1965), *J. Biol. Chem.* **240**, 3938—3947.
23. Harel E., Mayer A. M., Shain Y., (1966), *J. Sci. Food Agri.*, **17**, 389—399.
24. Robb D. A., Mapson L. W., Swain T., (1965), *Phytochemistry*, **4**, 731—740.
25. Declair W., Vencauteren R. E., (1966), *Arch. Phys. Bioch.* **74**, 313—319.
26. Ashida M., Ohnishi E., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 411—416.
27. Barisas B. G., Mc Guire J. S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3151—3156.
28. Mikkelsen R. B., Triplett E. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 638—643.
29. Pañafiel R., Galindo J. D., Padreño E., Lozano J. A., (1982), *Biochem. J.*, **205**, 397—404.
30. Seiji M., Shimao K., Birbeck M. S. C., Fitzpatrick T. B., (1963), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **100**, 497—533.
31. Nakagawa H., Rhodes A., Fitzpatrick T. B., Hori Y., (1984), *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 140—144.
32. Jimbow K., Fitzpatrick T. B., Quevedo W. C., (1985), w *Structure and Function of Melanin*, red. Jimbow K., t. 2, str. 71—82; Fujii Printing Co., Inc, Sapporo.
33. Seiji M., Fukuzawa H., Shimao K., Itakura H., (1973), w *Pigment Cell*, red. Riley V., t. 1, str. 39—46; Karger S, Basel.
34. Seiji M., Iwashita S., (1963), *J. Biochem.*, **54**, 465—467.
35. Seiji M., Iwashita S., (1965), *J. Invest. Dermatol.*, **45**, 305—314.
36. Seiji M., Moro S., Tomita Y., (1978), *Tohoku J. Exp. Med.* **126**, 63—70.
37. Seiji M., Ogata K., (1965), *J. Biochem.*, **57**, 407—416.
38. Turner W. A., Taylor J. D., Tchen T. T., (1975), *J. Ultrastruct. Res.*, **51**, 16—31.
39. Maul G. G., Brumbaugh J. A., (1971), *J. Cell. Biol.*, **48**, 41—48.
40. Mishima Y., Imokawa G., Ogura H., (1979), w *Pigment Cell*, red. Klaus S., t. 4, str. 277—290; Karger A. G, Basel.
41. Imokawa G., Mishima Y., (1981), *Brit. J. Dermatol.*, **104**, 160—178.

42. Seiji M., (1981), w *Pigment Cell*, red. Seiji M., t. 1, str. 3—13; University-of Tokyo Press, Tokyo.
43. Sharon N., (1978), w *Complex Carbohydrates*, red. Sharon N., str. 118—141; Addison-Wesley Publishing Company, Reading Massachusetts.
44. Burnett J. B., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3079—3091.
45. Chen Y. M., (1974), *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **15**, 3.
46. Chen Y. M., Chavin W., (1971), *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **12**, 68—70.
47. Chen Y. M., Chavin W., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 606—612.
48. Chen Y. M., Chavin W., (1975), *Oncology*, **31**, 147—152.
49. Chen Y. M., Lim B. T., Chavin W., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 3485—3490.
50. Nishioka K., Ramsdahl M. M., Mc Murtrey M. J., (1978), *Cancer Biochem. Biophys.*, **2**, 145—150.
51. Balasingham K., Ferdinand W., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 15—23.
52. Jolley R. L., Robb D. A., Mason H. S., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1593—1599.
53. Strothkamp K. G., Jolley R. L., Mason H. S., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 519—523.
54. Rüegg Ch., Ammer D., Lerch K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3151—3156.
55. Hearing V. J., Ekel T. M., Montague P. M., (1981), *Int. J. Biochem.*, **13**, 99—103.
56. Hearing V. J., Nicholson J. M., Montague P. M., Ekel T. M., Tomecki K. J., (1978), *Biochem. Biophys. Acta*, **552**, 327—339.
57. Holstein T. J., Quevedo W. C., Burnett J. B., (1971), *J. Exptl. Zool.*, **177**, 173—184.
58. Pomerantz S. H., Li J. P. C., (1973), *Yale J. Biol. Med.*, **46**, 541—552.
59. Iwata K., Takeuchi T., (1977), *J. Invest. Dermatol.*, **68**, 88—92.
60. Huber M., Hinterman G., Lerch K., (1985), *Biochemistry*, **24**, 6038—6044.
61. Lerch K., Longoni C., Jordi E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6408—6413.
62. Lerch K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6414—4619.
63. Shibahara S., Tomita Y., Sakakura T., Nager Ch., Chaudhun B., Müller R., (1986), *Nucl. Ac. Res.*, **14**, 2413—2427.
64. Lerch K., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3635—3639.
65. Pfiffner E., Lerch K., (1981), *Biochemistry*, **21**, 6029—6035.
66. Lehrer S. S., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3254—3263.
67. Blobel G., Dobberstein B., (1975), *J. Cell. Biol.*, **67**, 852—862.
68. Schoot Uiterkamp A. J. M., Mason H. S., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 993—996.
69. Jimbow K., Jimbow M., Chiba M., (1981), *J. Invest. Dermatol.*, **77**, 213—218.
70. Ohkura T., Yamashita K., Kabata A., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 63—77.
71. Halaban R., Pomerantz S. H., Marshall D. T., Lamber D. T., Lerner A. B., (1983), *J. Cell. Biol.*, **97**, 480—488.
72. Nishioka K., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **85**, 137—146.
73. Miyazaki K., Ohtaki N., (1975), *Arch. Dermatol. Forsch.*, **252**, 211—216.
73. Herrmann W. P., Uhlenbruck G., (1975), *Arch. Dermatol. Res.*, **254**, 275—280.
75. Nishioka K., (1977), *FEBS Lett.*, **80**, 225—228.
76. Marshall R. D., (1975), *Biochem. Soc. Symp.*, **40**, 17—26.
77. Bause E., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 331—336.
78. Deinum J., Lerch K., Reinhammar B., (1976), *FEBS Lett.*, **69**, 161—164.
79. Makino N., Mc Mahill P., Mason H. S., Moss T. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6062—6066.
80. Himmelwright R. S., Eickman N. C., Lu Bien C. D., Lerch K., Solomon E. I., (1980), *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 7339—7344.
81. Solomon E. I., (1981), w *Copper Proteins*, red. Spiro T. G., str. 41—108; Wiley, New York.
82. Lerch K., Huber M., Schneider H. J., Drexel R., Linzen B., (1986), *J. Inorg. Biochem.*, **26**, 213—217.
83. Melchior W. B., Fehrney D., (1970), *Biochemistry*, **9**, 251—258.

84. Polidoro G., Dicola D., Dillio C., Politi L., Scandurra R., (1976), *Mol. Cell, Biochem.*, **11**, 155—159.
85. Eickman N. C., Solomon E. I., Larabee J. A., Spiro T. G., Lerch K., (1978), *J. Amer. Chem. Soc.* **100**, 6529—6531.
86. Larabee J. A., Spiro T. G., (1980), *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 4217—4223.
87. Brown J. M., Powers L., Kincaid B., Larabee J. A., Spiro T. G., (1980), *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4210—4216.
88. Duckworth H. W., Coleman J. E., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1613—1625.
89. Mayer A. M., Harel E., (1979), *Phytochemistry*, **18**, 193—200.
90. Hackman R. H., Goldberg M., (1967), *J. Insect. Physiol.*, **13**, 531—538.
91. Hansson C., Rorsman H., Rosergren E., (1980), *Acta Dermato. Vener.* (Stockholm), **60**, 399—402.
92. Lerner A. B., Fitzpatrick T. B., Calkins E., Summerson W. H., (1951), *J. Biol. Chem.*, **191**, 799—806.
93. Brooks D. W., Dawson C. R., (1966), w *The Biochemistry of Copper*, red. Peisach J., Aisen P., Blumberg W. E., str. 343; Academic Press, New York.
94. Yasunobu K. T., (1959), w *Pigment Cell Biology*, red. Gordon M., str. 583—589; Academic Press, New York.
95. Cory J. G., Frieden E., (1967), *Biochemistry*, **6**, 121—128.
96. Coleman J. E., (1974), w *Food Related Enzymes*, red. Whitaker J. R., str. 267—272; American Chemical Society, Washington D. C.
97. Strothkamp K. G., Mason H. S., (1974), *Biophys. Res. Commun.*, **61**, 827—834.
98. Kuttner R., Wagreich H., (1953), *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 80—87.
99. Pomerantz S. H., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 2351—2357.
100. Gutteridge S., Dickson G., Robb D., (1977), *Phytochemistry*, **16**, 517—523.
101. Miyamoto M., Fitzpatrick T. B., (1957), *Nature*, **179**, 199—200.
102. Robb D. A., Swain T., Mopson L. W., (1966), *Phytochemistry*, **5**, 665—670.
103. Rüegg Ch., Lerch K., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1256—1262.
104. Lerch K., (1976). *FEBS Lett.*, 157—160.
105. Krueger R. C., (1955), *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 92—103.
106. Palmer J. K., Robertsy B., (1967), *Science*, **157**, 200—206.
107. Jolley R. L., Evans L. H., Makino N., Mason H. S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 335—345.
108. Lerch K., (1981), w *Metal Ions in Biological Systems*, red. Siegel H., t. 13, str. 160; Marcel Dekker, New York.
109. Dietler C., Lerch K., (1982), w *Oxidases and Related Redox Systems*, red. King T. F., Mason H. S., Morrison M., str. 305—317; Pergamon Press, Oxford and New York.
110. Wood B. J. B., Ingraham L. L., (1965), *Nature*, **205**, 291—292.
111. McClure W. R., (1969), *Biochemistry*, **8**, 2782—2786.
112. Calbanes J., Garcia-Carmona F., Garcia-Canovas F., Iborra J. L., Lozano J. A. A., (1985), w *Pigment Cell*, red. Bagnara J., Klaus S. W., Schartl M., str. 127—132; University of Tokyo Press, Tokyo.
113. Raper H. S., (1928), *Physiol. Rev.*, **8**, 245—282.
114. Garcia-Carmona F., Garcia-Canovas F., Iborra J. L., Lozano J. A., (1982), *Biochem. Biophys. Acta*, **717**, 124—131.
115. Pawelek J. P., Körner A. M., (1982), *Am. Scientist*, **70**, 136—145.
116. Körner A., Pawelek J., (1982), *Science*, **217**, 1163—1165.
117. Protá G., Crescenzi S., Misuraca G., Nicolaus R. A., (1970), *Experientia*, **26**, 1058—1060.
118. Protá G., Scherillo G., Nicolaus R. A., (1968), *Gazz. Chim. Ita.*, **98**, 435—510.
119. Fattorusso E., Minale L., De Stefano S., Cimino G., Nicolaus R. A., (1959), *Gazz. Chim. Ita.*, **99**, 969—978.
120. Chioccare F., Novellino E., Protá G., (1977), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 50—51.

121. Minale L., Fattoruso E., De Stefano S., Nicolaus R. A., (1970) *Gazz. Chim. Ita.*, **100**, 461—466.
122. Hackman R. H., (1974), w *Physiology of Insecta*, red. Rockstein M., 6 wyd., t. 6, str. 215; Academic Press, New York.
123. Andersen S. O., (1979), *Annu. Rev. Entomol.*, **24**, 29—36.
124. Rees H. H., (1977), w *Insect Biochemistry*, 3 wyd., str. 26—30; Chapman and Hall, London.
125. Butt V. S., (1980), w *The Biochemistry of Plants*, red. Strumpf P. K., Conn E. E., t. 2, str. 81; Academic Press, New York.
126. Thimann K. V., Yocum C. S., Hackett D. P., (1954), *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 239—248.
127. West C. A., (1980), w *The Biochemistry of Plants*, red. Strumpf P. K., Conn E. E., t. 2, str. 317; Academic Press, New York.
128. Vaughan P. F. T., Butt V. S., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 641—646.
129. Boekelheide K., Graham D. G., Mize P. D., Jeffs P. W., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4766—4774.

TADEUSZ PACUSZKA*

Gangliozydy — budowa i niektóre właściwości

Gangliosides — structure and some properties

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Budowa gangliozydów
 - II-1. Łańcuchy oligosacharydowe
 - II-2. Ceramid
 - II-3. Konformacja cząsteczek gangliozydów
- III. Właściwości gangliozydów
 - III-1. Gangliozydy w roztworach wodnych (micele)
 - III-2. Gangliozydy w błonach fosfolipidowych
 - III-2.1. Liposomy, skupienia, ruchliwość
 - III-2.2. Wpływ gangliozydów na właściwości błon
 - III-3. Gangliozydy błon komórkowych
 - III-3.1. Występowanie w błonie plazmatycznej
 - III-3.2. Oddziaływania ze szkieletem komórkowym
 - III-3.3. Wiązanie się egzogennych gangliozydów z błonami komórkowymi
 - III-3.4. Uwalnianie gangliozydów z komórek
 - III-3.5. Międzybłonowa wymiana gangliozydów
 - III-3.6. Wzrost zawartości gangliozydów plazmy w chorobach nowotworowych

Contents

- I. Introduction
- II. Structure of gangliosides
 - II-1. Oligosaccharide chains
 - II-2. Ceramide
 - II-3. Conformation of ganglioside molecules
- III. Properties of gangliosides
 - III-1. Gangliosides in aqueous solutions (micelles)
 - III-2. Gangliosides in phospholipid membranes
 - III-2.1. Liposomes, clusters, mobility
 - III-2.2. The influence on properties of the membrane
 - III-3. Gangliosides in cell membranes
 - III-3.1. Occurrence in the plasma membrane
 - III-3.2. Cytoskeletal interactions

* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Hematologii, ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa

III-3.3. Binding of exogenous gangliosides to cell membranes

III-3.4. Shedding of gangliosides from cells

III-3.5. Intermembrane exchange of gangliosides

III-3.6. Increase of plasma ganglioside concentration in cancer

Wykaz stosowanych skrótów: galaktozyloceramid, Gal β 1-1 Cer; gangliotetraozyloceramid, Gal β 1-3 GalNAc β 1-4 Gal β 1-4 Glc β 1-1 Cer; wzory gangliozydów przedstawiono w tabeli 1. Tt, temperatura przejścia fazowego błony żel — ciekły kryształ; ΔH , zmiana entalpii towarzysząca temu procesowi.

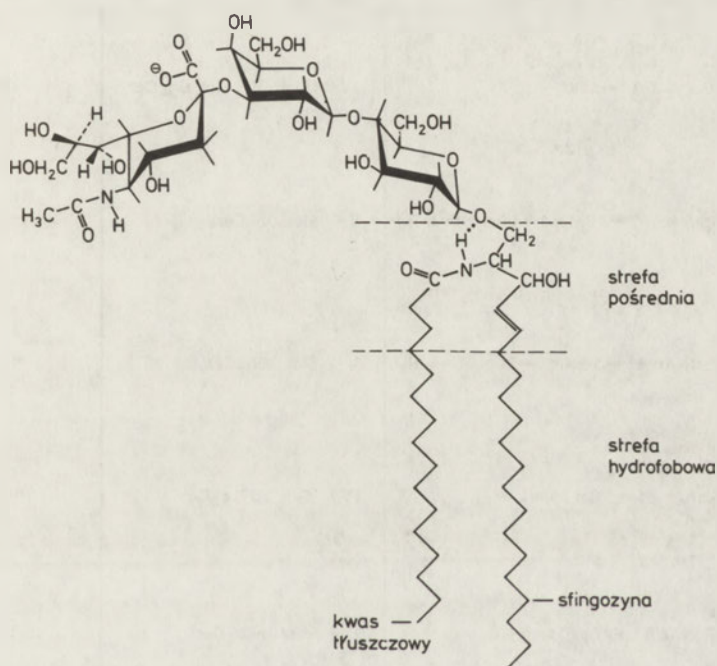
I. Wstęp

Gangliozydy — wykryte około 50 lat temu w mózgu człowieka [1—3] — są glikosfingolipidami zawierającymi w swych cząsteczkach od jednej do kilku [4], a być może kilkunastu [5, 6] reszt kwasu sjałowego [7]. Jak wszystkie glikosfingolipidy gangliozydy zbudowane są z polarnego łańcucha oligosacharydowego połączonego wiązaniem O-glikozydowym z hydrofobowym ceramidem [8, 9] (Ryc. 1). Wynikający stąd amfipatyczny charakter gangliozydów determinuje wiele ich właściwości. Co więcej tak zbudowane cząsteczki mogą występować jednocześnie w hydrofobowej warstwie lipidów błony — którą ceramid współtworzy — i w zewnętrznym środowisku wodnym dokąd wystają ich łańcuchy oligosacharydowe.

Gangliozydy są bardzo powszechne w świecie zwierząt. Znajdują się one w różnej ilości i charakterystycznym składzie w błonach wszystkich komórek kręgowców [8, 9]. Występowanie w zewnętrznej warstwie lipidów błony plazmatycznej oraz ogromna różnorodność budowy łańcuchów oligosacharydowych [8, 9] od dawna nasuwały przypuszczenie, że gangliozydy mogą pełnić funkcje receptorów [10—12]. Dziesięć lat temu wydawało się, że są one receptorami niektórych hormonów [10, 13] ale późniejsze badania nie potwierdziły tej funkcji [14—16]. Jak dotąd, najlepiej udokumentowanym przypadkiem ich funkcji receptorowych są oddziaływania między monosjałogangliozydem GM₁ a toksyną bakterii *Vibrio cholerae* [17, 18]. Ze względu na wysokie powinowactwo i dużą swoistość wiązania toksyny jest to interesujący przypadek oddziaływań między białkiem uwalnianym przez bakterie do środowiska a gangliozydem błony komórkowej. Nie stanowi to jednak przykładu fizjologicznej roli gangliozydów. Poza hipotetycznymi funkcjami receptorowymi wpływają one na fizykochemiczne właściwości błon. Największą zawartością gangliozydów charakteryzuje się tkanka nerwowa [9] a w niej błony synaptosomów [19]. Z tego między innymi powodu od dawna przypuszczano, że biorą one udział w przekazywaniu bodźców poprzez zakończenia synaptyczne [20, 21]. Mechanizm tego zjawiska nie został jednak dotychczas w pełni wyjaśniony.

Funkcje gangliozydów mogłyby także polegać na odwracalnym zmienianiu (modulowaniu) właściwości białek błon komórkowych będących receptorami lub związanych z transportem jonów [10, 22]. Zdaniem Fishmana [23] zagadnienia te będą zapewne przedmiotem przyszłych badań.

W ciągu ostatnich lat miał miejsce znaczny postęp w badaniach budowy glikokonjugatów wynikający z udoskonalenia technik spektrometrii masowej i NMR [24—26]. Opracowana została także metoda wykrywania i charakteryzowania glikosfingolipidów rozdzielonych w chromatografii cienkowarstwowej poprzez ich bezpośrednie reakcje ze swoistymi przeciwciałami i lektynami [27, 28]. Pozwoliło to na wykrycie i zbadanie budowy wielu nowych gangliozydów. Próby poznania funkcji gangliozydów, znacznie trudniejsze od badań ich struktury, przyniosły, jak dotąd, więcej pytań niż odpowiedzi [22, 23, 29, 30]. Artykuł ten jest próbą przedstawienia budowy i opisanie niektórych właściwości tych związków.



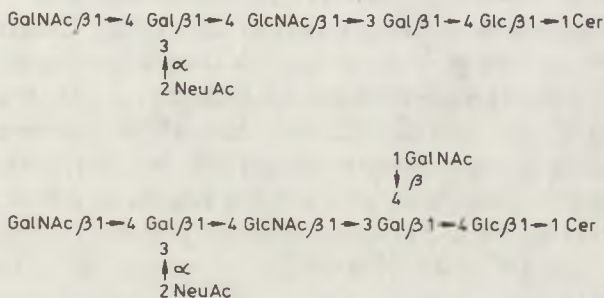
Ryc. 1. Schemat budowy gangliozydu GM₃ [62, 74]

II. Budowa gangliozydów

II-1. Łańcuchy cukrowcowe

Opisane dotychczas łańcuchy cukrowcowe gangliozydów kręgowców mogą zawierać — poza kwasem sjałowym i galaktozą — reszty glukozy, N-acetylogalaktozaminy, N-acetyloglukozaminy i — rzadziej — fukozy [8, 9, 19] (Tab.1). Próby klasyfikacji przekraczającej 100 i ciągle rosnącej liczby gangliozydów opierają się na budowie rdzenia ich łańcuchów cukrowcowych, miejscu przyłą-

i komórek, często nowotworowych, gangliozydy zawierające kwas sjałowy połączony wiązaniem $\alpha 2 \rightarrow 6$ z resztą galaktozy [8, 9], $\alpha 2 \rightarrow 3$ [36] lub $2 \rightarrow 6$ [37, 38] z resztą N-acetylogalaktozozaminy, a także $\alpha 2 \rightarrow 6$ z resztą N-acetylglukozyaminy [35, 39]. Przedstawiona w tabeli 1 klasyfikacja gangliozydów ujawnia swoją niedoskonałość w przypadku łańcuchów „hybrydowych” łączących elementy rdzeni różnych typów (Ryc. 2) [40]. Nie odpowiadające tym uogólnieniom łańcuchy cukrowce zostały wykryte w gangliozydach rozgwiazd i jeżowców morskich [9, 41].



Ryc. 2. Wzory niektórych gangliozydów ikry ryb o „hybrydowych” łańcuchach oligosacharydowych [40]

Rozmaitość budowy gangliozydów potęgują także wchodzące w ich skład różne rodzaje kwasów sjałowych — zwykle N-acetylo lub N-glikoliloneuraminowych [7, 42, 43]. Występowanie określonego N-acylo podstawionego kwasu sjałowego jest uwarunkowane genetycznie [44, 45]. Kwasy te mogą się dodatkowo różnić występowaniem grup O-acetylowych, w gangliozydach zwykle w pozycji 0—9 lub 0—4 [7, 42, 43].

W ostatnich latach duże zainteresowanie wywołało wyizolowanie i zbadanie struktury laktonowych pochodnych gangliozydów [46, 47]. Na możliwość występowania takich związków zwrócono uwagę dość dawno [9, 49]. Są one wynikiem utworzenia wewnątrzcząsteczkowego wiązania estrowego między grupą karboksylową kwasu sjałowego a grupą hydroksylową innego kwasu sjałowego [47, 48] lub galaktozy [46]. Laktonowe pochodne gangliozydów powstają dość łatwo w środowisku kwaśnym [48]. *In vivo* ich zawartość w tkance nerwowej rośnie wraz z wiekiem sięgając w mózgu człowieka 3.5% [47]. W wielu pracach sugerowano, że tworzenie się laktonowych pochodnych gangliozydów — być może odwracalne i katalizowane przez enzymy — może mieć znaczenie fizjologiczne [9, 45, 47]. Byłby to mechanizm zmieniania struktury i ładunku elektrycznego gangliozydów a tym samym fragmentu błony w której się znajdują.

II-2. Ceramid

Ceramid jest hydrofobowym składnikiem cząsteczek sfingolipidów — w tym także gangliozydów (Ryc. 1). Jest on zbudowany z długołańcuchowej zasady, — sfingozyny, połączonej wiązaniem amidowym z kwasem tłuszczowym [8, 9,

50]. Spośród wielu różnych sfingozyn spotykanych w przyrodzie [51] w skład gangliozydów kręgowców wchodzi najczęściej sfinganina (dihydrosfingozyna), 4-sfingenina (sfingozyna) oraz 4-D-hydroksysfinganina (fitosfingozyna) [52]. Wzory i biosynteza tych zasad, a także ceramidu omówione zostały w Postęпах Biochemii [53].

Kwasy tłuszczowe spotykane w gangliozydach różnią się długością łańcucha (liczącego najczęściej od 14 [54] do 26 [55] atomów węgla), występowaniem wiązań podwójnych i grup hydroksylowych (α -hydroksykwas). Rozmaitość budowy ceramidu powoduje znaczną „mikroheterogenność” gangliozydów i innych glikosfingolipidów. Gangliozydy o identycznej strukturze łańcucha oligosacharydowego wyizolowane z różnych tkanek tego samego zwierzęcia mogą zawierać rozmaite kwasy tłuszczowe i sfingozynę [56, 57]. W tej samej tkance gangliozydy o zbliżonej budowie łańcuchów cukrowcowych mogą wykazywać podobieństwo budowy ceramidu [58, 59] przypominając pod tym względem nawet glikosfingolipidy objęte [60]. Zdarza się jednak, że gangliozydy tej samej tkanki lub rodzaju komórek o bardzo podobnej budowie łańcuchów cukrowcowych np. IV^3 i IV^6 NeuAcnLc₄Cer różnią się składem kwasów tłuszczowych [61].

Fizjologiczne podstawy i znaczenie „mikroheterogenności” gangliozydów nie zostały dotychczas wyjaśnione. Wpływ budowy cząsteczki ceramidu na przebieg biosyntezy glikosfingolipidów omówiony został w Postęпах Biochemii [53].

Karlsson zwrócił uwagę na zależność między budową ceramidu glikosfingolipidów a rodzajem tkanki z której zostały one wyizolowane [56, 62]. Glikosfingolipidy — w tym także gangliozydy — komórek nabłonka charakteryzowały się znacznie wyższą zawartością α -hydroksykwasów tłuszczowych i fitosfingozyny niż występujące w pozostałych tkankach jelita [56, 63]. Zdaniem Karlssona [56, 62] wzrost liczby grup OH w strefie pośredniej cząsteczek glikosfingolipidów (Ryc. 1) umożliwia powstawanie dodatkowych wiązań wodorowych stabilizujących strukturę błony. Być może funkcję stabilizowania błony pełnią np. gangliozydy ikry ryb zawierające duże ilości fitosfingozyny i α -hydroksykwasów tłuszczowych [64].

Zróznicowanie budowy ceramidów dodatkowo komplikuje preparatykę i analizę glikosfingolipidów powodując, że gangliozydy o tym samym łańcuchu cukrowcowym mogą dawać w chromatografii cienkowarstwowej dwa lub więcej prążków. Niekiedy oczyszczając gangliozydy można usunąć „dodatkowe” pasma i zafałszować wynik analizy ceramidu [65]. Udoskonalone metody chromatograficzne pozwalają na izolowanie gangliozydów o określonej budowie łańcuchów cukrowcowych i ceramidu [66].

II-3. Konformacja cząsteczek gangliozydów

Wiązanie amidowe łączące resztę kwasu tłuszczowego i sfingozyny zajmuje centralną pozycję w budowie ceramidu (Ryc. 1). Mając charakter wiązania częściowo podwójnego tworzy ono płaszczyznę w której leżą także atomy C-2

sfingozyny i C-2 kwasu tłuszczowego [67, 68]. Prostopadle do tej płaszczyzny, a równolegle względem siebie, skierowane są łańcuchy węglowodorowe reszt kwasu tłuszczowego i sfingozyny. Badając strukturę kryształów galaktozylloceramidu (prekursora gangliozydu GM₄, tabela 1) Pascher i Sundell [68] doszli do wniosku, że „płaszczyzna” pierścienia galaktozy układa się prawie równolegle do płaszczyzny wiązania amidowego nadając całej cząsteczce glikosfingolipidu kształt litery L lub łopatki. Takie położenie reszty galaktozy spowodowane jest tworzeniem się wiązania wodorowego między tlenem wiązania glikozydowego a połączonym z azotem atomem wodoru [68]. Podobny model budowy cząsteczki ceramidu przedstawili ostatnio Wynn i wsp. [69] posługując się techniką znajdowania konformacji o najniższej energii swobodnej.

Reszty cukrowce tworzące łańcuchy oligosacharydowe gangliozydów kręgowców występują w formie pierścieni piranozowych o konformacji krzesłowej i należą — z wyjątkiem L-fukozy — do szeregu D. Dzięki znacznemu ulepszeniu techniki NMR [24, 25, 70], a także opracowaniu metod odszukiwania struktur o najmniejszej energii swobodnej [71, 72], oraz budowy modeli na podstawie egzoanomerycznego wyliczania sztywnych kul [73], można było badać konformację cząsteczek gangliozydów [25, 71, 73] i glikosfingolipidów obojętnych [25, 71, 72]. Znajomość trójwymiarowej budowy tych związków ułatwia zrozumienie specyficzności reakcji i oddziaływań w których biorą one udział.

W budowie cząsteczek glikosfingolipidów — w tym także gangliozydów — wyróżnić można za Karlssonem [62] trzy strefy (Ryc. 1). Do strefy hydrofobowej należą fragmenty łańcuchów węglowodorowych reszt kwasu tłuszczowego i sfingozyny. Uczestniczą one w oddziaływaniach hydrofobowych z innymi lipidami i integralnymi białkami błony. W skład strefy pośredniej wchodzi m.in. atomy tworzące wiązanie amidowe oraz grupy hydroksylowe α -hydroksykwasów tłuszczowych i sfingozyny. Występują tu grupy będące donorami (—OH, —NH) i akceptorami (—C=O) protonów w tworzeniu wiązań wodorowych. Wiązania międzycząsteczkowe z innymi składnikami błony dodatkowo ją stabilizują, a wewnątrzcząsteczkowe, warunkują określoną konformację cząsteczki glikosfingolipidu. Stanowiący strefę hydrofilową łańcuch cukrowy bierze udział nie tylko w tworzeniu wiązań wodorowych. Jeśli w jego skład wchodzi grupy karboksylowe (gangliozydy) lub siarczanowe (sulfatydy) to może on uczestniczyć w oddziaływaniach jonowych. Wchodzące w skład niektórych łańcuchów cukrowych grupy acetylowe kwasu sjałowego i aminocukrów oraz grupy metylowe fukozy mają charakter hydrofobowy. Zdaniem Hakomoriego [73] „leżące” na błonie łańcuchy cukrowce cząsteczek glikosfingolipidów zawierające zarówno hydrofobowe, jak i polarne fragmenty, mogą brać udział w różnych oddziaływaniach ze składnikami błony oraz ligandami znajdującymi się w środowisku zewnętrznym. Przedstawiony przez Hakomoriego model nie uwzględnia jednak wszystkich wyników dotyczących ekspozycji łańcuchów cukrowych glikosfingolipidów znajdujących się w błonach fosfolipidowych (III-2).

III. Właściwości gangliozydów

III-1. Gangliozydy w roztworach wodnych (micele)

Z wyjątkiem monosjalomonohexosyloceramidów (GM_4 , tabela 1) gangliozydy są dość dobrze rozpuszczalne w wodzie. W zależności od stężenia tworzą one roztwory właściwe lub micelle [74—76], a przy zawartości wody poniżej 50% (wagowo) układy heksagonalne I upakowanych struktur cylindrycznych [77, 78].

Micelle gangliozydowe mają kształt spłaszczonej elipsoidy [79] lub dysku [80], i zawierają zwykle od 130 do 350 cząsteczek [79—81] upakowanych hydrofobowymi ceramidami do wnętrza a polarnymi łańcuchami oligosacharydowymi na zewnątrz [82]. Wielkość miceli zależy od ilości reszt kwasu sjałowego, a także budowy ceramidu tworzących je cząsteczek gangliozydów [79, 81, 83]. Cząsteczki te są w micelach sztywno upakowane; wykazują niewielką ruchliwość ograniczającą się do obrotu wokół osi ceramidu [84, 85]. Gangliozydy mają zdolność wiązania dużych ilości wody; około 50 lub więcej cząsteczek na cząsteczkę glikolipidu [75].

Nie wiadomo, czy łańcuchy węglowodorowe ceramidów tworzące wnętrze tych miceli wykazują zależną od temperatury zmianę uporządkowania typu żel — ciekły kryształ. Przedstawiono wyniki i argumenty przemawiające za [77, 86—88] ale także i przeciwko [89—91] takiej właściwości ceramidów w micelach. Temperatura wpływa na trwałość miceli; poniżej 20°C cząsteczki gangliozydów przechodzą z nich do roztworu znacznie wolniej niż w 37°C [92].

Wyznaczenie krytycznego stężenia powstawania miceli gangliozydowych okazało się trudne. Początkowo sądzono, że rozpadają się one do monomerów przy stężeniu gangliozydów od 10^{-4}M do 10^{-5}M [79, 81, 82], ale późniejsze badania przyniosły wartości znacznie niższe. Wahwały się one od poniżej 10^{-6}M [80] poprzez około 10^{-8}M [93, 94] do 10^{-9}M [83]. Formisano i wsp. [93] sugerowali, że obserwowane we wcześniejszych pracach wartości krytycznego stężenia rozpadu miceli rzędu 10^{-4} — 10^{-5}M nie odpowiadają ich dysocjacji do monomerów ale zmianie stopnia agregacji.

Powstawanie miceli gangliozydowych, ich charakter i stopień agregacji ma duży wpływ na przebieg reakcji katalizowanych przez działające na gangliozydy enzymy [95—101], oraz na inne oddziaływania, w których te gliokosfingolipidy uczestniczą [102].

Przyjmuje się, że w polarnych rozpuszczalnikach organicznych gangliozydy występują w formie monomerów [82, 83] chociaż obecności: niewielkich agregatów nie można wykluczyć. W rozpuszczalnikach niepolarnych gangliozydy mogą, z dodatkiem Tritonu X-100, tworzyć micelle odwrócone [103].

III-2. Gangliozydy w błonach fosfolipidowych

III-2.1. Liposomy, skupienia, ruchliwość

Gangliozydy nie występują same w formie struktur lamelarnych, jednak dodatek odpowiedniej ilości fosfolipidów powoduje, że wchodzi one w skład dwuwarstwowych błon liposomów lub jednowarstwowych błon na granicy woda — powietrze [74—76, 104, 105]. Zawartość gangliozydów w błonach nie można jednak przekroczyć określonej w danych warunkach wartości krytycznej powyżej której układ staje się micelą mieszaną [74—76, 104]. Krytyczne stężenie gangliozydów w błonach fosfolipidowych jest odwrotnie proporcjonalne do ilości reszt kwasu sjałowego wchodzących w skład ich cząsteczek. Zawartość monosjałogangliozydu GM_1 nie może przekroczyć 25% (molekularnych) [89, 106] disjałogangliozydu GD_{1a} 15% [107] a trisjałogangliozydu GT_{1b} 10% [107, 108]. Dodatek cholesterolu pozwala na występowanie w błonach wyższych od podanych ilości gangliozydów. Być może jest to wynikiem tworzenia się wiązań wodorowych między grupą -OH cholesterolu a $-C=O$ wiązania amidowego ceramidu (strefa pośrednia Ryc. 1) [109]. Kationy Ca^{+2} i Mg^{+2} także stabilizują, chociaż na innej zasadzie, błony zawierające duże ilości gangliozydów pozwalając prawie na podwojenie ich krytycznego stężenia [110]. Obserwacja ta stała się podstawą jednej z wersji hipotezy dotyczącej udziału gangliozydów w przekazywaniu bodźców poprzez połączenia synaptyczne [74, 110].

Błony liposomów, otrzymanych po uprzednim zmieszaniu wszystkich składników w rozpuszczalniku organicznym, charakteryzują się nieco wyższą zawartością gangliozydów w warstwie zewnętrznej niż wewnętrznej [75, 111]. Związki te można także wprowadzić do już uformowanych liposomów inkubując je razem w roztworach wodnych [92, 112, 113]. W takich warunkach gangliozydy wbudowują się jedynie do zewnętrznej warstwy lipidów błony i nie ulegają przemieszczeniu do warstwy wewnętrznej [92, 113]. Przebiegający spontanicznie proces wybudowywania się gangliozydów do liposomów ulega zahamowaniu kiedy ich zawartość w błonach osiągnie około 12—15% [107, 113], a więc w warstwie wewnętrznej aż 30% [113]. Czynnikiem decydującym o kinetyce tego procesu jest szybkość z jaką cząsteczki gangliozydów „opuszczają” micelle [113]. Przyjmuje się zatem, że rozproszone w błonie fosfolipidowej gangliozydy stanowią układ termodynamicznie korzystniejszy, niż składający się z liposomów i miceli.

Łańcuchy cukrowcowe gangliozydów wystają poza błonę fosfolipidową. Nie udało się jednak ustalić w jaki sposób są nad jej powierzchnią eksponowane. Nie wszystkie wyniki zgodne są z hipotezą [73], że łańcuch oligosacharydowy glikosfingolipidów „leży” na powierzchni błony. Skarjune i Olfiełd [114] podają, że „płaszczyzna” pierścienia heksozy w glukozyloceramidzie skierowana jest prostopadle do powierzchni błony. W podobny sposób może być eksponowany łańcuch gangliozydu GM_1 [115]. W opracowanym przez Maggion i w s.p. [105] modelu disjałogangliozydu GD_{1a} łańcuch cukrowcowy może zajmować różną, zależną od warunków (stopień upakowania, ładunek elektry-

czny) pozycję względem powierzchni błony — od nachylonej pod kątem 10° do prostopadłej.

Nie udało się jak dotąd znaleźć jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy gangliozydy w błonach fosfolipidowych w stanie ciekłego kryształu tworzą skupienia, tak jak glikosfingolipidy obojętne, [76] czy też występują jako pojedyncze cząsteczki rozproszone wśród innych lipidów.

Podobne wyniki interpretowane były niekiedy jako dowody występowania skupień gangliozydowych [116, 117], albo ich braku [75, 118]. Wiadomo, że w błonach fosfolipidów będących w stanie żelu gangliozydy tworzą skupienia [119] niekiedy bardzo duże [117]. W błonach w stanie ciekłego kryształu skupienia te stają się wielokrotnie mniejsze [117] lub nikną zupełnie [75, 118]. Na podstawie obserwacji ruchów łańcuchów cukrowych gangliozydów znajdujących się w błonach w stanie ciekłego kryształu wnioskowano, że mogą one tworzyć skupienia [85, 120]. Odmienny pogląd przedstawili Brown i Thompson [121] opierając się na badaniach międzybłonowej wymiany glikosfingolipidów. Cząsteczki gangliotetraozyloceramidu tworzyły skupienia, natomiast cząsteczki zbliżonego do niego budową gangliozydu GM_1 — nie wykazywały tej właściwości [121]. Różna zdolność do agregacji w błonach fosfolipidowych glikosfingolipidów obojętnych i gangliozydów [75, 76] spowodowana jest występowaniem w tych ostatnich zdysocjowanych grup karboksylowych kwasu sjałowego (pK około 2). Czynniki zmniejszające wzajemne odpychanie się ładunków elektrycznych tych grup mogą powodować agregację gangliozydów [110].

W błonach fosfolipidowych cząsteczki gangliozydów wykazują znaczną ruchliwość dyfundując w płaszczyźnie lateralnej z szybkością około $5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \times \text{s}^{-1}$ [122]. Wykonują one takie ruchy w płaszczyźnie poprzecznej błony. Łańcuchy węglowodorowe cząsteczek gangliozydów charakteryzują się gradientem ruchliwości malejącym w kierunku wiązania amidowego (Ryc. 1) [84]. Atom C-2 sfingozyny wykazuje taką samą ruchliwość jak łańcuch cukrowy [84]. Ten ostatni wydaje się wykonywać różne ruchy zachowując z niewielkimi odchyleniami swoją konformację [84, 123, 124].

III. 2.2. Wpływ gangliozydów na właściwości błon

Wprowadzone do błon fosfolipidowych gangliozydy wpływają na upakowanie cząsteczek fosfatydylocholino [87, 88, 91, 105, 108, 125—127] i fosfatydyloetanoloaminy [128]. Miarą wzajemnych oddziaływań są m.in. zmiany właściwości termicznych błon. Gangliozydy powodowały zwykle rozciągnięcie i spłaszczenie krzywej termicznej przejścia żel — ciekły kryształ [88, 108, 125] i niewielką zmianę T_t przy prawie stałej wartości ΔH [108, 125]. Szczególny wpływ gangliozydów na uporządkowanie cząsteczek fosfolipidów zaobserwowano w błonach fosfatydyloetanoloaminy [128]. Gangliozyd GD_{1a} w temperaturze powyżej T_t tworzył półpłynne mikrodomeny w których jedna cząsteczka glikosfingolipidu oddziaływała na sześć cząsteczek fosfolipidu.

Gangliozydy, podobnie, choć w mniejszym stopniu niż glikosfingolipidy obojętne [76], powodują wzrost lepkości błon fosfolipidowych [87, 107, 126]. Wpływ ich maleje wraz ze wzrostem ilości reszt kwasu sjałowego oraz skracaniem długości łańcuchów cukrowcowych [87].

Grupy karboksylowe kwasu sjałowego gangliozydów (pK około 2) zdysocjowane w warunkach fizjologicznych nadają błonom ujemny ładunek elektryczny. Gangliozydy wpływają na potencjał powierzchniowy [129], pojemność elektryczną [130] i przewodnictwo [131] błon fosfolipidowych. Wymienione efekty zależą od budowy ich łańcuchów cukrowcowych [125, 132].

Gangliozydy powodują nie tylko zmiany uporządkowania reszt kwasów tłuszczowych fosfolipidów, widoczne w badaniach właściwości termicznych błon. Powierzchnia błony jest miejscem wzajemnych oddziaływań łańcuchów cukrowcowych gangliozydów i części „głowych” fosfolipidów [105, 127], obserwowanych np. jako zmiana ruchliwości grup $-CH_3$ fosfatydylocholine [91]. Maggio i wsp. [105] zauważyli, że łańcuchy cukrowcowe niektórych gangliozydów mogą tworzyć z częścią głową fosfatydylocholine układy, w których momenty wektorów dipolowych tych cząsteczek nawzajem się znoszą. Zjawisko to może powodować bliższe upakowanie tych lipidów.

Gangliozydy zwiększają trwałość liposomów w obecności surowicy [133], efekt związany z ładunkiem elektrycznym, a także ograniczają z przyczyn niewyjaśnionych ich lizę w obecności dopełniacza [134].

W wielu pracach badano wzajemne oddziaływania gangliozydów, fosfolipidów i niektórych białek w układach modelowych [135—138]. Zagadnienia te wykraczają poza ramy tego artykułu. Należy jednak zaznaczyć, że w układach o wiele prostszych tworzące je cząsteczki wzajemnie modyfikują swoje właściwości. Fosfolipidy wchodzące w skład liposomów wpływają na ich aglutynację pod wpływem lektyn reagujących z łańcuchami cukrowcowymi znajdujących się w tych błonach gangliozydów [139].

III-3. Gangliozydy błon komórkowych

III-3.1. Występowanie w błonie plazmatycznej

Z wyjątkiem przypadków wadliwego katabolizmu glikokonjugatów [140, 141] około 70 do 90% gangliozydów komórek znajduje się w zewnętrznej warstwie lipidów błony plazmatycznej [142, 143]. Takie występowanie wynika z ukierunkowanego charakteru biosyntezy tych związków oraz biogenezy błony komórkowej, a także i stąd, że nie ulegają one wymianie między warstwami błony [92, 113]. Egzogenne gangliozydy wbudowują się z równą łatwością do wewnętrznej lub zewnętrznej warstwy błony plazmatycznej limfocytów po otrzymaniu z niej różnie odwróconych (outside/inside out) pęcherzyków [144].

Poza błoną plazmatyczną gangliozydy wykrywa się także w błonach aparatu Golgiego, lisosomach, w niewielkiej ilości w innych organellach a także

w cytoplazmie [53, 143]. Biosynteza gangliozydów [53] i asymetria błon komórkowych [145] zostały przedstawione w Postęпах Biochemii.

Błony plazmatyczne komórek są strukturami znacznie bardziej skomplikowanymi od błon liposomów. Przyczyną tego jest charakterystyczny skład tworzących je lipidów i białek oraz ich metabolizm, czasami bardzo szybki i selektywny. Na uporządkowanie składników błony wpływa szkielet komórkowy. Dlatego wnioski dotyczące zachowania się gangliozydów w błonach komórkowych są słuszne jedynie dla określonych warunków doświadczalnych.

Gangliozydy rozmieszczone są równomiernie na powierzchni tymocytów (jako pojedyncze cząsteczki lub skupienia) i mogą swobodnie dyfundować w płaszczyźnie błony [146, 147]. Inaczej w komórkach nabłonka nerki. Ich apikalny (skierowany do wnętrza kanalików nerkowych) i bazolateralny (sąsiadujący z innymi komórkami) fragment błony plazmatycznej różni się składem gangliozydów [148, 149]. Sytuacja ta nie tylko ilustruje ukierunkowany charakter biogenezy błony komórkowej ale także brak zdolności glikosfingolipidów do dyfundowania poprzez połączenia zamykające (tight junctions) [148—150]. Połączenia zamykające, zwane także ścisłymi, nie stanowią ograniczenia jedynie dla tych składników błony, które ulegają wymianie między jej wewnętrzną i zewnętrzną warstwą, a samo przejście odbywa się w wewnętrznej warstwie tworzących ją lipidów [148, 151].

Tak jak w liposomach, gangliozydy komórek ruchliwe są w lateralnej (szybkość dyfuzji około 10^{-8} $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [146, 147]) i poprzecznej płaszczyźnie błony plazmatycznej [85, 124]. Ich łańcuchy cukrowce wystają w tymocytach na około 3.7 nm poza powierzchnię błony [152] przypominając ekspozycję gangliozydu GM_1 w błonach fosfatydylocholinoi [115]. Spiegel i w s p. [147] stosując sprzężone z fluoryzującym znacznikiem gangliozydy zaobserwowali, że mogą one tworzyć w błonach komórkowych skupienia. Do podobnego wniosku doszli H a k o m o r i i K a n n a g i [153] obserwując „maskowanie” krótkich łańcuchów glikosfingolipidów przez łańcuchy dłuższe wchodzące w skład innych cząsteczek tych związków. Odmiennie obserwacje przedstawiły S h a r o m i R o s s [144]. Sprzęgnięte ze znacznikiem spinowym gangliozydy po wbudowaniu do izolowanych błon limfocytów świni nie tworzyły skupień zachowując się zdaniem autorek inaczej niż w błonach fosfolipidowych [144, 154].

III-3.2. Oddziaływania ze szkieletem komórkowym

Nie udało się dotychczas wyjaśnić czy gangliozydy mogą się wiązać z elementami szkieletu komórkowego. Na taką możliwość wskazują obserwacje dotyczące tworzenia się na powierzchni komórek czapeczek w następstwie wiązania się toksyny *Vibrio cholerae* [147, 155—158] lub przeciwciał [159] z gangliozydem GM_1 błony. Zjawisko to wymagało dopływu energii i nieuszkodzonego szkieletu komórkowego [155—158]. Rozmieszczenie czapeczek na powierzchni błony odpowiadało występowaniu aktywniny po jej wewnętrznej stronie [158]. Mechanizm powstawania czapeczek nie został dotychczas wyjaśniony [160—162]

i wymienione obserwacje nie są dowodami ale jedynie sugestią oddziaływań między gangliozydami a szkieletem komórkowym. Podobnie wypada traktować spostrzeżenia dotyczące wiązania się toksyny *Vibrio cholerae* przez gangliozyd GM₁ z elementami szkieletu komórkowego pozostającymi po ekstrakcji błon detergentami [163—165]. Interpretując powyższe wyniki należy pamiętać, że łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych i sfingozyny mogą niekiedy sięgać do wewnętrznej warstwy lipidów [166], ale jej nie przebijają. Dlatego w hipotetycznych oddziaływaniach między gangliozydami a szkieletem komórkowym zakłada się „pośrednictwo” białek. Wiążące się z gangliozydami białka zostały wspomniane przez Wiegandta [9], a także Hakomoriego [167]. Nie wiadomo jednak czy białka te mogą oddziaływać z elementami szkieletu komórkowego.

III-3.3. Wiązanie się egzogennych gangliozydów z błonami komórkowymi

Gangliozydy, a także inne glikosfingolipidy, mają zdolność wiązania się z błonami komórkowymi. Zjawisku temu może towarzyszyć pojawienie się nowych — określonych budową łańcuchów cukrowcowych—antygenów [168], receptorów toksyn [169—173] i wirusów [174], a także zmiana charakteru wzrostu komórek [23, 167, 175—180]. Gangliozydy przyłączają się do błon komórkowych w różny sposób. Słabo związane można usunąć roztworami soli lub surowicy [144, 181], silnie związane — prawdopodobnie z białkami błony — można odtrawić trypsyną [181—183]. Pozostałe po traktowaniu błon trypsyną gangliozydy są nie tyle związane, co wbudowane w błonę z ceramidem wchodzącym w skład tworzącej ją zewnętrznej warstwy lipidów [144, 183]. Nie różnią się one swym zachowaniem od glikosfingolipidów endogennych [146, 147] i mogą być substratami hydrolaz [173, 184—187] i glikozylotransferaz [173, 187] komórki. Procentowy udział gangliozydów związanych z błoną lub wbudowanych do błony komórkowej zależy od warunków inkubacji: temperatury, czasu, stężenia glikosfingolipidów oraz od rodzaju komórek [123, 181—183].

Gangliozydy, które można usunąć przy pomocy trypsyny występują w formie związanych z białkami błon miceli [183, 187]. Pojedyncze cząsteczki mogą micelle opuszczać i wbudowywać się do błon komórkowych [183, 187]. Proces ten wymaga odpowiedniej temperatury od której zależy płynność błony, a także szybkość z jaką cząsteczki uwalniane są z miceli [92]. Przykładem jest tu gangliozyd GM₁ zaadsorbowany na błonach komórkowych, w temperaturze 4°C, prawdopodobnie w formie miceli. Może on wiązać toksynę *Vibrio cholerae* ale nie prowadzi to do aktywacji cykazy adenylowej [23]. Najprawdopodobniej toksyna w takich warunkach wiąże się z cząsteczkami gangliozydu wchodzącego w skład miceli a nie błony komórkowej i podjednostki A tego białka nie mogą przenikać do wnętrza komórki.

Czynnikiem ograniczającym wiązanie się gangliozydów z błonami jest stosowana w pożywkach surowica [181, 188], ponieważ wchodzące w jej skład

białka tworzą z tymi glikosfingolipidami kompleksy [189]. Pomimo to znajdujące się w surowicy glikosfingolipidy mogą, choć znacznie wolniej niż w pożywkach syntetycznych, wbudowywać się do błon komórkowych. Klasycznymi przykładami są tu antygeny Lewis erytrocytów [168, 190] i gangliozyd GM₁ [23, 188].

Wbudowywanie się gangliozydów do błon komórkowych nie obejmuje wszystkich mechanizmów pobierania przez komórki glikosfingolipidów ze środowiska. W plazmie ssaków związki te występują w formie kompleksów z lipoproteinami [191, 192] a ich wymiana z błonami erytrocytów ma charakter selektywny. Wzrostowi stężenia glikosfingolipidów plazmy nie towarzyszy podwyższenie ich zawartości w erytrocytach [193, 194]. Na uwagę zasługuje także pobieranie i metabolizm związanego z lipoproteinami (LDL) laktozyloceramidu przez komórki nerki człowieka [195]. Związek ten mógł być substratem hydrolaz i glikozylotransferaz a szybkość jego przemian zależała od tego czy był pobrany za „pośrednictwem” receptorów lipoprotein czy też na innej, bliżej nie opisanej drodze. Badania te, chociaż nie dotyczą bezpośrednio gangliozydów, świadczą o złożoności oddziaływań między komórkami a związanymi z lipoproteinami glikosfingolipidami i o występowaniu różnych mechanizmów ich pobierania ze środowiska.

III-3.4. Uwalnianie (shedding) gangliozydów błon komórkowych

Uwalnianie (złuszczenie) białek i lipidów błony plazmatycznej, a także całych jej fragmentów w formie mikropęcherzyków do środowiska jest normalnym procesem życiowym komórek [196, 197]. Uwalniane fragmenty błon różnią się składem białek [197, 198, 199] i lipidów [199—201] od błon plazmatycznych komórek z których pochodzą. Omawiane zjawisko ma zatem charakter selektywny. Uwalnianie znacznych ilości gangliozydów 50% i więcej ich zawartości w błonie w ciągu doby obserwowano podczas hodowli niektórych komórek [201—203]. Proces ten przebiegał szczególnie intensywnie przy ich małej gęstości [201]. *In vivo* uwalnianie dużych ilości gangliozydów wydaje się towarzyszyć różnicowaniu się tymocytów w grasicy cielęcej [200]. Uwolnione z błon komórkowych gangliozydy występują w środowisku w różnych mało zbadanych formach: fragmentów (mikropęcherzyków) błony plazmatycznej, kompleksów z lipoproteinami i albuminą [199, 200]. Można zatem przypuszczać, że omawiane zjawisko przebiega przynajmniej dwiema drogami. Do takiego wniosku doszli Young i wsp. [204], którzy wykryli, że gangliotriazyloceramid (glikosfingolipid obojętny), zawierający w swej budowie C-24 kwas tłuszczowy, uwalniany jest wraz z fragmentami błony, natomiast jego odmiana o C-16 kwasie tłuszczowym tworzy kompleksy z lipoproteinami lub albuminą.

Nie wiadomo jaką rolę w „przechodzeniu” glikosfingolipidów błon komórkowych do plazmy pełnią kompleksy lipoproteinowe o niskiej (LDL) i wysokiej (HDL) gęstości. Kompleksy te (HDL) mogą być akceptorami glikosfingolipidów przejmując je z błon liposomów [205, 206] modyfikowanych, hydrofobowych powierzchni kulek szklanych [207] i błon komórkowych [208].

III-3.5. Międzybłonowa wymiana gangliozydów

Spontaniczna wymiana glikosfingolipidów między błonami fosfolipidowymi przebiega bardzo wolno. Charakteryzujący ją czas wymiany połowy glukozyloceramidu wynosi 30 dni [209], a gangliotetraozyloceramidu 24 dni [210]. W przypadku gangliozydów proces ten przebiega znacznie szybciej. Monosjalo-gangliozyd GM₁ ulega wymianie w czasie prawie 10 krotnie krótszym niż różniący się od niego jedynie brakiem kwasu sjałowego gangliotetraozyloceramid [121]. Zdaniem B r o w n a i T h o m p s o n a [121] różnica ta wynika stąd, że glikosfingolipidy obojętne — a nie gangliozydy tworzą w błonie skupienia stabilizowane międzycząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi.

Szybkość międzybłonowej wymiany glikosfingolipidów zwiększa się bardzo wyraźnie — w przypadku glukozyloceramidu ponad 2000 razy [211] w obecności białkowych przENOŚNIKÓW glikosfingolipidów (glycolipid transfer proteins). Białka te, przypominające swoim działaniem przENOŚNIKI fosfolipidów [212], wykryto w mózgu [211, 212—216] śledzionie [217] i wątrobie [218] zwierząt. Wykazują one różną specyficzność w stosunku do przenoszonych lipidów od niewielkiej, charakteryzującej białkowe przENOŚNIKI lipidów wątroby [218] do dość wysokiej w przypadku częściowo oczyszczonych białek mózgu [216]. Dotychczas opisane białkowe przENOŚNIKI glikosfingolipidów mają zbliżoną masę cząsteczkową około 20 000 daltonów [215, 216]. Większość prac dotyczy białek przenoszących glikosfingolipidy obojętne, ale opisano również przENOŚNIKI aktywne także [215, 218, 219], a nawet przede wszystkim w stosunku do gangliozydów [216]. Mechanizm działania białek przenoszących glikosfingolipidy nie został w pełni wyjaśniony [211, 215]. Wiadomo z pewnością, że błony będące w tym procesie donorami i akceptorami glikosfingolipidów muszą być w stanie płynnego kryształu [211, 215]. Takie funkcje tych białek nie zostały dotychczas poznane. Białkowe aktywatory glikozydaz, warunkujące prawidłowy katabolizm glikosfingolipidów [220], też mogą katalizować międzybłonową wymianę gangliozydów (gangliozydu GM₂) [220]. Aktywatory glikozydaz mają jednak inne właściwości (choć podobną masę) niż białkowe przENOŚNIKI glikosfingolipidów [216]. Nie sprawdzono czy te ostatnie mogą aktywować glikozydazy lisosomalne.

III-3.6. Wzrost zawartości gangliozydów plazmy w chorobach nowotworowych

Niektórym chorobom nowotworowym zwierząt i ludzi towarzyszy wzrost zawartości gangliozydów w plazmie [222—225]. Przyczyny tego zjawiska nie zostały w pełni poznane, niemniej jedną z nich jest uwalnianie gangliozydów z błon komórek nowotworowych [225—227]. W wielu pracach opisano, że gangliozydy mogą hamować aktywność limfocytów T, B, komórek NK i makrofagów [29, 225]. Uwalnianie gangliozydów do środowiska traktowane jest przez wielu autorów jako jedna z przyczyn wymykania się komórek nowotworowych spod kontroli układu odpornościowego gospodarza [225]. Ostatnio L a d i s h i w s p. [227] uzyskali wyniki potwierdzające takie przypusz-

czenia. Gangliozydy wyizolowane z linii komórek białaczki myszy o dużej zdolności tworzenia nowotworów — wstrzyknięte razem z komórkami innej linii, nie mającymi tej właściwości, znacznie zwiększyły ilość powstających guzów.

Dokładne omówienie, czasami hipotetycznego, wpływu glikosfingolipidów na reakcje odpornościowe wykracza poza ramy tego artykułu. Zagadnienia te zostały ostatnio szczegółowo opisane w literaturze [29, 224, 225].

Dr Robertowi Krauze za cenne uwagi dotyczące budowy glikosfingolipidów oraz dr Andrzejowi Piaskowi za liczne dyskusje składam serdeczne podziękowania.

Artykuł otrzymano 26 maja 1988 r.

Zaakceptowano do druku 17 czerwca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. K lenk, E., (1935) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **235**, 24—36
2. Blix, G., (1938) *Scand. Arch. Physiol.* **80**, 466
3. K lenk, E., (1942) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **273**, 76—86
4. R ö s n e r, H., (1980) *Anal. Biochem.* **109**, 437—442
5. F i n n e, J., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11966—11970
6. F i n n e, J., (1985) *Trends Biochem. Sci.* **10**, 129—132
7. S c h a u e r, R., (1982) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **40**, 131—234
8. L e e d e n, R. W., Yu, R. K., (1982) w *Methods in Enzymol.* red. Ginsburg., **83**, 139—191 Academic Press. N.Y. London
9. W i e g a n d t, H., (1985) w *New Comprehensive Biochem.* red. Wiegandt, H. t. 10, str. 199—260; Elsevier, Amsterdam, N.Y. Oxford
10. F i s h m a n, P. H., Brady, R. O., (1976) *Science*, **194**, 906—915
11. C r i t c h l e y, D. R., Ansell, S., Dilks, S., (1979) *Biochem. Soc. Trans.* **7**, 314—319.
12. Y a m a k a w a, T., Nagai, Y., (1978) *Trends Biochem. Sci.* **3**, 128—131
13. M u l l i n, B. R., Pacuszka, T., Lee, G., Kohn, L. D., Brady, R. O. Fishman, P. H., (1978) *Science*, **199**, 77—79
14. P a c u s z k a, T., Osborne, J. C., Brady, R. O., Fishman, P. H., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 764—768
15. F i s h m a n, P. H., Bradley, R. M., Rebois, R. V., Brady, R. O., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7983—7989
16. B r u c h, R. C., Thotakura, N. R., Bahl, O. P., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9450—9460
17. F i s h m a n, P. H., (1982) *J. Membrane Biol.* **69**, 85—97
18. P a c u s z k a, T., Bradley, R. M., (1980) *Post. Biochem.* **26**, 585—612.
19. A n d o, S., (1983) *Neurochem. Int.* **5**, 507—537
20. R a h m a n n, H., (1978) *Jap. J. Exp. Med.* **48**, 85—96
21. R a h m a n n, H., Probst, W., Mühleisen, M., (1982) *Jap. J. Exp. Med.* **52**, 275—286
22. S e y f r i e d, T. N., Yu, R. K., (1985) *Molec. Cell. Biochem.* **68**, 3—10
23. F i s h m a n, P. H., (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 137—151
24. S w e e l e y, C. C., Nunez, H. A., (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 765—801
25. Y u, R. K., Koerner, T. A. W., Scarsdale, J. N., Prestegard, J. H. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 27—48
26. L e v e r y, S. B., Hakomori, S., (1986) w *Methods in Enzymol.* red. Ginsburg, V., t. 138, 13—25; Academic Press. Inc. Orlando

27. Magnani, J. L., Nilsson, B., Brockhaus, M., Zopf, O., Stęplewski, Z., Koprowski, H., Ginsburg, V., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 14365—14369
28. Magnani, J. L., Spitalnik, S. L., Ginsburg, V., (1986) w *Methods in Enzymol.* red. Ginsburg, V., t. 138, str. 195—207
29. Curatolo, W., (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **906**, 137—160
30. Miller-Podraza, H., (1985) *Acta Haematol. Pol.* **16**, 185—203
31. I.U.P.A.C.-I.U.B. Commission on Biochemical Nomenclature (1977) *Lipids* **12**, 455—463
32. Svennerholm, L., (1964) *J. Lipid Res.* **5**, 145—155
33. Svennerholm, L., (1980) w *Adv. Exp. Med. Biology* red. Svennerholm, L., Mandel, P., Dreyfus, H., Urban, P-F., t. 125 str. 11, Plenum Press, N.Y. London
34. Numata, M., Sugimoto, M., Koike, K., Ogawa, T., (1987) *Carbohydr. Res.* **163**, 209—225
35. Mansson, J.-E., Fredman, P., Bigner, D. D., Molin, K., Rosengren, B., Friedman, H.S., Svennerholm, L., (1986) *FEBS-Lett.*, **201**, 109—113
36. Watanabe, K., Hakomori, S., (1979) *Biochemistry* **18**, 5502—5504
37. Iwamori, M., Sunada, S., Ishihara, E., Moki, M., Fujimoto, S. Nagai, Y., (1986) *FEBS-Lett.* **198**, 66—70
38. Murayama, K., Levery, S. B., Schirmacher, V., Hakomori, S., (1986) *Cancer Res.* **46**, 1395—1402
39. Fukuda, M. N., Bothner, B., Lloyd, K., Rettig, W. J., Tiller, P. R., Dell, A., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5145—5153
40. De Gaspari, R., Koerner, T. A. W., Ishikawa, Y., Li, S.-C., Li, Y.-T., (1987) w *Proc. 9-th Int. Symp. Glycoconjugates*, Lille, July 1987, red. Montreuil, J., Verbert, A., Spik, G., Fournet, B., str. A—8. A. Lerouge, Tourcoing, France
41. Smirnova, G. P., Kochetkov, N. K., Sadovskaia, V. L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **920**, 47—55
42. Schauer, R., (1986) w *Methods Enzymology*, red. Ginsburg, V., t. 138, str. 132—161 Acad. Press, Orlando
43. Schwarting, G.A., Gajewski, A., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 5893—5898
44. Yamakawa, T., Suzuki, A., Hashimoto, Y., (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 75—90
45. Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukui, Y., Naiki, M., Matsumoto M., Ueda, S., Kato, S., (1985) *Cancer Res.* **45**, 3796—3802
46. Yu, R. K., Koerner, T. A. W., Ando, S., Yohe, H. C., Prestegard, J. H., (1985) *J. Biochem.* **98**, 1367—1373
47. Riboni, L., Sonnino, S., Acquotti, D., Malesci, A., Ghidoni, R., Egge, H., Mingrino, S., Tettamanti, G., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8514—8519
48. Acquotti, D., Fronza, G., Riboni, L., Sonnino, S., Tettamanti, G., (1987) *Glycoconjugate J.* **4**, 119—127
49. Kuhn, R., Muldner, J., (1964) *Naturwissenschaften* **51**, 635—636
50. Samuelsson, K., Samuelsson, B., (1970) *Chem. Phys. Lipids* **5**, 44—79
51. Karlsson, K.-A., (1970) *Chem. Phys. Lipids* **5**, 6—43
52. Sweeley, C. C., Siddiqui, B., (1977) w *The Glycoconjugates*, t. 1. red. Horowitz, M.I., Pigman, W. Academic Press, N.Y., S. Francisco, London, str. 459—540
53. Miller-Podraza, H., (1984) *Post. Biochem.* **30**, 379—408
54. Fukushi, Y., Nudelman, E., Levery, S. B., Hakomori, S., Rauvala, H., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10511—10517
55. Ando, S., Yu, R. K., (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 12224—12229
56. Breimer, M. E., Hansson, G. C., Karlsson, K.-A., Leffler, H., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 557—568
57. Iwamori, M., Shimomura, J., Tsuyuhara, S., Nagai, Y., (1984) *J. Biochem.* **95**, 761—770
58. Ullman, M. D., Ventura, R. F., (1987) *J. Lipid Res.* **28**, 878—882

59. Suzuki, M., Nakamura, K., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yamakawa, T., (1986) *Carbohydr. Res.* **151**, 213—223
60. Hashimoto, Y., Otsuka, H., Yamakawa, T., (1982) *J. Biochem.* **91**, 1039—1046
61. Watanabe, K., Powell, M. E., Hakomori, S., (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 8223—8229
62. Karlson, K.-A., (1982) w *Biological Membranes* red. Chapman, D. t. 5 str. 1—74. Academic Press, London
63. Bouhours, D., Bouhours, J. F., (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **794**, 169—171
64. Li, Y.-T., Hirabayashi, Y., De Gasperi, R., Yu, R. K., Ariga, T., Koerner, T. A. W., Li, S.-C., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 8980—8985
65. Macher, B., Pacuszk a, T., Mullin, B. R., Sweeley, C. C., Brady, R. O., Fishman, P. H., (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **568**, 35—43
66. Sonnino, S., Acquotti, D., Riboni, L., Giuliani, A., Kirschner, G., Tettamanti, G., (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 3—26
67. Pascher, I., (1976) *Biochem. Biophys. Acta* **455**, 433—445
68. Pascher, I., Sundell, S., (1977) *Chem. Phys. Lipids* **20**, 175—191
69. Wynn, C. H., Marsden, A., Robson, B., (1986) *J. Theor. Biol.* **119**, 81—87
70. Ong, R. L., Yu, R. K., (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **245**, 157—166
71. Wynn, C. H., Robson, B., (1986) *J. Theor. Biol.* **1231**, 221—230
72. Wynn, C. H., (1986) *Biochem. J.* **240**, 921—924
73. Hakomori, S., (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 209—233
74. Tettamanti, G., Sonnino, S., Ghidoni, R., Masserini, M., Venerando, B., (1985) *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions*, str. 607—636. X.C. Corso, Soc. Ital. Fis. Bologna
75. Thompson, T. E., Tillack, T. W., (1985) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **14**, 361—386
76. Curatolo, W., (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **906**, 111—136
77. Curatolo, W., Small, D. W., Shipley, G. G., (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **468**, 11—20
78. Gemel, J., (1984) *Post. Biochem.* **30**, 353—378, Ryc. 3
79. Yohe, H. C., Roark, D. E., Rosenberg, A., (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 7083—7087
80. Corti, M., Degiorgio, V., Ghidoni, R., Sonnino, R., Tettamanti, G., (1980) *Chem. Phys. Lipids* **26**, 225—238
81. Yohe, H. C., Rosenberg, A., (1972) *Chem. Phys. Lipids* **9**, 279—294
82. Gammack, D. B., (1963) *Biochem. J.* **88**, 373—383
83. Mraz, W., Schwarzmann, G., Sattler, J., Momoi, T., Seemann, B., Wiegandt, H., (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 177—185
84. Harris, P. L., Thornton, E. R., (1978) *J. Amer. Chem. Soc.* **100**, 6738—6745
85. Lee, P. M., Ketis, N. V., Barber, K. R., Grant, C. W. M., (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **601**, 302—314
86. Bach, D., Miller, J. R., Sela, B.-A., (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **686**, 233—239
87. Uchida, T., Nagai, Y., Kawasaki, Y., Wakayama, N., (1981) *Biochemistry* **20**, 162—169
88. Maggio, B., Ariga, T., Sturtevant, J. M., Yu, R. K., (1985) *Biochemistry* **24**, 1084—1092
89. Sillerud, L. O., Schafer, D. E., Yu, R. K., Konigsberg, W. H., (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10876—10880
90. Masserini, M., Freire, E., (1986) *Biochemistry* **25**, 1043—1049
91. Hinz, H. J., Körner, O., Nicolau, C., (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **643**, 557—571
92. Felgner, P. L., Freire, E., Barenholz, Y., Thompson, T. E., (1981) *Biochemistry* **20**, 2168—2172
93. Formisano, S., Johnson, M. L., Lee, G., Aloj, S. M., Edelhoich, H., (1979) *Biochemistry* **18**, 1119—1124
94. Ulrich-Bott, B., Wiegandt, H., (1984) *J. Lipid Res.* **25**, 1233—1245
95. Lipovac, V., Bigalli, G., Rosenberg, A., (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 7642—7648
96. Rauvala, H., (1976) *FEBS-Lett.* **65**, 229—233
97. Rauvala, H., (1979) *Eur. J. Biochem.* **97**, 555—564

98. Masserini, M., Sonnino, S., Ghidoni, R., Tettamanti, G., (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **601**, 282—288
99. Venerando, B., Cestaro, B., Fiorilli, A., Ghidoni, R., Preti, A., Tettamanti, G., (1982) *Biochem. J.* **203**, 735—742
100. Cestaro, B., Barenholz, Y., Gatt, S., (1980) *Biochemistry* **19**, 615—619
101. Masserini, M., Giuliani, A., Venerando, B., Fiorilli, A., D'Aniello, A., Tettamanti, G., (1985) *Biochem. J.* **229**, 595—603
102. Gambale, F., Marchetti, C., Usai, C., Robello, M., Gorio, A., (1984) *J. Neurosci. Res.* **12**, 355—375
103. Ghidoni, R., Sonnino, S., Masserini, M., Orlando, P., Tettamanti, G., (1981) *J. Lipid Res.* **22**, 1286—1295
104. Grant, C. W. M., (1986) *Chem. Phys. Lipids* **40**, 285—302
105. Maggio, B., Cummar, F. A., Caputto, R., (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **650**, 69—87
106. Bunow, M. R., Bunow, B., (1979) *Biophys. J.* **27**, 325—337
107. Bertoli, E., Masserini, M., Sonnino, S., Ghidoni, R., Caestaro, B., Tettamanti, G., (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **467**, 196—202
108. Myers, M., Wortman, C., Freire, E., (1984) *Biochemistry* **23**, 1442—1448
109. Barenholz, Y., Caestaro, B., Lichtenberg, D., Freire, E., Thompson, T. E., Gatt, S., (1980) *Adv. Exp. Med. Biol.* **125**, 105—123
110. Tettamanti, G., Preti, A., Cestaro, B., Venerando, B., Lombardo, A., Ghidoni, R., Sonnino, S., (1980) *Adv. Exp. Med. Biol.* **125**, 263—281
111. Thomas, P. D., Podder, S. K., (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **688**, 453—459
112. Kanda, S., Inoue, K., Nojima, S., Utsumi, H., Wiegandt, H., (1982) *J. Biochem.* **91**, 2095—2098
113. Felgner, P. L., Thompson, T. E., Barenholz, Y., Lichtenberg, D., (1983) *Biochemistry* **22**, 1670—1674
114. Skarjune, R., Oldfield, E., (1982) *Biochemistry* **21**, 3154—3160
115. Mc Daniel, R. V., Mc Intosh, T. J., (1986) *Biophys. J.* **49**, 94—96
116. Peters, M. W., Mehlhorn, J. E., Barber, K. R., Grant, C. W. M., (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **778**, 419—428
117. Mehlhorn, J. E., Parraga, G., Barber, K. R., Grant, C. W. M., (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **863**, 139—155
118. Thompson, T. E., Allietta, M., Brown, R. E., Johnson, M. L., Tillack, T. W., (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **817**, 229—237
119. Delmelle, M., Dufranc, S. P., Brasseur R., Ruyschaert, J. M. (1980) *FEBS-Lett.* **121**, 11—14
120. Lee, P. M., Grant, C. W. M., (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1299—1305
121. Brown, R. E., Thompson, T. E., (1987) *Biochemistry*, **26**, 5454—5460
122. Goins, B., Masserini, M., Barisas, B. G., Freire, E., (1986) *Biophys. J.* **49**, 849—856
123. Sharom, F. J., Grant, C. W. M., (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **507**, 280—293
124. Grant, C. W. M., (1984) *Canad. J. Biochem. Cell Biol.* **62**, 1151—1157
125. Maggio, B., Ariga, T., Sturtevant, J. M., Yu, R. K., (1985) *Biochem. Biophys. Acta* **818**, 1—12
126. Usai, C., Robello, M., Gambale, F., Marchetti, C., (1984) *J. Membrane Biol.* **82**, 15—23
127. Maggio, B., Cumar, F., Caputto, R., (1978) *Biochem. J.* **175**, 1113—1118
128. Tsao, Y. S., Freire, E., Huang, L., (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **900**, 79—87
129. McDaniel, R. V., McLaughlin, A., Winiski, A. P., Eisenberg, M., McLaughlin, S., (1984) *Biochemistry* **23**, 4618—4624
130. Usai, C., Marchetti, C., Gambale, F., Robello, M., Gorio, A., (1983) *FEBS-Lett.* **153**, 315—319
131. Brewer, G. J., Thomas, P. D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **776**, 279—287
132. Maggio, B., Cumar, F., Caputto, R., (1978) *Biochem. J.* **171**, 559—565

133. Allen, T. M., Ryan, J. L., Papahadjopoulos, D., (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **818**, 205—210
134. Okada, N., Yasuda, T., Okada, H., (1982) *Nature* **299**, 261—263
135. Sela, B.-A., Bach, D., (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **771**, 177—182
136. Fidelio, G.D., Maggio, B., Cumar, F. A., (1984) *Chem. Phys. Lipids* **35**, 231—245
137. Bach, D., Sela, B.-A., (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **819**, 225-230
138. Maggio, B., Sturtevant, J. M., Yu, R. K., (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2652—2659
139. Grant, C. W. M., Peters, M. W., (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 403—422
140. Terry, R. D., Weiss, M., (1963) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **22**, 18—55
141. Brady, R. O., (1982) *Ann. Rev. Neurosci.* **5**, 33—56
142. Miller-Podraza, H., Bradley, R. M., Fishman, P. H., (1982) *Biochemistry* **21**, 3260—3265
143. Fishman, P. H., Miller-Podraza, H., (1984) *Colloque INSERM/ CNRS, INSERM* **126**, 179—194
144. Sharom, E. J., Ross, E., (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **854**, 287—297
145. Pikuła, S., Sarzała, M. G., (1984) *Post. Biochem.* **30**, 107—148
146. Spiegel, S., Schlessinger, J., Fishman, P. H., (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 699—704
147. Spiegel, S., Kassis, S., Wilchek, M., Fishman, P. H., (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 1575—1581
148. Spiegel, S., Blumenthal, R., Fishman, P. H., Handler, J. S., (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **821**, 310—318
149. Spiegel, S., Handler, J., Fishman, P. H., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 15755—15760
150. Nichols, G. E., Shiraishi, T., Alietta, M., Tillack, T. W., Young, W. W., (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **930**, 154—166
151. Dragsten, P. R., Blumenthal, R., Handler, J. S., (1981) *Nature* **294**, 718—722
152. Spiegel, S., Skutelsky, E., Bayer, E. A., Wilchek, M., (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **687**, 27—34
153. Hakomori, S., Kannagi, R., (1983) *J. Nat. Cancer Inst.* **71**, 231—251
154. Lee, P. M., Grant, C. W. M., (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1299—1305
155. Revesz, T., Greaves, M., (1975) *Nature* **257**, 103—106
156. Craig, S. W., Cuatrecasas, P., (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3844—3848
157. Spiegel, S., Ravied, A., Wilchek, M., (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1034—1037
158. Kellie, S., Patel, B., Pierce, E. J., Critchley, D. R., (1983) *J. Cell Biology* **97**, 447—454
159. Sela, B.-A., Raz, A., Geiger, B., (1978) *Eur. J. Immunol.* **8**, 268—274
160. Bretscher, M. S., (1976) *Nature* **260**, 21—23
161. Stern, P. L., Bretscher, M. S., (1979) *J. Cell Biol.* **82**, 829—833
162. Oliver, J. M., Berlin, R. D., (1982) *Int. Rev. Cytol.* **74**, 55—94
163. Streuli, C. H., Patel, B., Critchley, D. R., (1981) *Exp. Cell Res.* **136**, 247—254
164. Hagmann, J., Fishman, P. H., (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **720**, 181—187
165. Sahyoun, N., Shatila, T., Le Vine, H., Cuatrecasas, P., (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 1216—1222
166. Grant, C. W. M., Menhorn, J. E., Florio, E., Barber, K. R., (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **902**, 169—177
167. Hakomori, S., (1981) *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 733—764
168. Marcus, D. M., Cass, L., (1969) *Science* **164**, 553—555
169. Cuatrecasas, P., (1973) *Biochemistry* **12**, 3558—3566
170. Moss, J., Fishman, P. H., Manganiello, V. C., Vaughan, M., Brady, R. O., (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1034—1037
171. Fishman, P. H., Moss, J., Vaughan, M., (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 4490—4494
172. Hughes, R. C., Gardas, A., (1976) *Nature* **264**, 63—66
173. Sonderfeld, S., Conzelman, E., Schwarzmann, G., Burg, J., Hinrichs, U., Sandhoff, K., (1985) *Eur. J. Biochem.* **149**, 247—255

174. Markwell, M. A., Moss, J., Hom, B. E., Fishman, P. H., Svennerholm, L., (1986) *Virology* **155**, 356—364
175. Bremer, E. G., Schlessinger, J., Hakomori, S., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2434—2440
176. Hanai, N., Nores, G., Torres-Mendez, C.-R., Hakomori, S., (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 127—134
177. Spiegel, S., Fishman, P. H., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 141—145
178. Nojiri, H., Takaku, F., Terui, Y., Miura, Y., Saito, M., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 782—786
179. Rodrig, N., Osanai, T., Iwamori, M., Nagai, Y., (1987) *FEBS-Lett.* **221**, 315—319
180. Yates, A. J., (1986) *Neurochem. Pathol.* **5**, 309—329
181. Facci, L., Leon A., Toffano, G., Sonnino, S., Ghidoni, R., Tettamanti, G., (1984) *J. Neurochem.* **42**, 299—305
182. Callies, R., Schwarzmann, G., Radsak, K., Siegert, R., Wiegandt, H., (1977) *Eur. J. Biochem.* **80**, 425—432
183. Schwarzmann, G., Hoffman-Bleihauer, P., Schubert, J., Sandhoff, K., Marsh, D., (1983) *Biochemistry* **22**, 5041—5048
184. Scheel, G., Acevedo, E., Conzelmann, E., Nehrkor, H., Sandhoff, K., (1982) *Eur. J. Biochem.* **127**, 245—253
185. Scheel, G., Schwarzmann, G., Hoffman-Bleihauer, P., Sandhoff, K., (1985) *Eur. J. Biochem.* **153**, 29—35
186. Raghavan, S., Lyerla, T. A., Krusell, A., Kolodny, E. H., 1987 *Biochim. Biophys. Acta* **917**, 42—47
187. Fishman, P. H., Bradley, R. M., Hom, B. E., Moss, J., (1983) *J. Lipid. Res.* **24**, 1002—1011
188. Fishman, P. H., Bradley, R. M., Moss, J., Manganiello, V. C., (1978) *J. Lipid. Res.* **19**, 77—81
189. Venerando, B., Roberti, S., Sonnino, S., Fiorilli, A., Tettamanti, G., (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **692**, 18—26
190. Hanfland, P., Kordowicz, M., Peter-Katalinic, J., Pfannschmidt, G., Grawford, R. J., Graham, H. A., Egge, H., (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 655—672
191. Dawson, G., Kruski, A. W., Scanu, A. M., (1976) *J. Lipid Res.* **17**, 125—131
192. Chatterjee, S., Kwitierovich, P. O., (1984) *Canad. J. Biochem. Cell Biol.* **62**, 385—397
193. Clarke, J. T. R., Stoltz, J. M., Mulcahey, M. R., (1976) *Biochim Biophys. Acta* **431**, 317—325
194. Dawson, G., Oh, J. Y. (1977) *Clin. Chim. Acta* **75**, 149—153
195. Chatterjee, S., Clarke, K. S., Kwitierovich, P. O., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13480—13486
196. Black, P. H., (1980) *Adv. Cancer Res.* **32**, 75—199
197. Doljanski, F., (1982) w *The Glycoconjugates*, red. Horowitz, M. I., t. IV B, str. 155—187 Academic Press, New York, London
198. Trams, E. G., Lauter, C., Salem, N., Heine, U., (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **645**, 63—70
199. Barz, D., Goppelt, M., Szamel, M., Schirmacher, V., Resch, K., (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **814**, 77—84
200. Dyatlovitskaya, E. V., Snitsyna, E. V., Jung, K., Azizov, Y. M., Bergelson, L. D., (1983) *Eur. J. Biochem.* **131**, 601—605
201. Shaposhnikova, G. J., Prokazova, N. V., Buznikov, G. A., Zvezdina, N. D., Teplitz, N. A., Bergelson, L. D., (1984) *Eur. J. Biochem.* **140**, 567—570
202. Hakomori, S., Young, W. W., (1978) *Scand. J. Immunol.* **7**, Suppl. **6**, 97—117
203. Ladish, S., Gillard, B., Wong, C., Ulsh, L., (1983) *Cancer Res.* **43**, 3808—3813
204. Young, W. W., Borgman, Ch. A., Wolock, D. M., (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2279—2283
205. Kwok, B. C. P., Shen, B. W., Dawson, G., (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9698—9704
206. Shen, B. W., Kwok, B. C. P., Dawson, G., (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9705—9710

207. Loeb, J. A., Dawson, G., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11982—11987
208. Kwok, B. C. P., Dawson, G., Ritter, M. C., (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 92—98
209. Correra-Freire, M. C., Barenholz, Y., Thompson, T. E., (1982) *Biochemistry* **21**, 1244—1248
210. Brown, R. E., Sugár, J., Thompson, T. E., (1985) *Biochemistry* **24**, 4082—4091
211. Wong, M., Brown, R. E., Barenholz, Y., Thompson, T. E., (1984) *Biochemistry* **23**, 6498—6505
212. Helmkamp, G. M., (1986) *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**, 71—91
213. Abe, A., Yamada, K., Sakagami, T., Sasaki, T., (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **778**, 239—244
214. Sasaki, T., Demel, R. A., (1985) *Biochemistry* **24**, 1079—1083
215. Brown, R. E., Stephenson, F. A., Markello, T., Barenholz, Y., Thompson, T. E., (1985) *Chem. Phys. Lipids* **38**, 79—93
216. Gammon, Ch. M., Vaswani, K. K., Ledeen, R. W., (1987) *Biochemistry* **26**, 6239—6243
217. Metz, R. J., Radin, N. S., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12901—12907
218. Bloj, B., Zilversmit, D. B., (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 5988—5991
219. Yamada, K., Abe, A., Sasaki, T., (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 4615—4621
220. Conzelmann, E., Sandhoff, K., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3979—3983
221. Conzelmann, E., Burg, J., Stephan, G., Sandhoff, K., (1982) *Eur. J. Biochem.* **123**, 455—464
222. Skipski, V. P., Katopodis, N., Prendergast, J. J., Stock, C. C., (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 1122—1127
223. Portoukalian, J., Zwingelstein, G., Abdul-Malak, N., Doré, J. F., (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 916—920
224. Marcus, D. M., (1984) *Molec. Immunol.* **21**, 1083—1091
225. Dyatlovitskaya, E. V., Bergelson, L. D., (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **907**, 125—143
226. Ladish, S., Wu, Z. L., (1985) *Lancet*, i: 136—138
227. Ladish, S., Kitada, S., Hays, E., (1987) *J. Chim. Invest.* **79**, 1879—1882

MAŁGORZATA BALIŃSKA*

Metabolizm ametoptyeryny w komórkach ssaków**

Amethopterin metabolism in the mammalian cells

Spis treści

Wstęp

I. Glutamyłowe pochodne ametoptyeryny

1-1. Synteza poliglutaminianów ametoptyeryny

1-1.1. Regulacja syntezy poliglutaminianów ametoptyeryny

1-1.1.a. Wpływ zredukowanych pochodnych folianowych na proces glutamylacji ametoptyeryny

1-1.1.b. Zmiany podstawników w cząsteczce ametoptyeryny a proces jej glutamylacji

1-1.1.c. Zmniejszenie glutamylacji ametoptyeryny w komórkach opornych na ametoptyerynę lub fluorodezoksyurydynę

1-1.1.d. Wpływ leków cytostatycznych, hormonów i kwasów żółciowych na wydajność glutamylacji ametoptyeryny

1-2. Enzymatyczna hydroliza poliglutaminianów ametoptyeryny

1-3. Glutamylacja ametoptyeryny a jej cytotoksyczne działanie

II. 7-hydroksyametoptyeryna

II-1. Współzawodnictwo 7-hydroksyametoptyeryny z ametoptyeryną w komórce

II-2. Poliglutamylowe pochodne 7-hydroksyametoptyeryny

II-3. Próby klinicznego stosowania 7 hydroksyametoptyeryny

Uwagi końcowe

Contents

Introduction

I. Amethopterin glutamyl derivatives

1-1. Amethopterin polyglutamates synthesis

1-1.1. Regulation of amethopterin polyglutamates synthesis

1-1.1.a. Effects of reduced folates on amethopterin glutamylation

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

** W kwartalniku Postępy Biochemii ukazały się następujące prace na temat metabolizmu ametoptyeryny i molekularnych podstaw jej działania: Grzelakowska A. B. (1963) *Post. Biochem.*, 9, 311—327, Grzelakowska-Sztabert B. (1977) *Post. Biochem.* 23, 559—578, Manteuffel-Cymborowska M. (1978) *Post. Biochem.*, 24, 93—115, Fikus M., Zielińska Z. M. (1979) *Post. Biochem.*, 25, 254—256, Grzelakowska-Sztabert B. (1983) *Post. Biochem.*, 29, 167—190.

I-1.1.b. Effects of modification of amethopterin moiety on amethopterin glutamylation
 I-1.1.c. Reduced amethopterin glutamylation in amethopterin or fluorodeoxyuridine-resistant cells

I-1.1.d. Effects of cytostatics, hormones and bile acids on amethopterin glutamylation

I-2. Amethopterin polyglutamates enzymatic hydrolysis

I-3. Role of amethopterin polyglutamates in cytotoxicity of amethopterin

II.7-hydroxymethopterin

II-1. Cell-interaction between 7-hydroxymethopterin and amethopterin

II-2. 7-hydroxymethopterin polyglutamates

II-3. Clinical trials of 7-hydroxymethopterin

Concluding remarks

Wstęp

Niektóre analogi kwasu foliowego stosowane są jako leki cytostatyczne o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwnowotworowym. Lekami o szerszym zastosowaniu klinicznym okazały się aminoanalogi folianu: aminopteryna, zsyntetyzowana w roku 1943 i ameopteryna zsyntetyzowana w roku 1947 [1]. Powszechniej stosowanym analogiem jest jednak ameopteryna (Methotrexate, kwas 4-amino-N10-metylofoliowy) aktywna w zwalczaniu niektórych chorób nowotworowych, takich jak białaczka limfoblastyczna [2], różnego typu mięsaki [3], kosmówczaki [4]. Lek ten znalazł również zastosowanie w leczeniu choroby reumatycznej [5] i łuszczycy [6], a także w zwalczaniu niektórych pasożytów [7].

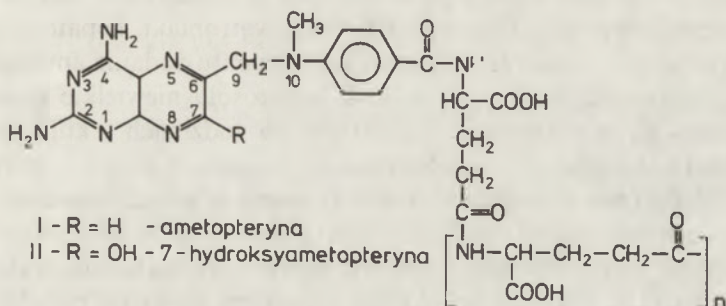
Badania nad mechanizmem działania cytostatycznych leków przeciwnowotworowych mają na celu ustalenie racjonalnych zasad stosowania leków w klinice, to znaczy opartych na znajomości biochemicznych podstaw działania leku. Badania te skupiają się na czterech zagadnieniach takich jak: 1) mechanizm transportu leku do i z komórki; 2) metabolizm samego leku w komórce i efekty działania metabolitów; 3) wpływ leku na metabolizm komórkowy ze szczególnym uwzględnieniem intensywności syntezy niektórych związków wysokocząsteczkowych jak np. kwasy nukleinowe; 4) mechanizmy oporności.

Ameopteryna, została wprowadzona do kliniki 40 lat temu, ale badania nad mechanizmami jej działania trwają do dzisiaj. Stwierdzono, że lek ten jest ciasno wiążącym inhibitorem reduktazy dihydrofolianowej (EC. 1.5.1.3), a metabolicznym skutkiem zahamowania aktywności tego enzymu jest zmniejszenie komórkowej puli zredukowanych folianów, prowadzące do obniżenia wydajności syntezy puryn, tymidylanu i syntezy DNA (patrz artykuły przeglądowe [1, 8, 9]). Wyjaśniono też w ostatnich latach jeden z genetycznych mechanizmów oporności komórek na ameopterynę (amplifikacja genu reduktazy dihydrofolianowej) [10, 11]. Intensywne badania nad mechanizmem aktywnego transportu ameopteryny do komórek wykazały, że prawdopodobnie przebiega on w ten sam sposób, jak transport zredukowanych pochodnych folianowych [12, 13]. Dopiero jednak ostatnie dziesięciolecie przyniosło wzmoczenie badań nad metabolizmem ameopteryny. Niektóre zagadnienia dotyczące metabolizmu aminoanalogów folianu były już przedmiotem artykułu przeglądowego w kwartalniku Postępy Biochemii w roku 1977 [14], jednakże ostatnie lata ukazały

wiele nowych danych zwłaszcza odnośnie γ -glutamylicacji i hydroksylacji ametoptyeryny w komórkach ssaków, co będzie przedmiotem niniejszego artykułu.

I. Glutamyłowe pochodne ametoptyeryny

Poliglutamylowe pochodne ametoptyeryny (wzór I) po raz pierwszy zsyntetyzowano w roku 1973 w pracowni dr B a u g h w Mobile, USA. Opracowano też metodę chromatograficznego rozdzielania poliglutaminianów ametoptyeryny na DEAE-cellulozie [15, 16] (później dopiero wprowadzono jeszcze wysokosprawną chromatografię cieczową — HPLC [17]). Mając do dyspozycji metodę rozdzielania i syntetyczne wzorce poliglutaminianów ametoptyeryny stwierdzono występowanie glutamyłowych pochodnych ametoptyeryny w krwinkach pacjentów leczonych tym cytostatykiem [15]. W następnych latach wykazano, że po podaniu ametoptyeryny poliglutaminiany tego cytostatyku syntetyzowane są w wielu tkankach ssaków (np. nerka, mózg, komórki szpiku, wątroba [1, 8] za wyjątkiem wątroby królika [18]) i hodowanych *in vitro* komórkach prawidłowych i nowotworowych [19—23].



I-1. Synteza poliglutaminianów ametoptyeryny

Powstawanie w hodowanych *in vitro* komórkach ssaków pochodnych γ -poliglutamylowych zarówno folianów jak ich analogów jest katalizowane przez syntazę folilopoliglutaminianową (EC 6.6.3.2.17) [24, 25]. Reakcję katalizowaną przez ten enzym, w przypadku gdy substratem jest ametoptyeryna, można wyrazić następującym równaniem:



gdzie $n \geq 1$.

Jeżeli reakcja glutamylicacji ametoptyeryny katalizowana jest przez wysoko oczyszczone lub częściowo oczyszczone preparaty enzymu tkanek ssaków (głównie wątroby), to powstają poliglutaminiany z 1 lub 2 dodatkowymi resztami γ -glutamyłowymi [25—28]. Natomiast, jeżeli proces glutamylicacji przebiega *in*

vivo, bezpośrednio w nienaruszonej komórce, to nawet 7 reszt glutamyłowych może być dołączonych do cząsteczki ametoptyeryny [19—22]. Przypuszczano, że w stosowanych do badań preparatach syntetazy folilopoliglutaminianowej znajdować się mogą śladowe ilości enzymu, który rozkłada γ -glutaminiany [26] (patrz rozdział I-2). Jeżeli jednak, w tych samych warunkach substratem były zredukowane pochodne kwasu foliowego wówczas powstawały γ -poliglutaminiany tetrahydrofolianowe, nawet z 8 dodatkowymi resztami [29]. Wydaje się więc, że przyczyna niskiej wydajności glutamylacji ametoptyeryny po dodaniu wysoko lub częściowo oczyszczonej syntetazy folilopoliglutaminianowej jest inna. Wiadomo, że w enzymatycznym procesie glutamylacji, tak folianów jak ich analogów, cząsteczki L-glutaminianu dołączane są kolejno [30] do cząsteczki ametoptyeryny. Być może w warunkach reakcji *in vitro* stężenie utworzonego w mieszaninie reakcyjnej trójglutaminianu ametoptyeryny jest zbyt niskie, aby mogły zostać utworzone wyższe poliglutaminiany niż z 3 dodatkowymi resztami glutamyłowymi [27]. W komórce natomiast, występować może znaczne zagęszczenie kolejnych produktów reakcji, na zasadzie np. procesu kanałowania (channeling) [31], co umożliwi powstawanie wyższych poliglutaminianów ametoptyeryny.

Synteza poliglutaminianów ametoptyeryny w komórkach ssaków hodowanych *in vitro* (komórki L1210, rak Ehrlicha, wątrobiaki, hepatocyty itp.) jest bardzo szybka: po 15 zaledwie minutach od momentu dodania ametoptyeryny do pożywki hodowlanej można już wykryć w cytosolu niewielkie ilości poliglutaminianowych pochodnych [17, 32]. Po 1—6 godzinach inkubacji komórek w obecności ametoptyeryny, w zależności od rodzaju komórek i prawdopodobnie, od składu pożywki stężenie zsyntetyzowanych poliglutaminianów ametoptyeryny osiąga maksimum (od 2 do 40 μM) [17, 21, 32]. W początkowym czasie (od 15 do 60 min) inkubacji komórek nowotworowych (np. wątrobiakach, komórkach L1210, raku Ehrlicha) z ametoptyeryną, powstają poliglutaminiany najwyższej z dwiema dodatkowymi resztami [17,21], a następnie nagromadzają się poliglutaminiany ametoptyeryny o 4 do 6 przyłączonych resztach glutamyłowych [17, 33—35]. Natomiast w komórkach prawidłowych (np. szczurzych hepatocytach) hodowanych w podobnych warunkach głównymi metabolitami ametoptyeryny są poliglutaminiany o 1 do 2 dodatkowych resztach γ -glutamyłowych [21, 25]. Z przedstawionych wyników sądzić by można, że w komórkach prawidłowych, w przeciwieństwie do komórek nowotworowych, nie powstają poliglutaminiany ametoptyeryny o wyższej niż 3 liczbie przyłączonych reszt glutamyłowych. Badania te dotyczą, jak dotąd, tylko komórek hodowanych *in vitro* i trudno wysuwać tu uogólniające wnioski. Nieliczne badania przeprowadzone na zwierzętach wykazują, że w wątrobie i nerkach szczura dopiero po tygodniu od momentu wstrzyknięcia ametoptyeryny można zaobserwować poliglutaminiany ametoptyeryny zawierające 4 do 8 reszt glutamyłowych [36]. Być może więc w tkankach prawidłowych zachodzi również synteza poliglutamyłowych pochodnych ametoptyeryny o 4 do 8 resztach glutamyłowych, lecz po dłuższym kontakcie z lekiem [21, 36].

I-1.1. Regulacja syntezy poliglutaminianów ametoptyny

Powstałe w komórce poliglutaminiany ametoptyny nie przechodzą przez błonę komórkową, co prowadzi do ich zagęszczenia w komórce zwiększając efekty cytotoksycznego działania leku (patrz rozdział I-3). Dlatego też niezwykle ważne jest poznanie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych czynników regulujących powstawanie poliglutamylowych pochodnych tego leku i coraz więcej uwagi poświęca się temu zagadnieniu.

I-1.1.a. Wpływ zredukowanych pochodnych folianowych na proces poliglutamylacji ametoptyny

Jedną ze zredukowanych pochodnych folianowych, które od wielu lat podaje się pacjentom wraz z ametoptyną w celu zmniejszenia cytotoxyczności leku, jest 5-formylotetrahydrofolian (inne stosowane nazwy: leukoworyna, kwas folinowy; farmaceutyczne nazwy handlowe: Citrovorium Factor, Neoleukovin) [37]. Ochronne działanie 5-formylotetrahydrofolianu tłumaczono dostarczeniem z zewnątrz zredukowanej pochodnej folianowej, której powstawanie zostało zablokowane przez zahamowanie aktywności reduktazy dihydrofolianowej w wyniku działania ametoptyny. Podobnie wyjaśniano ochronne działanie 5-metylotetrahydrofolianu [37]. Jednakże ostatnio okazało się, że zredukowane pochodne folianowe takie jak 5-formylo- i 5-metylotetrahydrofolian dodane do środowiska hodowlanego lub podane pacjentom wkrótce po ametoptynie [35, 38—39] powodują znaczne obniżenie wydajności poliglutamylacji ametoptyny, co może zmniejszać efekty cytotoksyczne ametoptyny (patrz rozdział I-3). Obniżenie wydajności glutamylacji ametoptyny w obecności zredukowanych pochodnych folianowych spowodowane jest wyższym powinowactwem syntazy folilopoliglutaminianowej do pochodnych folianowych takich jak 5-formylo- i 5-metylotetrahydrofolian niż do ametoptyny (K_m ametoptyny wynosi $70 \mu\text{M}$ a 5-formylotetrahydrofolianu $5,4 \mu\text{M}$ [26, 35, 38]). Podobne obniżenie wydajności glutamylacji ametoptyny obserwuje się wówczas, gdy w komórce następuje „fizjologiczne” zwiększenie ilości folianów [39—41].

I-1.1.b. Zmiany podstawników w cząsteczce ametoptyny a proces jej poliglutamylacji

Żadna spośród zmodyfikowanych w łańcuchu L-glutamylowym (takich jak podstawienie fluorem, grupą metylową, zastąpienie L-glutaminianu D-glutaminianem, L- lub D-asparaginianem, ketoglutaranem itp.) pochodnych ametoptyny (wzór I) nie jest substratem syntetazy folilopoliglutaminianowej [24, 25, 42, 43]. Natomiast zmiany podstawników w pierścieniu pterydynowym ametoptyny, np. brak w porównaniu z ametoptyną w pozycji 10 grupy metylowej (aminopteryna), lub hydroksylacja pozycji 7 (7-hydroksyametoptyryna) powodowały, że związki te okazały się nawet lepszymi niż ametoptyna substratami syntetazy folilopoliglutaminianowej [41]

I-1.1.c. Zmniejszenie wydajności glutamylacji ametoptyeryny w komórkach opornych na ametoptyerynę lub fluorodezoksyurydynę

Jak wynika z nielicznych dotąd badań, w niektórych komórkach po podaniu ametoptyeryny stwierdza się bardzo niskie stężenie poliglutamylowych pochodnych ametoptyeryny. I tak hodowane *in vitro* ludzkie komórki raka piersi, odporne na działanie ametoptyeryny (MTX^RZR-75) charakteryzują się niskim wewnątrzkomórkowym stężeniem poliglutaminianów ametoptyeryny, przy niezmienionym w porównaniu z linią macierzystą (ZR-75) stężeniu poliglutaminianów folianowych [44]. Przyczyn tak niskiego wewnątrzkomórkowego stężenia poliglutamylowych pochodnych ametoptyeryny w komórkach MTX^RZR-75 nie udało się ustalić [44].

W innych badaniach stwierdzono, że zmniejszenie się ilości poliglutaminianów ametoptyeryny w komórkach raka Ehrlicha opornych na fluorodezoksyurydynę było spowodowane wysokim stężeniem poliglutaminianów folianowych [39], a w komórkach wątrobiaka H35 opornych na działanie ametoptyeryny wysoką aktywnością enzymu rozkładającego γ -glutaminiany [45].

I-1.1.d. Wpływ niektórych leków cytostatycznych, hormonów i kwasów żółciowych na wydajność glutamylacji ametoptyeryny

Badano również glutamylację ametoptyeryny w obecności niektórych leków stosowanych w wielolekowej, wraz z ametoptyeryną, chemioterapii nowotworów. I tak, choć wiele leków (np. 5-fluorouracyl [34, 46], 2,4-dwuamino-5-metylo-6-metylochinoxaliny (trimetrexate), 2,4-dwuamino-5-dwuchloro-6-metylopirymidyna (metoprine) [47, 48] zwiększa w sposób synergistyczny cytotoksyczne działanie ametoptyeryny nie mają one jednak większego wpływu na proces glutamylacji tego cytostatyku. Jedynie w mysich komórkach białaczkowych L5178Y preinkubowanych z L-asparaginazą (aminohydrolaza L-asparaginy EC 3.5.1.1.) synteza poliglutaminianów ametoptyeryny była wydatnie (o 90%) obniżona [49, 50]. Wydaje się, że obniżenie wydajności glutamylacji jest wtórnym efektem zahamowania syntezy DNA i białek w wyniku pozbawienia komórki niektórych aminokwasów na skutek działania L-asparaginazy [50].

Zbadano także wpływ kwasów żółciowych na proces glutamylacji ametoptyeryny w hepatocytach. Stwierdzono, że kwasy żółciowe, działając jako polianiony, hamują niewspółzawodniczo syntezę folilopoliglutaminianową [26, 51—53]. Stymulujący wpływ niektórych hormonów (insuliny i deksametazonu) na syntezę poliglutaminianów ametoptyeryny w hepatocytach oraz hodowanych *in vitro* komórkach wątrobiaka szczura [33, 51, 52] jest, jak dotąd, trudny do wyjaśnienia. Nieliczne, jak dotąd badania wykazują, że dodanie insuliny podczas inkubacji hepatocytów szczura z ametoptyeryną powoduje trzykrotnie zwiększenie stężenia poliglutaminianów ametoptyeryny z sześcioma dodatkowymi resztami glutamylowymi [54, 55].

1-2. Enzymatyczna hydroliza poliglutaminianów ametoptyeryny

Z wielu badań wynika, że powstałe w komórce poliglutaminiany ametoptyeryny nie przechodzą przez błonę komórkową [19, 32] i są akumulowane w komórce. Poliglutamylowe pochodne ametoptyeryny mogą opuścić komórkę

w formie monoglutaminianu, po uprzedniej hydrolizie enzymatycznej [19, 32, 56]. Jak dotąd, jednak niewiele badań poświęcono procesowi, katalizowanej przez γ -konjugazę (γ -glutamylowa hydrolaza EC 3.1.22.12), hydrolizy poliglutaminianów ametoptyeryny. Enzym ten jest γ -peptydazą, która w stosunku do poliglutaminianów ametoptyeryny jako substratu może wykazywać własności zarówno endo- jak i egzopeptydazy [57]. Z nielicznych, jak dotąd, badań wynika, że w mysich komórkach nowotworowych aktywność enzymu rozkładającego poliglutaminiany ametoptyeryny może być znacznie niższa, niż w komórkach prawidłowych [58]. Może to w pewnym stopniu wyjaśnić większe stężenie poliglutaminianów ametoptyeryny w komórkach nowotworowych niż prawidłowych (patrz rozdział I.1).

I-3. Proces glutamylacji ametoptyeryny a jej działanie cytotoksyczne

Powstawanie poliglutaminianów ametoptyeryny w komórce okazało się niezwykle ważnym zjawiskiem. Poliglutaminiany ametoptyeryny są gromadzone w komórce, jak wspomniano (rozdział I-2), przedłużając tym samym czas oddziaływania z enzymami folianowymi, takimi jak reduktaza dihydrofolianowa i syntaza tymidylanowa. I tak wykazano, że choć stała inhibicji reduktazy dihydrofolianowej przez ametoptyerynę oraz jej pochodne γ -glutamylowe jest tego samego rzędu i wynosi 10^{-11} — 10^{-9} M (w zależności od źródła enzymu), to wysokie stężenie poliglutaminianów ametoptyeryny w komórce zapobiega dysocjacji kompleksu enzym-substrat. Powoduje to długotrwałe zahamowanie aktywności enzymu [33]. Natomiast syntaza tymidylanowa hamowana jest przez glutamylowe pochodne ametoptyeryny niewspółzawodniczo w stosunku do metylenotetrahydrofolianu [59]. Poliglutaminiany z pięcioma dodatkowymi resztami hamują enzym 300 razy silniej niż z jedną resztą glutamylową. Rezultatem zahamowania aktywności obu tych enzymów w komórce jest obniżenie wydajności syntezy białek, DNA i RNA [9] prowadzące do śmierci szybko dzielących się komórek.

Wiele z przeprowadzonych doświadczeń z użyciem hodowanych *in vitro* komórek ssaków ma na celu wykazanie w stosunku do komórek nowotworowych selektywnego cytotoksycznego działania ametoptyeryny [56]. Badania kliniczne jednakże nie potwierdzają różnic we wrażliwości na ametoptyerynę komórek prawidłowych i nowotworowych [9, 60]. Ostatnio czynione są teoretyczne próby nad syntezą tak zmodyfikowanej cząsteczki ametoptyeryny, która działałaby w zasadzie tylko na komórki nowotworowe [61].

II. 7-hydroksyametoptyeryna

Metabolitem, który może powstawać po podaniu ametoptyeryny, w niektórych tylko tkankach ssaków, jest 7-hydroksyametoptyeryna (wzór II) [62]. Obecność tego metabolitu stwierdzono w tkankach i płynach ustrojowych ludzi i zwierząt leczonych wysoką dawką ametoptyeryny w postaci wlewk dożylnych

[63]. Wykrywana 7-hydroksyametopteryna może stanowić nawet do 6% całości podanej uprzednio ametopteryny [64]. 7-hydroksyametopteryna powstaje w wyniku reakcji hydroksylacji katalizowanej przez oksydazę aldehydową (EC 1.2.2.1). Enzym ten jest niezwykle aktywny w wątrobie królika i 7-hydroksyametopteryna jest głównym metabolitem ametopteryny w tym narządzie [18].

II-1. Współzawodnictwo 7-hydroksyametopteryny i ametopteryny w komórce

Uważano dotąd, że 7-hydroksyametopteryna i ametopteryna mają bardzo podobne właściwości i w podobny sposób oddziałują na komórkę i jej metabolizm [64]. 7-hydroksyametopteryna okazała się jednak związkiem dużo mniej cytotoksycznym niż lek macierzysty. Stała inhibicji reduktazy dihydrofolianowej przez 7-hydroksyametopterynę jest 100-krotnie wyższa ($K_i \approx 10^{-7} \text{M}$) niż stała inhibicji tego enzymu przez ametopterynę [64]. 7-hydroksyametopteryna jest transportowana do komórki przez ten sam system aktywnego transportu co ametopteryna [65]. Podanie więc do środowiska hodowlanego komórek obu tych związków jednocześnie zmniejsza transport ametopteryny do komórki i w konsekwencji jej wewnątrzkomórkowe stężenie, obniżając tym samym stopień zahamowania reduktazy dihydrofolianowej. Ponadto, 7-hydroksyametopteryna, będąc substratem syntetazy folilopoliglutaminianowej i konkurując z ametopteryną w procesie γ -glutamylacji [41, 67], powoduje zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia pochodnych glutamylovych ametopteryny, a w konsekwencji „wyływ” wolnej ametopteryny z komórki. W ten sposób 7-hydroksyametopteryna podana jednocześnie z ametopteryną moduluje cytotoksyczne działanie ametopteryny. Stwierdzono ponadto, że 7-hydroksyametopteryna dodana do środowiska hodowlanego komórek raka Ehrlicha w dość znacznych stężeniach (do $50 \mu\text{M}$) nie obniża w nich syntezy DNA [65], a podana wraz z ametopteryną zmniejsza obniżanie przez nią syntezy DNA nawet do 50% [64]. Częściowe zapobieganie cytotoksycznemu działaniu ametopteryny przez jej metabolit 7-hydroksyametopterynę obserwować można tylko gdy związek ten podaje się do środowiska hodowlanego. W przypadku, gdy 7-hydroksyametopteryna powstaje bezpośrednio w komórce po podaniu ametopteryny efekty te są na ogół niewidoczne, ponieważ wewnątrzkomórkowe stężenie ametopteryny jest wielokrotnie wyższe niż 7-hydroksyametopteryny.

II-2. Poliglutamyłowe pochodne 7-hydroksyametopteryny

Pobrana przez komórkę 7-hydroksyametopteryna, podobnie jak ametopteryna, ulega wewnątrz komórki procesowi glutamylacji, w wyniku którego powstają pochodne z 4 do 7 resztami glutamylovymi [64, 67, 68]. Wydaje się nawet, że 7-hydroksyametopteryna jest lepszym substratem syntetazy folilopoliglutaminianowej niż sama ametopteryna [41]. Gdy jednak komórki (hepatocyty, komórki wątrobiaka H35) inkubowane są w obecności ametopteryny, to

powstające w ciągu 6 godzin kontaktu z 10 μ M ametoptyryną poliglutamylowe pochodne 7-hydroksyametoptyryny zawierają tylko 1 do 2 dodatkowych reszt glutamylowych [68].

II-3. Próby klinicznego stosowania 7-hydroksyametoptyryny

Wydawało się, że 7-hydroksyametoptyryna będzie miała szczególne znaczenie w leczeniu takich chorób jak łuszczyca, czy choroba reumatyczna, nie wymagających tak drastycznego ograniczenia wzrostu komórek jak w chorobie nowotworowej. Jednakże badania wykazywały, że ze względu na niską rozpuszczalność w wodnych roztworach o odczynie obojętnym, metabolit ten daje silne efekty nefrotoksyczne [67], a więc stosowanie w klinice 7-hydroksyametoptyryny staje się wątpliwe, szczególnie w wyższych dawkach.

Uwagi końcowe

Przedstawiony komórkowy metabolizm jednego z bardziej znanych i od wielu lat stosowanego w klinice leku przeciwnowotworowego, pokazuje jak bardzo długotrwałe i żmudne jest poznanie mechanizmu działania leku. Znajomość podstaw biochemicznego działania leku powinna prowadzić do jego racjonalnego stosowania i opracowania odpowiednich reżimów terapeutycznych, szczególnie w chemioterapii wielolekowej i w przypadkach oporności na lek [69]. Ponadto stosowanie leku w innych, nowotworowych przypadkach, powinno być poprzedzone gruntowną analizą farmakologiczną [5].

Opracowanie wykonano w ramach tematu CPBP 04.01

Artykuł otrzymano 10 maja 1988 r.

Zaakceptowano do druku 10 czerwca 1988 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Chabner B.A., Clendeninn N., Curt G.A., Jolivet J., (1986), w *Methotrexate in Cancer Therapy*, red. Kimura K., Wang Y-M., Raven Press, New York, str. 1—38.
2. Djerassi I., (1967), *Cancer Res.* **27**, 2561—2564.
3. Jaffe N., (1974), *Cancer Chemother. Rep.* **58**, 275—280.
4. Hertz R., Lewis J., Lispett M. B., (1961), *Am. J. Obstet. Gynec.* **82**, 631—640.
5. Weinstein G. D., (1971), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **186**, 452—466.
6. Wilke W. S., MacKenzie A. H., (1986) *Drugs* **32**, 103—113.
7. Allegra C.J., Kovac J.A., Drake J.C., Swan J.C., Chabner B.A., Masur H., (1987), *J. Exp. Med.* **165**, 926—931.
8. Jackson R. C., Grindey G. B., (1984), w *Folate Antagonist as Therapeutics Agents t. 1*, red. Sirotak F. M., Burchall J. J., Ensminger W. B., Montgomery J. A., Academic Press, 289—315.
9. Manteuffel-Cymborowska M., (1978) *Post. Biochem.* **24**, 93—115.
10. Schmike R.-T., (1982), *The Harvey Lectures* **76**, 1—25.
11. Grzelakowska-Sztabert B., (1983) *Post. Biochem.*, **29**, 167—190.
12. Henderson G.B., Tsuji J.M., Kumar J.M. Kumar H. P., (1986), *Cancer Res.* **46**, 1633—1638.

13. Sirotnak F. M., (1980), *Pharm. Ther.* **8**, 71—103.
14. Grzelakowska-Sztabert B., (1977) *Post. Biochem.* **23**, 559—578.
15. Nair M. G., Baugh C. M., (1973), *Biochemistry* **12**, 3923—3927.
16. Baugh C. M., Krumdieck C. L., Nair M. G., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 27—25.
17. Fry W., Yalowich J. C., Goldman I. D., (1982), *J. Biol. Chem.* **259**, 1890—1896.
18. Chen M. L., Chiou W. L., (1983), *J. Pharmacokin. Biopharm.* **11**, 499—513.
19. Jolivet J., Schilsky R. L., Bailey B. D., Drake J., Chabner B. A., (1982), *J. Clin. Invest.* **70**, 351—360.
20. Rosenblatt D. S., Whitehead V. M., Dupont M. M., Vuchich M. J., Vera N., (1978), *Mol. Pharm.* **14**, 210—214.
21. Balińska M., Nimec Z., Galivan J., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 466—476.
22. Gewirtz D. A., White J. C., Randolph Y. K., Goldman D. I., (1979), *Cancer Res.* **39**, 2914—2918.
23. Whitehead V. M., (1977), *Cancer Res.* **37**, 408—412.
24. Moran R. G., Colman P. D., Rosowsky A., Forsch R. A., Chan K. K., (1985), *Mol. Pharm.* **27**, 156—166.
25. Cichowicz D. J., Shane B., (1987), *Biochemistry* **26**, 513—521.
26. McGuire J. J., Hsieh P., Coward J. K., Bertino J. R., (1983), w *Folyl and Antifolyl Polyglutamates*, red. Goldman I. D., Chabner B. A., Bertino J. R., Plenum Publ., New York, str. 199—214.
27. Clarke L., Waxman D. J., (1987), *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 585—596.
28. McGuire J. J., Mini E., Hsieh P., Bertino J. R., (1983) w *Development of Target Oriented Anticancer Drugs*, red. Y. C. Cheng, Raven Press, New York, str. 97—106.
29. McGuire J. J., Hsieh P., Coward J. K., Bertino J. R., (1980), *J. Biol. Chem.* **255**, 5776—5788.
30. Moran R. G., Colman P. D., Forsch R. A., Rosowsky A., (1984), *J. Med. Chem.* **27**, 1263—1267.
31. McGuire J. J., Bertino J. R., (1981), *Mol. Cell Biochem.* **39**, 19—48.
32. Balińska M., Galivan J., Coward J. K., (1981), *Cancer Res.* **41**, 2751—2756.
33. Galivan J., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.* **230**, 355—362.
34. McGuire J. J., Mini E., Hsieh P., Bertino J. R., (1985), *Cancer Res.* **45**, 6395—6400.
35. Galivan J., Nimec Z., (1983), *Cancer Res.* **43**, 551—555.
36. Krakower G. R., Kamen B. A., (1983), *J. Pharm. Exp. Therap.* **227**, 633—638.
37. Dudman N. P. B., Slowaczek P., Tattersall M. H. N., (1982) *Cancer Res.* **42**, 502—507.
38. Rosenblatt D. S., Whitehead V. M., Vuchich M. J., Potter A., Vera N., Beaulieu D., (1981) *Mol. Pharm.* **19**, 87—97.
39. Balińska M., (1986), *Acta Biochim. Pol.* **33**, 31—37.
40. Galivan J., Nimec Z., Balińska M., (1983), *Biochem. Pharmacol.* **32**, 3244—3247.
41. Jolivet J., Faucher F., Pinard M-F., (1987), *Biochem. Pharmacol.* **36**, 3310—3312.
42. McGuire J. J., Piper J. R., Coward J. K., Galivan J., (1987) *NCI Monographs* **5**, 139—144.
43. George S., Cichowicz D. J., Shane B., (1987), *Biochemistry* **26**, 522—529.
44. Cowan K. H., Jolivet J. J., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10793—10800.
45. Kruger-McDermott C., Johnson T. B., Rej VanderHoeven R., Nair M. G., Galivan J., (1987) *Int. J. Cancer* **40**, 835—842.
46. Fernandes D. J., Moroson B. A., Bertino J. R., (1981) *Cancer Treat. Rep.* **65**, 29—35.
47. Galivan J., Nimec Z., Rhee M., (1987) *Cancer Res.* **47**, 5256—5260.
48. Rodenhuis S., McGuire J. J., Sawicki W. L., Bertino J. R., (1987), *Leukemia* **1**, 116—120.
49. Jolivet J., Cole D. E., Holcenberg J. S., Poplack D. G., (1985), *Cancer. Res.* **45**, 217—220.

50. Sur P., Fernandes J., Kute T.E., Capizzi R.L., (1987), *Cancer Res.* **47**, 1313—1318.
51. Nimec Z., Galivan J., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.* **226**, 671—680.
52. Galivan J., Balińska M., Nimec Z., Fox M.P., *Adv. Enz. Reg.* **20**, 112—122.
53. Gewirtz D.A., Randolph J.K., Goldman I.D., (1980), *Cancer Res.* **40**, 1852—1857.
54. Albaster O., Vonderhaan B.K., Shafic S.M., (1981), *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **17**, 1223—1231.
55. Schilsky R.T., Ordany F.S., (1985), *Cancer Chemotherap.* **15**, 272—277.
56. Poser R.G., Sirotnak R.M., Chello P.L., (1981), *Cancer Res.* **41**, 4441—4446.
57. McGuire J.J., Coward J.K., (1984), w Folates and Pteridines t. I., red. Blakley R.L., Benkovic S.J., A Wiley-Interscience Pbl. New York, 135—190.
58. Samuels L.L., Goutas L.J., Priest D.G., Piper J.R., Sirotnak F.M., (1986) *Cancer Res.* **46**, 2230—2235.
59. Allegra C.J., Chabner B.A., Drake J.C., Lutz R., Rodbard D., Jolivet J., (1985), *J. Biol. Chem.* **260**, 9720—9726.
60. Jolivet J., Cowan K.H., Curt G.A., Clendeninn N.J., Chabner B.A., (1983), *New Engl. J. Med.* **309**, 1094—1104.
61. Schmid F.A., Sirotnak F.M., Otter G.M., DeGraw J.I., (1987), *Cancer Treat. Rep.* **71**, 727—732.
62. Jacobs S.A., Stollar R.G., Chabner B.A., Johns D.G., (1976), *J. Clin. Invest.* **57**, 534—538.
63. Breithaupt H., Kuenzien E., (1982), *Cancer Treat. Rep.* **66**, 1733—1741.
64. Johns D.G., Iannotti A.J., Sartorelli A.A., Both B.A., Bertino J.R., (1974), *Life Sci*, **3**, 1983.
65. Fabre G., Matherly L.H., Fabre I., Cano J-P., Goldman I.D., (1984), *Cancer Res.* **44**, 970—975.
66. Gaukroger J.M., Wilson L., (1984), *Brit. J. Cancer* **50**, 327—333.
67. McGuire J.J., Hsieh P., Bertino J.R., (1984), *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1355—1361.
68. Rhee M.S., Galivan J., (1986), *Cancer Res.* **46**, 3793—3797.
69. Bertino J.R., (1982), *Med. Pediat. Oncol.* **10**, 401—411.

- 30. ...
- 31. ...
- 32. ...
- 33. ...
- 34. ...
- 35. ...
- 36. ...
- 37. ...
- 38. ...
- 39. ...
- 40. ...
- 41. ...
- 42. ...
- 43. ...
- 44. ...
- 45. ...
- 46. ...
- 47. ...
- 48. ...
- 49. ...
- 50. ...

JERZY DZIUBA*, ALICJA ŻBIKOWSKA**

Enzymatyczna koagulacja miceli kazeiny

Enzymic coagulation of casein micelles

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Proteoliza kazeiny α
- III. Zakres proteolizy kazeiny α warunkujący agregację miceli
- IV. Czas koagulacji
- V. Mechanizm agregacji
- VI. Równania opisujące koagulację mleka
- VII. Zmiany w układzie micelarnym podczas powstawania żelu
- VIII. Czynniki wpływające na czas koagulacji i zwięzłość skrzepu
 - VIII-1 Wpływ pH
 - VIII-2 Wpływ jonów wapnia
 - VIII-3 Wpływ temperatury
 - VIII-4 Wpływ stężenia substratu
 - VIII-5 Wpływ aktywności proteolitycznej enzymu
- IX. Znaczenie niektórych reszt aminokwasowych oraz reszt fosforanowych kazeiny w procesie koagulacji
- X. Wpływ interakcji jonowych na koagulację mleka
- XI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Proteolysis of α -casein
- III. Extent of proteolysis at which the aggregation of the micelles starts
- IV. Coagulation time
- V. Mechanism of aggregation
- VI. Equation describing of milk coagulation
- VII. Changes in micellar system during gelation
- VIII. Factors affecting coagulation time and curd firmness
 - VIII-1 Effect of pH
 - VIII-2 Effect of calcium ions
 - VIII-3 Effect of temperature
 - VIII-4 Effect of substrate concentration
 - VIII-5 Effect of proteolytic activity of enzyme
- IX. Role of amino acid and phosphate residues of casein in coagulation
- X. Role of ionic interaction in milk coagulation
- XI. Concluding remarks

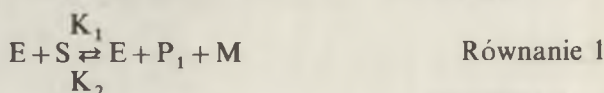
* Prof. dr hab., ** Dr inż., Zakład Biochemii Żywności, Instytut Fizyki i Chemii Żywności ART Olsztyn-Kortowo

Wykaz stosowanych skrótów: K_m — stała Michaelisa-Menten, K_{cat} — stała szybkości reakcji enzymatycznej, CT — czas koagulacji, M_w — średnia masa cząsteczkowa, P_i — agregaty micel, K_i — stała szybkości agregacji, W — współczynnik stabilności micel

I. Wstęp

Koagulacja jest jedną z najważniejszych właściwości mleka, zarówno z punktu widzenia jego funkcji biologicznych, jak i zastosowania w przemyśle spożywczym. Koagulacja mleka jest konsekwencją destabilizacji koloidalnego układu białek mleka. Może ją powodować szereg różnych czynników fizykochemicznych takich jak np. temperatura, pH, siła jonowa [1, 2, 3, 4]. Powodują ją także enzymy [5]. Już w roku 1953 Ala i s, stwierdził, że koagulacja mleka może być inicjowana przez ograniczoną proteolizę kazeiny κ . Wiązanie peptydowe wrażliwe na działanie podpuszczki znajduje się pomiędzy Phe₁₀₅ i Met₁₀₆ w kazeinie κ . Jest to wiązanie łączące różniące się zdecydowanie części łańcucha tej formy kazeiny, C-końcową o właściwościach hydrofilowych i N-końcową o wysoce hydrofobowym charakterze. W wyniku działania podpuszczki następuje odszczepienie części C-końcowej, czyli rozpuszczalnego makropeptydu (w przypadku, gdy ta część kazeiny κ zawiera cukry nazywana jest glikomakropeptydem) od pozostałej części kazeiny κ . Prowadzi to do destabilizacji układu koloidalnego kazeiny i pozostała jej część, zwana parakazeiną, ulega precypitacji w obecności wapnia.

Pa y e n s [6] wyróżnia trzy, ściśle powiązane ze sobą, etapy enzymatycznej koagulacji mleka. Są to: proteoliza, agregacja, żelifikacja. Pierwsze dwa etapy autor ten przedstawił za pomocą następujących równań:



gdzie: P_1 oznacza niezagregowane micelle parakazeiny
 M — makropeptyd odszczepiony na skutek działania enzymu,
 K_i — stała szybkości reakcji agregacji, P_i — agregaty miceli.

Równanie 1 dotyczy reakcji enzymatycznej, natomiast równanie 2 bimolekularnej reakcji agregacji, w wyniku której niezagregowane micelle parakazeiny przekształcane są w agregaty. Następstwem agregacji micel jest koagulacja (parakazeiny) i utworzenie struktury żelu, podlegającej dalszym zmianom podczas formowania skrzepu i synerezy [7, 8].

II. Proteoliza kazeiny κ

W mleku kazeina i występuje w micelach, w formie zagregowanej z pozostałymi cząsteczkami kazeiny α i β oraz koloidalnym fosforanem wapnia

(kompleks apatytowo związanego trzeciorzędowego fosforanu wapniowego i cytrynianu wapniowego) [9]. Każda micela zawiera w przybliżeniu 1000 cząsteczek kazeiny κ [7]. Uważa się, że kazeina κ rozmieszczona jest w całej miceli kazeinowej, a przeważająca jej część znajduje się na powierzchni [9, 10]. Dostępność specyficznie hydrolizowanego przez podpuszczkę wiązania w kazeinie κ może być różna, w zależności od wielkości i składu miceli [11, 12]. Ponadto kazeina κ jest białkiem wykazującym duży polimorfizm molekularny. Zidentyfikowano dziesięć frakcji kazeiny κ różniących się zawartością kwasu N-acetylneuraminowego i fosforanu oraz stwierdzono różnice w składzie aminokwasowym dwóch wariantów genetycznych [13]. Substytucja reszt aminokwasowych występuje wyłącznie w glikomakropeptydowej części cząsteczki, a reszty, których dotyczy substytucja mogą wpływać na szybkość reakcji enzymatycznej [13—15], chociaż wyniki badań innych autorów nie są w tym punkcie zgodne [16, 17]. Steryczne lub elektrostatyczne odpychanie węglowodanowej części łańcucha i grup fosforanowych mogą również modyfikować podatność kazeiny κ na działanie enzymu [18]. Stwierdzono, że podpuszczka wykazuje wyższe powinowactwo do kazeiny κ pozbawionej cukrów niż wobec glikokazeiny κ [10, 19], która znajduje się w zewnętrznej warstwie dużych miceli, podczas gdy w małych micelach rozmieszczona jest równomiernie [9, 20]. Różnice we właściwościach substratu, jaki stanowi kazeina κ znajdująca się w układzie micelarnym mleka, powodują trudności w opisanu reakcji enzymatycznej za pomocą równania matematycznego. Podczas badań kinetycznych enzymatycznej fazy koagulacji mleka stosuje się scałkowaną postać równania Michaelisa - Menten (Równanie 3 i 4), ponieważ rozcieńczenie mleka może oddziaływać na stabilność micel kazeinowych i zmieniać stężenie innych składników mleka [19].

$$\frac{dS}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Równanie 3}$$

$$V_{\max} = K_{\text{cat}} \cdot e \quad \text{Równanie 4}$$

gdzie: V_{\max} oznacza szybkość maksymalną reakcji, K_m — stałą Michaelisa, K_{cat} — stałą szybkości reakcji enzymatycznej, S — stężenie substratu, e — stężenie enzymu, t — czas reakcji.

Stała Michaelisa w przypadku indywidualnych prób mleka przybiera wartości w zakresie $0,67 - 5,4 \cdot 10^{-5}$ M kazeiny κ , natomiast K_{cat} od $2 - 13 \text{ S}^{-1}$ [19]. Takie różnice w wartościach K_m i K_{cat} mogą być spowodowane różnym środowiskiem jonowym, a także różnicami w strukturze i składzie micel kazeiny oraz kazeiny κ [5]. Ponieważ w mleku kazeina κ unieruchomiona jest na powierzchni micel, kinetyka reakcji enzymatycznej nie może być badana za pomocą klasycznej teorii Michaelisa - Menten [21]. Verger i w s p. [21] zakładają, że enzym jest odwracalnie adsorbowany na powierzchni substratu, gdzie tworzy się kompleks powierzchniowy enzym-substrat. Do badań kinetycznych proponują następujące równanie:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot S}{\frac{K_d}{K_p} \cdot K_M^x} \quad \text{Równanie 5}$$

gdzie: K_d oznacza stałą szybkości desorpcji, K_p — stałą szybkości adsorpcji, K_M^x — powierzchniową stałą MM.

Hooydonk i wsp. [18], którzy uważają, że szybkość reakcji enzymatycznej jest regulowana przez szybkość dyfuzji i zależy od liczby efektywnych zderzeń między enzymem a nie przereagowanym substratem, zależność tę opisują równaniem:

$$-\frac{dS}{dt} = K \cdot e \cdot c_m = p \cdot A \cdot \exp \frac{-\Delta e}{RT} \cdot \text{const} \quad \text{Równanie 6}$$

gdzie: e — oznacza stężenie enzymu, c_m — stężenie miceli, A — współczynnik częstotliwości zderzeń, p — współczynnik steryczny, który charakteryzuje zderzenia, nie prowadzące do reakcji z powodu braku kontaktu pomiędzy centrami aktywnymi cząsteczki enzymu a substratem.

Jeżeli podczas reakcji nie zachodzi agregacja, to można przyjąć, że stężenie miceli (c_m) pozostaje stałe. Z takiego założenia wynika, że szybkość dyfuzji miceli jest nieistotna w porównaniu z szybkością dyfuzji enzymu.

Wyniki dotychczasowych badań i rozważania teoretyczne wykazują niedoskonałość tych równań [23]. Równanie Michaelisa - Menten może być stosowane w badaniu kinetyki wówczas, gdy substrat i enzym występują w formie rozpuszczalnej. Równanie to może także być stosowane w układach nie homogennych, ale nie można go interpretować w pojęciach mechanizmów molekularnych. Równanie 5, pomimo przedstawienia go w bardziej rozbudowanej postaci [21], nie charakteryzuje reakcji w sposób jednoznaczny. Założenia, z których wynika to równanie pozwalają wytłumaczyć obniżenie szybkości reakcji wraz ze wzrostem stężenia miceli. Natomiast zastrzeżenie budzi brak adsorpcji enzymu w micelach kazeiny lub parakazeiny w fizjologicznym pH [23]. Równanie 6 oparte na założeniu, że reakcja enzymatyczna regulowana jest przez szybkość dyfuzji, nie uwzględnia wpływu siły jonowej, a szczególnie pH, na kinetykę reakcji [23].

III. Zakres proteolizy kazeiny α warunkujący agregację miceli

Lepkość mleka obniża się po dodaniu enzymu w efekcie uwalniania hydrofilowej, C-końcowej części kazeiny α , zwanej makropeptydem lub gliko-makropeptydem (w zależności od tego czy zawiera reszty węglowodanowe), z cząsteczek kazeiny α [23]. Obniżenia lepkości nie można tłumaczyć jedynie zmniejszeniem względnej masy cząsteczkowej micel. Przyczyna tego zjawiska tkwi również w zmniejszeniu objętości i zmianie kształtu miceli kazeinowych [24]. W miejscach proteolizy kazeiny α zmienia się ładunek powierzchni miceli z

wyrażnie ujemnego na dodatni, co może także wpływać na lepkość [25]. Glikomakropeptydowa część kazeiny znajdującej się na powierzchni miceli, wystaje na zewnątrz w postaci silnie uwodnionego łańcucha [24]. Usunięcie tego łańcucha podczas działania podpuszczki, powoduje zmniejszenie hydrodynamicznego promienia miceli, obniżenie lepkości roztworu oraz zmniejszenie wzajemnego odpychania się poszczególnych miceli. Po odszczepieniu hydrofilowej części kazeiny κ zmniejsza się stopień uwodnienia miceli i wzrasta jej hydrofobowość. Potencjał elektrokinetyczny ζ obniża się do połowy. Powoduje to zmiany w strukturze wtórnej całej miceli. Zostają odsłonięte nowe grupy funkcyjne łańcuchów polipeptydowych, co umożliwia tworzenie się wiązań hydrofobowych i jonowych oraz interakcje prowadzące do powstania agregatów [7]. Powoduje to z kolei stopniowy wzrost lepkości mleka [23]. Proteoliza jednej cząsteczki kazeiny κ w miceli nie powoduje agregacji [26]. Zaobserwowano, że w momencie koagulacji, co najmniej 90% kazeiny κ znajdującej się w mleku uległo proteolizie. Podczas działania podpuszczki następuje całkowita hydroliza wiązania Phe-Met w kazeinie κ . Wśród badaczy występują różne poglądy na zakres proteolizy kazeiny κ , jaki jest niezbędny do wystąpienia koagulacji. Niektórzy z nich uważają, że koagulacja zaczyna się wówczas, gdy makropeptyd zostanie odszczepiony jedynie z części kazeiny κ (około 50%) wystarczającej do zainicjowania agregacji miceli [27—29]. Inni twierdzą, że micelle pozostają w stanie nie skoagulowanym, dopóki nie wystąpią rozległe zmiany w powierzchniowej kazeinie, a szybkość agregacji micel kazeinowych w mleku nie jest istotna, aż do momentu gdy 88% dostępnej kazeiny κ ulegnie proteolizie [25, 26, 30].

Reakcję koagulacji w uproszczeniu można rozpatrywać biomolekularnie, a agregację mierzyć stopniem dyfuzji. Różnica w czasie, pomiędzy dodatkiem enzymu a wystąpieniem koagulacji, wynika z charakteru reakcji agregacji, która jest reakcją II-rzędu [31]. Rozpoczyna się ona wtedy, gdy stężenie agregujących specyficznie micel parakazeiny jest odpowiednio wysokie [32]. Jeżeli micelle nie mogą ulegać agregacji zanim nie ulegnie proteolizie pewna część kazeiny κ , to czas koagulacji (CT) jest sumą czasu niezbędnego do zajścia tej proteolizy i czasu potrzebnego do agregacji zmienionych miceli [5].

IV. Czas koagulacji (CT)

Opierając się na równaniu uwzględniającym zmiany rozmiaru cząstek w czasie reakcji [33, 34] Payens przedstawił następujące równanie na czas koagulacji:

$$\tau = \left[K_s \cdot \frac{V}{2} \right]^{-0.5} \quad \text{Równanie 7}$$

gdzie τ jest to czas enzymatycznej koagulacji uważany za czas potrzebny do powstania określonej liczby cząstek przy braku flokulacji, K_s — stała szybkości agregacji, V — szybkość maksymalna reakcji enzymatycznej.

K_3 jest miarą odpychania pomiędzy agregującymi cząstkami, a w konsekwencji miarą stopnia proteolizy kazeiny κ . Jeżeli oddziaływania (zderzenia) pomiędzy dwiema micelami, w których znajdująca się na powierzchni kazeina κ została enzymatycznie zmodyfikowana, prowadzą do trwałego kontaktu, to liczba miejsc umożliwiających trwałe połączenia wzrasta z aktywnością enzymu [31]. Stopień agregacji wzrasta ze wzrostem stężenia enzymu i czas koagulacji jest odwrotnie proporcjonalny do aktywności enzymatycznej [35].

Wprowadzono wiele metod pomiaru czasu koagulacji mleka [5]. Większość z nich opiera się na obserwacji momentu pojawienia się ziarnistości lub kłaczków w zawiesinie mleka [36]. Miarą czasu koagulacji może być również zmniejszenie szybkości przepływu mleka przez rurkę kapilarną [23]. Inne metody opierają się na pomiarach lepkości bądź zmętnienia substratu lub na badaniu związłości skrzepu [37—41].

V. Mechanizm agregacji

Agregację koloidalnych zawiesin, takich jak mleko, można rozpatrywać według mechanizmu opisanego przez Smoluchowskiego [42]. Szybkość zanikania cząstek P_1 (wzór 2) jest określona przez szybkość dyfuzji, która wynika z ruchów Browna, interakcji pomiędzy cząstkami, gdy przylegają one ściśle do siebie, oraz liczby skutecznych zderzeń. Najprostszy przypadek ma miejsce wtedy, gdy cząstki zawiesin nie odpychają się. Podczas zbliżenia następuje wówczas nieodwracalna koalescencja. W tym modelu koagulacji każde zderzenie pomiędzy dwiema cząstkami prowadzi do trwałego kontaktu. Szybkość koagulacji w tym przypadku zależy od ruchów Browna, a za całość zjawiska odpowiedzialna jest jedynie ilość zderzeń cząstek [42]. Należy jednak wziąć pod uwagę heterogeniczny chemicznie charakter powierzchni micel parakazeiny co powoduje, że ich skuteczne zetknięcie się wymaga nie tylko dostatecznego wzajemnego zbliżenia, ale także odpowiedniego zorientowania w przestrzeni [43]. Jeżeli w miejscu bezpośredniego kontaktu przynajmniej jedna cząstka jest całkowicie niereaktywna, to nie zajdzie pożądana reakcja i możliwe jest oddalenie się od siebie takich cząstek. Zderzenia są skuteczne tylko wtedy, gdy ma miejsce kontakt pomiędzy silnie reaktywnymi miejscami poszczególnych miceli parakazeiny. Przy energii odpychania różnej od 0, tylko część wszystkich zderzeń prowadzi do agregacji. W mleku zaledwie 10^{-6} zderzeń cząstek prowadzi do trwałego kontaktu, a ograniczona liczba miejsc agregacji wpływa na tworzenie się struktury przypominającej bardziej żel niż osad [32, 34].

Różne są poglądy badaczy na temat mechanizmu agregacji. Jedni uważają, że w systemach flokulacyjnych zawierających cząstki o różnych wielkościach, małe cząstki zanikają szybciej, co świadczy o tym, że są one wychwytywane przez cząstki duże [42], inni natomiast twierdzą, że zderzenia cząstek są przypadkowe, a ich rozmiary nie wpływają na tworzenie się agregatów [44].

Do wyjaśnienia zjawiska koagulacji mleka, wykorzystano wyniki uzyskiwane

podczas badania mechanizmu tworzenia się agregatów [45—48]. Zakłada się, że powstające podczas koagulacji „kłaczk” tworzą się w wyniku zderzeń skupisk, a nie pojedynczych cząstek, dając tym samym porowatą strukturę. Reakcję pomiędzy skupiskami o różnej liczbie cząstek można wyjaśnić za pomocą teorii koagulacji według Smoluchowskiego [49, 50]. Zderzenia pomiędzy i-krotnym skupiskiem a j-krotnym skupiskiem daje (i+j) krotne skupisko. Podczas flokulacji wielkość i kształt agregatów są bardziej istotne niż wielkość i kształt pojedynczych cząstek. W układzie rzeczywistym, gdzie wszystkie cząstki ulegają przypadkowym ruchom Browna, skupiska wielu różnej wielkości cząstek mogą brać udział w procesie agregacji. Możliwość tworzenia się dużych „kłaczków” wyłącznie poprzez przyłączanie się pojedynczych cząstek jest mało prawdopodobna. Wzrost wielkości agregatów jest prawie całkowicie wynikiem wzajemnego łączenia się skupisk cząstek. Teoretycznie, proces zachodzi aż do momentu, gdy tworzy się jeden „kłaczek” [5]. Wzrost wielkości „kłaczka”, poprzez przyłączanie mniejszych, prowadzi do tworzenia się otwartej siatki skrzepu. Stwierdzono, że jeżeli wielkość „kłaczka” i liczba tworzących go cząstek osiągną odpowiednią wartość, to przyłączenie się kolejnego skupiska cząstek, spowoduje taki wzrost ogólnej powierzchni zawiesiny, który prowadzi do powstania żelu. Faza dyspersyjna nie bierze w tym udziału, natomiast faza utworzona ze zdyspergowanych cząstek staje się coraz bardziej lepka i zestala się tworząc spoisty system. W końcowym skrzepie duża liczba cząstek początkowych zanika z powodu strukturalnych przeobrażeń i międzycząsteczkowych połączeń [50]. Punktem krytycznym w chemii polimerów i koagulacji mleka jest moment gdy wartość średniej masy cząsteczkowej agregatów molekularnych \bar{M}_w jest odpowiednio duża aby nastąpiło rozdzielenie całego układu na frakcję rozpuszczalną i nierozpuszczalną [51]. W tym przypadku sposób rozdzielenia dwóch frakcji, tzn. wytrącenie lub żelowanie, zależy wyłącznie od rozcieńczenia. Tworzenie się żelu występuje w punkcie krytycznym w roztworach stężonych, a osadu w roztworach rozcieńczonych [52].

VI. Równania opisujące koagulację mleka

Wykorzystując wyniki badań dotyczących początkowych etapów koagulacji mleka, opracowano szereg równań opisujących to zjawisko.

Wzrost średniej masy cząsteczkowej \bar{M}_w podczas agregacji określa równanie 8 [25, 26, 49, 53].

$$\bar{M}_w(t) = \bar{M}_w(0) \left\{ 1 + \left[\frac{2K_s}{\int \frac{dW}{dt} dt} \int \left(\int \frac{dW}{dt} dt \right)^2 dt \right] \right\} \quad \text{Równanie 8}$$

gdzie $\frac{dW}{dt}$ jest szybkością powstawania materiału ulegającego agregacji, opisaną równaniem Michaelisa-Menten w postaci całki, K_s — stałą szybkości agregacji. Równanie to opiera się na założeniu, że micelle o odpowiedniej proporcji

(88%) zhydrolizowanej kazeiny κ ulegają agregacji według modelu Smoluchowskiego [42].

Zależność czasu koagulacji od średniej masy cząsteczkowej agregatów micel kazeinowych w mleku przedstawia równanie 9 [54, 55].

$$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_0} = 1 - \bar{M}_0 (1-f) \left(\frac{8V}{K_s}\right)^{1/2} \cdot \frac{f \cdot \frac{t}{\tau} - \frac{(1-f) \left(\frac{t}{\tau}\right)^3}{3}}{C_0} \quad \text{Równanie 9}$$

\bar{M}_w — średnia masa cząsteczkowa agregatów, \bar{M}_0 — średnia masa cząsteczkowa micel kazeinowych w mleku, f — stosunek masy cząsteczkowej uwolnionego peptydu do \bar{M}_0 , C_0 — stężenie miceli kazeinowych, τ — czas koagulacji.

Równanie opiera się na założeniu, że w początkowych stadiach koagulacji oraz w przypadku, gdy stężenie substratu jest większe od K_m , reakcja agregacji ma charakter bimolekularny, a stała K_s określa dyfuzję swobodną, niezależną od rozmiaru cząstek. W równaniu tym, w odróżnieniu od równania 8, stała szybkości agregacji (K_s) zależy od proteolizy.

Przy opracowaniu kolejnego równania przyjęto, że współczynnik stabilności „W” z teorii Smoluchowskiego [22, 42], jest zmienny i określany przez stężenie nie zhydrolizowanej kazeiny κ . Podczas reakcji enzymatycznej, cząsteczki kazeiny κ w micelach są stopniowo hydrolizowane, co prowadzi do zmniejszenia stabilności samej miceli, a w konsekwencji do wzrostu stałej szybkości agregacji. Ponieważ współczynnik stabilności „W” jest wykładniczo zależny od stężenia substratu i osiąga wielkość stałą przed zakończeniem reakcji enzymatycznej, czas koagulacji może być wyrażony następującym równaniem:

$$t = \frac{1}{V} \left[S_0 + \frac{1}{c_m} (\exp(-c_m \cdot S_0) - 1) \right] + \frac{W_0 \exp(-c_m \cdot S_0)}{K_s} \left[\frac{1}{n_c} - \frac{1}{n_0} \right] \quad \text{Równanie 10}$$

gdzie S_0 oznacza początkowe stężenie kazeiny, W_0 — wyjściowy współczynnik stabilności miceli, C_m — stałą proporcjonalną do stopnia konwersji kazeiny κ , V — szybkość reakcji enzymatycznej, n_0 — liczbę miceli w czasie $t = 0$, n_c — liczbę miceli w czasie $t = t$, t — czas koagulacji.

W równaniu tym czas koagulacji może być rozważany jako czas niezbędny do zmniejszania liczby miceli z n_0 do n_c . Możliwe jest uzyskanie współzależności pomiędzy stężeniem cząstek a czasem koagulacji przez odpowiednie przekształcenie powyższego równania i wyliczenie wielkości cząstek z ich stężenia.

VII. Zmiany w układzie micelnym podczas powstawania żelu

Do obserwowania zmian zachodzących w mleku podczas procesu tworzenia żelu stosowano transmisyjną mikroskopię elektronową [40, 57—59]. Początkowe rozmieszczenie miceli w fazie dyspersyjnej mleka sugeruje odpychanie się ich

między sobą. Podczas koagulacji micelle stopniowo skupiają się. Micelle łączą się bezpośrednio lub poprzez rozległe mostki, składające się z kilku pasemek. Podczas skupiania się miceli budowana jest siatka żelu, w której stykające się micelle ulegają częściowej fuzji. W tym czasie tworzą się również wiązania i powstaje rozbudowana, nieregularna sieć. Po utworzeniu wiązań, zwoje zmienionych miceli skupiają się, tworząc luźne włókienka, grubości około pięciu miceli, rozdzielone rozległymi przestrzeniami. Żel uzyskany w czasie trzykrotnie dłuższym od czasu koagulacji stanowi luźno upakowaną sieć zamykającą wewnątrz dużą ilość serwatki. Kurczenie się trójwymiarowej siatki żelu przejawia się w zjawisku zwanym synerezą [7].

VIII. Czynniki wpływające na koagulację

VIII-1. Wpływ pH

Czas enzymatycznej koagulacji mleka wydłuża się wraz ze wzrostem wartości jego pH [60]. Powyżej pH 7,0 micelle są znacznie bardziej stabilne i agregacja nie występuje. Przy pH 5,2 badanie proteolizy mleka jest utrudnione w związku z izoelektryczną agregacją miceli. Większość autorów uważa, że wpływ pH na enzymatyczną fazę koagulacji jest drugorzędny w porównaniu z oddziaływaniem na fazę agregacji [27, 61]. Van Hooydonk i wsp. [60] stwierdzili jednak, że obniżenie pH mleka powoduje gwałtowny wzrost szybkości reakcji enzymatycznej podczas działania podpuszczki. Maksimum szybkości stwierdzono przy pH 6,0, a różnice w zakresie pH 5,6—6,4 były niewielkie. Sugeruje to, że podatność wiązania Phe-Met w kazeinie α wzrasta z powodu zmniejszenia sterycznych oddziaływań glikomakropeptydowej części cząsteczki. Jednocześnie, szczególnie w granicach pH 5,6 obserwuje się interakcję pomiędzy podpuszczką a micelami parakazeiny, co wpływa na obniżenie stężenia efektywnie działającego, wolnego enzymu i powoduje zmianę pozornej rzędowości reakcji [22]. Wraz z obniżeniem pH rośnie szybkość agregacji i tworzenia żelu, co spowodowane jest w dużym stopniu zmniejszeniem udziału wapnia w micelach kazeiny, na skutek zakwaszenia mleka [60]. Przy obniżeniu pH część jonów wapniowych, wchodząca w skład koloidalnego fosforanu wapnia, oddysocjowuje z miceli kazeinowych i przechodzi wraz z częścią jonów fosforanowych i cytrynianowych do fazy dyspersyjnej mleka. Wzrost zawartości jonów Ca^{2+} w mleku przyspiesza koagulację miceli kazeinowych [62, 63]. Jednocześnie, obniżenie pH zmniejsza potencjał elektrokinetyczny ζ miceli i stopień jej uwodnienia, co ułatwia kontakt pomiędzy micelami, przyczyniając się do skrócenia czasu koagulacji.

VIII-2. Wpływ temperatury

Obniżenie temperatury o 10°C wydłuża fazę enzymatyczną 2-krotnie, a fazę agregacji 11—12-krotnie [64]. W temperaturach poniżej 8°C przebiega jedynie faza enzymatyczna, bez wystąpienia zjawiska koagulacji, która pojawia się w

następstwie ogrzewania. Wpływ temperatury na agregację sugeruje, że główną rolę w agregacji miceli i formowaniu siatki żelu odgrywiają interakcje hydrofobowe.

VIII-3. Wpływ jonów wapnia

Wapń występuje w mleku w postaci koloidalnego fosforanu wapnia, wchodzącego w skład miceli kazeinowych, oraz w postaci jonów Ca^{2+} znajdujących się w fazie dyspersyjnej mleka. Obydwie te formy występują w stanie równowagi dynamicznej, a ich udział w ogólnej zawartości wapnia w mleku uzależniony jest od pH mleka. (Duży udział jonów Ca^{2+} , przy niskim pH, może przyczynić się do destabilizacji układu koloidalnego mleka [62, 63]). Stwierdzono, że niewielki dodatek do mleka jonów Ca^{2+} przyspiesza koagulację miceli kazeinowych. Część dodanych jonów Ca^{2+} , w wyniku dążenia układu do zachowania stanu równowagi, wiąże się z micelami w miejscach zawierających ładunek ujemny. Zwiększa się wówczas hydrofobowość miceli i zmniejsza jej potencjał elektrokinetyczny, co powoduje przyspieszenie procesu koagulacji [60].

Wpływ jonów wapniowych na czas koagulacji wykorzystano w praktyce przy produkcji sera, w której stosuje się stały dodatek 0,02% bezwodnego CaCl_2 do mleka. Pozwala to zmniejszyć ilość podpuszczki potrzebnej do wytworzenia prawidłowego skrzepu. Dodatek CaCl_2 do poziomu 0,05M może skrócić czas koagulacji do minimum. Przy wyższym dodatku CaCl_2 (do 0,4M) czas koagulacji ulega wydłużeniu, a skrzep jest słaby [5].

VIII-4. Wpływ stężenia substratu

Istotnym czynnikiem wpływającym na proces koagulacji jest stężenie substratu, to jest miceli kazeinowych w mleku. Zagęszczanie mleka na drodze ultrafiltracji nie wpływa znacząco na czas koagulacji miceli kazeinowych, natomiast zwiększa ilość kazeiny nie przechodzącej do skrzepu [49]. Udział kazeiny tworzącej początkowy skrzep maleje ze wzrostem czasu koagulacji. Stężenie enzymu niezbędnego do przekształcenia takiej samej ilości kazeiny w formę skrzepu rośnie proporcjonalnie do stopnia zagęszczania mleka. W tym przypadku czas koagulacji ulega skróceniu [49]. W wyniku rozcieńczania mleka czas koagulacji wydłuża się zależnie od stopnia rozcieńczenia [65]. Ze wzrostem stężenia miceli kazeinowych zakres proteolizy kazeiny α podczas koagulacji maleje [66]. Zmniejszenie objętości fazy wodnej, zmniejsza odległość pomiędzy micelami [9]. Prowadzi to do większej liczby skutecznych zderzeń micel parakazeiny i zwiększa szybkość agregacji. Przy niskim stężeniu miceli kazeinowych szybkość agregacji jest mała w porównaniu do szybkości proteolizy. Natomiast przy wysokim stężeniu miceli kazeinowych odwrotnie, szybkość działania enzymu jest znikoma w porównaniu z ogólną szybkością reakcji [67].

VIII-5. Wpływ aktywności proteolitycznej enzymów

Enzymy stosowane do koagulacji miceli kazeinowych powinny wykazywać ograniczoną aktywność proteolityczną, polegającą na hydrolizowaniu, w czasie procesu koagulacji, głównie specyficznego wiązania Phe-Met w kazeinie κ . Taką ograniczoną aktywność proteolityczną wobec miceli kazeinowych wykazuje podpuszczka (EC 3.4.23.4). Niedostatek tego enzymu, wynikający ze zmniejszania się uboju młodych cieląt, przy jednoczesnym wzroście produkcji sera, spowodował konieczność stosowania innych enzymów o zbliżonej do podpuszczki aktywności proteolitycznej [68, 69]. Do enzymów (oprócz podpuszczki) najczęściej stosowanych w produkcji sera należą: podpuszczka wołowa (zawiera około 50% wołowej pepsyny), pepsyna świńska oraz proteazy z *Mucor miehei*, *Mucor pusillus var. Lindt* i *Endothia parasitica*.

Substytuty podpuszczki często wykazują wyższą aktywność proteolityczną niż podpuszczka. Jeżeli aktywność proteolityczna enzymu jest zbyt duża, to zmniejsza się zawartość kazeiny w skrzepie, a proces dojrzewania sera może przebiegać nieprawidłowo [70]. Nadmierna proteoliza w sposób widoczny hamuje tworzenie się skrzepu [71]. Jakość skrzepu obniża się ze wzrostem stopnia proteolizy kazeiny w przypadku przedstawionych enzymów w następującej kolejności: podpuszczka, pepsyna, proteaza *Mucor miehei* i proteaza *Mucor pusillus* [72].

IX. Znaczenie niektórych reszt aminokwasowych oraz reszt fosforanowych kazeiny w procesie koagulacji

W procesie koagulacji dużą rolę odgrywają reszty aminokwasowe łańcuchów białkowych. Kazeina, w której reszty His zostały poddane fotooksydacji, traci zdolność do koagulacji pod wpływem podpuszczki [73]. Okazało się, że podpuszczka nie jest w stanie z tak zmodyfikowanej kazeiny κ odszczepić glikomakropeptydu. Konsekwencją jest brak agregacji w obecności jonów wapnia. Przyczyna może tkwić w specyficznej modyfikacji reszt His bądź w zmianach ładunku miceli. Modyfikacja Trp lub Met ma niewielki wpływ na proces koagulacji [73]. Natomiast zablokowanie reszt Lys znajdującej się w kazeinie κ nie wywiera wpływu na proteolizę tego białka, ale powoduje całkowitą inhibicję agregacji. Zablokowanie reszt Lys w kazeinie α_2 lub β nie wpływa na proces koagulacji. Sugeruje to, że boczne grupy aminowe Lys w kazeinie κ odgrywają znaczącą rolę podczas enzymatycznej koagulacji [74]. Modyfikacja reszt Arg także powoduje zahamowanie koagulacji kazeiny pod wpływem podpuszczki. Reszty Arg w kazeinie κ znajdują się w części dodatnio naładowanego obszaru zawierającego Lys i His [75]. Ich modyfikacja może utrudniać dostęp do ważnych dla zjawiska koagulacji reszt Lys.

Dużą rolę w procesie koagulacji odgrywają również grupy fosforanowe kazeiny. Usunięcie 60% grup fosforanowych z mleka powoduje, że skrzep

utworzony pod wpływem działania podpuszczki staje się zbyt miękki [76, 77]. Formowanie luźnego skrzepu w mleku pozbawionym grup fosforanowych jest wynikiem dezintegracji micel kazeinowych, a grupy fosforanowe decydują o odpowiednich rozmiarach micel kazeinowych w mleku [78]. Badania wielu autorów [50, 71, 76] wykazały, że tworzenie skrzepu jest związane, między innymi, z interakcjami jonów Ca^{2+} z grupami fosforanowymi, głównie kazeiny β .

X. Wpływ interakcji jonowych na koagulację mleka

Znaczenie interakcji jonowych podczas koagulacji mleka badano stosując dodatek związków jonowych oraz detergentów [79, 80, 81]. Stwierdzono, że substancje, które najsilniej wiążą się z micelami i wywierają największy wpływ na koagulację, mają wysoki ładunek dodatni lub zawierają zarówno części obdarzone ładunkiem jak i hydrofobowe [81]. Związki takie adsorbowane są przez micelle w miejscach zawierających ładunek, najczęściej o charakterze anionowym lub wykazujących charakter hydrofobowy. Samo wiązanie zachodzi wewnątrz miceli, a nie na powierzchni osłoniętej częścią makropeptydową kazeiny α [80]. Związki o charakterze kationów skracają czas koagulacji miceli kazeiny. Poprzez osłonięcie w miceli kazeinowej ujemnie naładowanych fragmentów łańcuchów polipeptydowych i wzrost hydrofobowości obszaru wewnątrz miceli, zwiększają one powinowactwo podpuszczki do micelarnej kazeiny α i przyspieszają fazę agregacji [82]. Na czas koagulacji wywierają wpływ głównie ilość, ładunek i ciężar cząsteczkowy dodawanych substancji [83]. Detergenty kationowe skracają, natomiast anionowe wydłużają czas koagulacji mleka [27]. Przy wyższych stężeniach detergenty anionowe mogą powodować koagulację mleka bez udziału podpuszczki. Stwierdzono, że ułatwiają one także synerezę skrzepu podpuszczkowego [21].

Obniżenie bariery energetycznej, na skutek osłonięcia w miceli kazeinowej obszarów obdarzonych ładunkiem lub zmniejszenia efektu sterycznego, ułatwia interakcje zachodzące podczas koagulacji mleka.

XI. Uwagi końcowe

Koagulacja enzymatyczna mleka jest procesem bardzo złożonym. Duża heterogeniczność układu jakim jest mleko utrudnia badanie zjawisk natury chemicznej i fizycznej zachodzących podczas koagulacji. Badania prowadzone w układach modelowych nie uwzględniają całej gamy czynników oddziałujących na proces koagulacji w warunkach naturalnych. Dyfuzja i adsorpcja, zjawiska czysto fizyczne, służące do wyjaśniania mechanizmów procesu koagulacji zakłócone są szeregiem oddziaływań natury chemicznej, a charakter tych zjawisk zmienia się na skutek przebiegu zachodzących w trakcie procesu reakcji. Szybkość reakcji i stopień, w jakim reakcja enzymatyczna i reakcja agregacji zachodzą na siebie, zależy od takich czynników jak pH, temperatura, siła jonowa,

stężenie wapnia, stężenie i skład miceli kazeinowych. Zmiana każdego z tych parametrów, w specyficznym układzie jakim jest mleko, może zmieniać pozostałe czynniki, co utrudnia badania.

Nie znane są mechanizmy powodujące skupianie się miceli kazeinowych podczas agregacji. Brak jest również podstaw teoretycznych do opracowania kinetyki bardzo skomplikowanej reakcji tworzenia skrzepu [8]. Stan obecnej wiedzy pozwala jednak stwierdzić, że zjawisko koagulacji powinno być rozważane jako suma wszystkich sił termodynamicznych, w skład których wchodzi niespecyficzne interakcje hydrofobowe i elektrostatyczne oraz specyficzne interakcje miceli kazeinowych zmodyfikowanych w wyniku działania enzymu [5].

Artykuł otrzymano 4 stycznia 1988 r.

Zaakceptowano do druku 9 czerwca 1988 r.

PIŚMIENICTWO

1. Pierre A., (1985), *Lait*, **65**, 201—212.
2. Roefs S. P. F. M., Walstra P., Dalgleish D. G., Horne D. S., (1985), *Neth. Milk Dairy J.*, **39**, 119—122.
3. McMahon D., Brown R. J., (1984), *J. Dairy Sci.*, **67**, 499—512.
4. Hardy E. E., Muir D. D., Sweetsur A. W. M., West I. G., (1984), *J. Dairy Sci.*, **67**, 1666—1673.
5. McMahon D. J., Brown R. J., (1984), *J. Dairy Sci.*, **67**, 919—929.
6. Payens T. A. J., (1976), *Neth. Milk Dairy J.*, **30**, 55—59.
7. Walstra P., van Dijk H. J. M., Geurts T. J., (1985), *Neth. Milk Dairy J.*, **39**, 209—246.
8. Walstra P., van Vliet T., (1986), *Neth. Milk Dairy J.*, **40**, 241—268.
9. Dziuba J., (1986), *Post. Biochem.*, **32**, 335—352.
10. Dziuba J., Prusik J., (1984), *Zesz. Nauk. ART Olszt.*, **20**, 49—67.
11. Waagner Nielsen E., Berntsen G., Hansen S., Larsen B. V., Edelsten D., (1982), XXI International Dairy Congress, Vol. 1, Book 2 Moscow USSR, 257—258.
12. Okigbo L. M., Richardson G. H., Brown R. J., Ernstrom C. A., (1985) *J. Dairy Sci.*, **68**, 1887—1892.
13. Vreeman H. J., Visser S., Slangen C. J., van Riel J. A. M., (1986), *Biochem. J.*, **240**, 87—90.
14. Van Hooydonk A. C. M., Hagedoorn H. G., Boerrigter J. J., (1986), *Neth. Milk Dairy J.*, **40**, 369—380.
15. Addeo F., Martin P., Ribadeau-Dumas B., (1984), *Milchwiss.* **39**, 202—205.
16. Chaplin B., Green M. L., (1980), *J. Dairy Res.*, **47**, 351—358.
17. Dalgleish D. G., (1986), *J. Dairy Res.*, **53**, 43—51.
18. Van Hooydonk A. C. M., Olieman C., Hagedoorn H. G., (1984), *Neth. Milk Dairy J.*, **37**, 207—222.
19. Castle A. V., Wheelock J. V., (1972), *J. Dairy Res.*, **39**, 15—21.
20. Mehaia M. A., Cheryan M., (1983), *J. Dairy Sci.* **66**, 2474—2481.
21. Verger R., Mieras M. C. E., Haas G. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4023—4034.
22. Van Hooydonk A. C. M., Walstra P., (1987), *Neth. Milk Dairy J.*, **41**, 19—47.
23. Scott-Blair G. W., Burnett J., (1961), *J. Dairy Res.*, **28**, 165—173.
24. Walstra P., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 317—323.
25. Dalgleish D. G., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 653—661.
26. Dalgleish D. G., (1980), *Biophys. Chem.*, **11**, 147—155.

27. Cheryan M., van Wyk P.J., Olson N.F., Richardson T., (1975), *J. Dairy Sci.*, **58**, 477—481.
28. Lee H.J., Olson N.F., Richardson T., (1977), *J. Dairy Sci.*, **60**, 1683—1688.
29. Hicks C.L., Ferrier L.K., Olson N.F., Richardson T., (1975), *J. Dairy Sci.*, **58**, 19—23.
30. Dalgleish D.G., Parker T.G., (1980), *J. Dairy Res.*, **47**, 113—122.
31. Payens T.A.J., Wiersma A.K., Brinkhuis J., (1977), *Biophys. Chem.*, **6**, 253—261.
32. Payens T.A.J., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 291—306.
33. Payens T.A.J., (1977), *Biophys. Chem.*, **6**, 263—270.
34. Payens T.A.J., (1978), *Neth. Milk Dairy J.*, **32**, 170—183.
35. McMahon D.J., Brown R.J., (1983), *J. Dairy Sci.*, **66**, 341—344.
36. Lucisano M., Peri C., Donati E., (1985), *Milchwiss.*, **40**, 600—604.
37. Surkov B.A., Klimovski I., Kayushkin V.A., (1982), *Milchwiss.*, **37**, 393—395.
38. Kowalchuk A.W., Olson N.F., (1978), *J. Dairy Sci.*, **61**, 1375—1379.
39. McMahon D.J., Brown R.J., (1982), *J. Dairy Sci.*, **65**, 1639—1642.
40. Schaar J., (1984), *J. Dairy Res.*, **51**, 397—406.
41. Kopelman I.J., Cogan V., (1976), *J. Dairy Sci.*, **59**, 196—199.
42. Overbeek J.T., (1952), w *Colloid Science*, red. Kruyt H.R., t. 1, str. 701—745; Elsevier, Amsterdam.
43. Green M.L., Grutchfield G., (1971), *J. Dairy Res.*, **38**, 151—164.
44. Green M.L., Morant S.V., (1981), *J. Dairy Res.*, **48**, 57—63.
45. Goodarznia I., (1979), *Chem. Eng. Sci.*, **33**, 533—538.
46. Sutherland D.N., (1967), *J. Colloid Interface Sci.*, **25**, 373—375.
47. Sutherland D.N., (1970), *Nature*, **226**, 1241—1242.
48. Sutherland D.N., Goodarznia I., (1971), *Chem. Eng. Sci.*, **26**, 2071—2075.
49. Dalgleish D.G., (1981), *J. Dairy Res.*, **48**, 65—69.
50. Ekstrand B., Larsson-Raznikiewicz M., Perlmann C., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **630**, 361—366.
51. Parker T.G., Dalgleish D.G., (1977), *J. Dairy Res.*, **44**, 85—92.
52. Parker T.G., Dalgleish D.G., (1977), *J. Dairy Res.*, **44**, 79—84.
53. Dalgleish D.G., Payens T.A.J., Brinkhuis J., (1981), *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 381—383.
54. Payens T.A.J., (1984), *J. Appl. Biochem.*, **6**, 232—240.
55. Brinkhuis J., Payens T.A.J., (1984), *Biophys. Chem.*, **19**, 75—81.
56. Darling D.F., van Hooydonk A.C.M., (1981), *J. Dairy Res.*, **48**, 189—200.
57. Green M.L., Hobbs D.G., Morant S.V., Hill V.A., (1978), *J. Dairy Res.*, **45**, 413—422.
58. Kimber A.M., Brooker B.E., Hobbs D.G., Prentice J.H., (1974), *J. Dairy Res.*, **4**, 389—396.
59. Kalab M., (1977), *Milchwiss.*, **32**, 449—458.
60. Van Hooydonk A.C.M., Boerrigter I.J., Hagedoorn H.G., (1986), *Neth. Milk Dairy J.*, **40**, 297—313.
61. Okigbo L.M., Richardson G.H., Brown R.J., Ernstrom C.A., (1985), *J. Dairy Sci.*, **68**, 3135—3142.
62. Shalabi S.I., Fox P.F., (1982), *J. Dairy Res.*, **49**, 153—157.
63. West D.W., (1984), *Mannah Res.*, 101—120.
64. Cheryan M., van Wyk P.J., Olson N.F., Richardson T., (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 585—598.
65. Rüegg M., Luscher M., Blanc B., (1974), *J. Dairy Sci.*, **57**, 387—393.
66. Garnot P., Corre C., (1980), *J. Dairy Res.*, **47**, 103—111.
67. Dalgleish D.G., (1980), *J. Dairy Res.*, **47**, 231—235.
68. McMahon O.J., Brown R.J., (1985), *J. Dairy Sci.*, **68**, 628—632.
69. Visser S., (1981), *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 65—88.
70. Green M.L., (1977), *J. Dairy Res.*, **44**, 159—188.

71. Yun S., Ohmiya K., Shimizu S., (1982), *Agric. Biol. Chem.* **46**, 443—449.
72. Yun S., Ohmiya K., Kobayashi T., Shimizu S., (1981), *J. Food Sci.*, **46**, 705—714.
73. Hill R.J., Wake R.G., (1969), *Nature*, **22**, 635—639.
74. Hill R.D., Cracker B.A., (1968), *J. Dairy Res.*, **35**, 13—18.
75. Hill R.D., (1970), *J. Dairy Res.*, **37**, 187—192.
76. Yun S., Ohmiya K., Shimizu S., (1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1505—1511.
77. Ohmiya K., Yun S., Kobayashi T., Shimizu S., (1981), *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 318—322.
78. Knoop A.M., Peters K.H., (1975), *Milchwiss.*, **30**, 674—680.
79. Green M.L., (1982), *J. Dairy Res.*, **49**, 99—105.
80. Green M.L., (1982), *J. Dairy Res.*, **49**, 87—98.
81. Green M.L., Marshall R.J., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 365—367.
82. Green M.L., Marshall R.J., (1977), *J. Dairy Res.*, **44**, 421—531.
83. Marshall R.J., Green M.L., (1980), *J. Dairy Res.*, **47**, 359—369.

ALICJA ŻBIKOWSKA*, JERZY DZIUBA**

Fosforylacja kazeiny a jej właściwości

Phosphorylation of casein and its properties

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Określanie pozycji fosforylowanych reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym kazeiny
- III. Specyficzność działania kinazy kazeinowej
- IV. Ograniczenia zakresu fosforylacji kazeiny
- V. Właściwości kinazy kazeinowej
- VI. Wpływ reszt fosfoserylowych na strukturę i funkcję kazeiny oraz właściwości mleka
- VII. Technologiczne znaczenie fosforylacji kazeiny
- VIII. Biologiczne znaczenie fosforylacji kazeiny
- IX. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Localisation of the phosphorylated amino acid residues in casein
- III. Characteristic of the casein kinase action
- IV. Limitation of the casein phosphorylation
- V. Properties of casein kinase
- VI. Effect of the phosphoserine residues on the structure and function of casein and properties of milk
- VII. Technological importance of casein phosphorylation
- VIII. Biological importance of casein phosphorylation
- IX. Concluding remarks

I. Wstęp

Kazeina jest głównym składnikiem białek mleka. Do większości badań, dotyczących struktury i właściwości kazeiny, używano mleka krowy *Bos taurus*, ze względu na jego znaczenie w żywieniu człowieka [1]. Kazeinę mleka krowiego rozdzielano elektroforetycznie na cztery frakcje (α_{s1} , α_{s2} , β i κ), które zostały szczegółowo scharakteryzowane [2, 3]. Podczas rozdzielania elektroforetycznego kazeiny mleka innych zwierząt wykryto podobne frakcje [1]. Znaczna część kazeiny występuje w mleku w postaci micel, o których stabilności decydują w

* Dr inż., ** Prof. dr hab., Zakład Biochemii Żywności, Instytut Fizyki i Chemii Żywności ART Olsztyn-Kortowo

dużej mierze grupy fosforanowe kazeiny [3]. Stopień fosforylacji kazeiny ma wpływ na właściwości mleka, związane zarówno z jego funkcją biologiczną, jak i technologiczną.

II. Określenie pozycji fosforylowanych reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym kazeiny

Strukturę i rzędową kazeiny oznaczano początkowo metodą Edm ana [4]. Oznaczono w ten sposób strukturę kazeiny mleka krowiego oraz mleka innych zwierząt domowych [5—13], a także mleka kobiecego [14—16]. Metoda ta stwarza jednak trudności w przypadku badania długich łańcuchów polipeptydowych, kiedy trzeba dodatkowo stosować techniki pośrednie [1, 17]. Problemy te zostały rozwiązane dzięki opracowanym w ostatnich latach metodom klonowania genów. Wyizolowany z tkanki czynnego gruczołu mlecznego kwas rybonukleinowy mRNA służy do otrzymania komplementarnego kwasu dezoksyrybonukleinowego cDNA. Sekwencja aminokwasów w kazeinach, zdefiniowana przez specyficzny mRNA określana jest drogą dedukcji, na podstawie znajomości struktury i rzędowej nukleotydów otrzymanego cDNA. Metodę tę wykorzystano do ustalenia sekwencji aminokwasów w kazeinie izolowanej z mleka różnych gryzoni [18—23].

Określenie pozycji reszt fosforanowych w strukturze i rzędowej fosfoprotein zawsze stanowiło trudny problem. Grupy fosforanowe kazeiny podstawione są w miejsca niektórych grup wodorotlenowych Ser i Thr w łańcuchach polipeptydowych. Fosforylacja tych reszt zachodzi na etapie potranslacyjnym biosyntezy białek i w związku z tym, metodą klonowania nie można uzyskać informacji dotyczących pozycji reszt fosforylowanych [1].

Metody chemiczne okazały się mało skuteczne w ustaleniu pozycji reszt fosforanowych w łańcuchu polipeptydowym kazeiny. Oznaczenie ogólnej zawartości reszt kwasu ortofosforowego w izolowanych fosfopeptydach nie daje informacji o rozmieszczeniu grup fosforanowych, gdy łańcuchy peptydowe zawierają zarówno podstawione jak i niepodstawione reszty Ser i Thr [6, 24]. Zastosowanie wielu modyfikacji metody Edmana również nie pozwoliło jednoznacznie ustalić pozycji grup fosforanowych w kazeinie [19, 25, 26, 27].

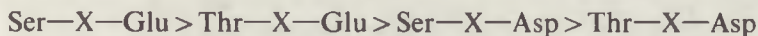
Magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) wykorzystano do ustalenia reszt fosforanowych w znakowanej izotopem ^{31}P kazeinie α_1 i β mleka krowiego [28, 29]. Informację o położeniu specyficznych reszt uzyskiwano z bezpośredniego porównania widm NMR białek natywnych i peptydów otrzymanych na drodze enzymatycznej degradacji. Zadowalające rezultaty otrzymano w przypadku występowania pojedynczych reszt fosfoseryny, jak na przykład w pozycji 35 kazeiny β mleka krowiego [24] (Ryc. 1). W przypadku występowania w łańcuchu polipeptydowym wielu położonych obok siebie reszt fosfoseryny, sąsiadujące z nimi reszty Glu są zdolne do przenoszenia rezonansu ^{31}P na wszystkie fosfoseryny [28]. Metoda ta ma ograniczone zastosowanie w przypadku

nieznanej struktury I rzędowej, ponadto wymaga dużych ilości materiału badawczego.

Problem określenia pozycji reszt fosforanowych w łańcuchach polipeptydowych białek został rozwiązany dzięki metodzie spektrografii masowej, która pozwala analizować peptydy o masie ponad 4000 [1, 30]. Bombardowanie peptydów atomami gazu obojętnego prowadzi do stopniowego odłączania aminokwasów z łańcucha. Ciężar cząsteczkowy odłączonych aminokwasów, wyliczony z różnicy mas peptydu przed i po bombardowaniu, pozwala na ich identyfikację. I tak biorąc pod uwagę fakt, że masa cząsteczkowa Ser wynosi 80, natomiast fosfoseryny 167 łatwo określić, które reszty Ser zawierają grupy fosforanowe. Przy użyciu tej techniki potwierdzono wcześniej rozpoznane [31, 32] położenie reszt fosfoserylowych w kazeinie α_1 i β [1] (Ryc. 1). Technike spektrografii masowej zastosowano z powodzeniem także do określania struktury częściowo defosforylowanych pochodnych N-końcowego fosfopeptydu kazeiny β . Defosforylację przeprowadzono przy udziale kwaśnej oraz alkalicznej fosfatazy, a otrzymane produkty reakcji rozdzielono na peptydy zawierające od 0 do 4 reszt fosfoserylowych [32]. Zastosowanie spektrografii masowej do badania rozdzielonych peptydów, pozwoliło na ujawnienie położenia miejsc, w których znajdowały się usunięte reszty fosforanowe, a także na wykazanie, że kwaśna fosfataza ze śledziona i alkaliczna fosfataza z *Escherichia coli* atakowały reszty fosfoserylowe w różnych sekwencjach łańcucha.

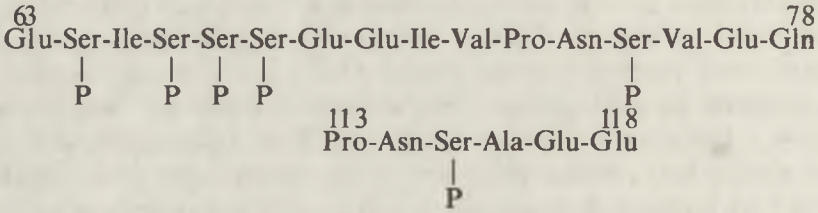
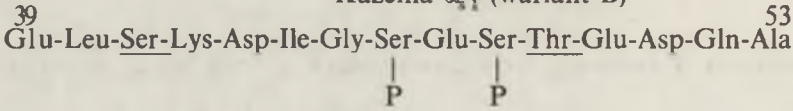
III. Specyficzność działania kinazy kazeinowej

W łańcuchu polipeptydowym kazeiny ulegają fosforylacji głównie reszty Ser, rzadziej Thr. Porównanie pewnej liczby sekwencji pozwala na wniosek, że niektóre anionowe tryplety reszt aminokwasowych mogą być sygnałem, wskazującym specyficznym kinazom miejsca fosforylacji. Stwierdzono, że reszty Ser, a w mniejszym stopniu Thr, które ulegają fosforylacji występują (licząc od strony N-końcowej łańcucha polipeptydowego) zawsze przed resztą aminokwasową X, za którą znajduje się reszta aminokwasowa nosząca ładunek ujemny. Mercier [33] zidentyfikował cztery główne miejsca rozpoznania w kolejności uwzględniającej malejącą zdolność do fosforylacji:

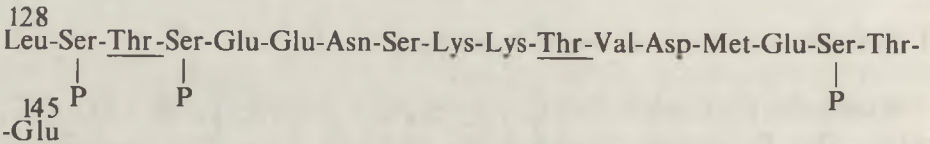
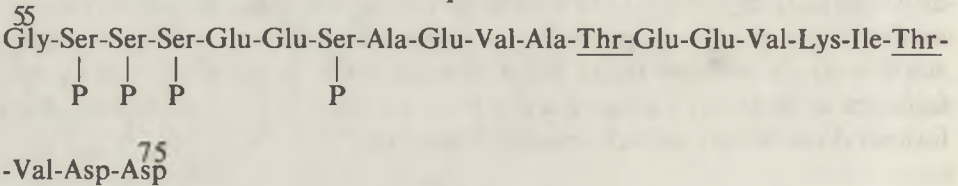
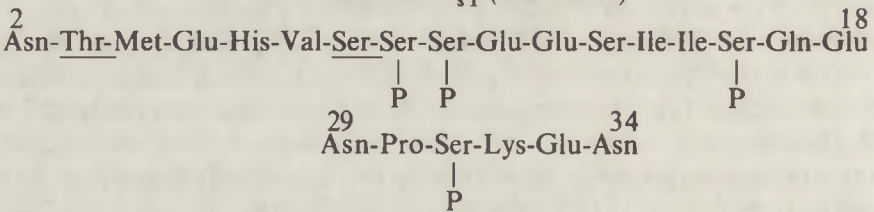


Resztą X może być reszta jakiegokolwiek aminokwasu. Jednakże gdy w pozycji X były reszty aminokwasów kwaśnych, takich jak Glu lub Asp, fosforylacja grup serylowych lub treonilowych zachodziła szybko, podczas gdy reszty zasadowe lub rozbudowane przestrzennie hamowały tę reakcję [33]. I tak w kazeinie α_{s1} mleka krowiego (Ryc. 2, wariant C) zastąpienie reszty Thr w pozycji 130 resztą Ile, prowadzi do zmniejszenia szybkości fosforylacji reszty Ser w pozycji 131 i 129 [34]. Oprócz tych głównych miejsc rozpoznania, także już ufosforylowane reszty Ser lub Thr mogą przyczyniać się, jako ujemnie naładowany składnik łańcucha

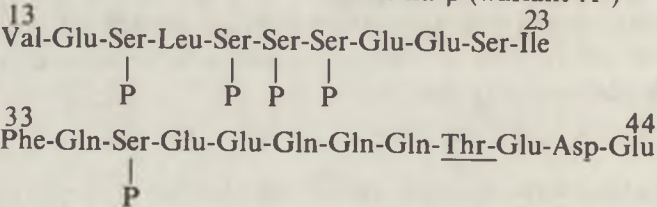
Kazeina α_1 (wariant B)



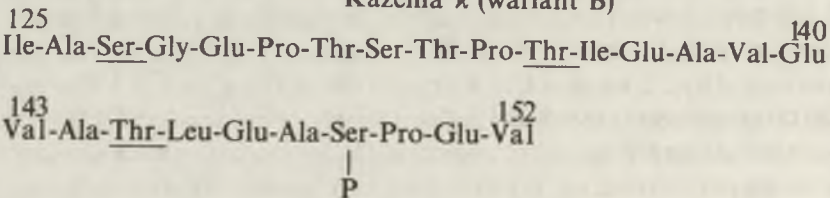
Kazeina α_1 (wariant A)



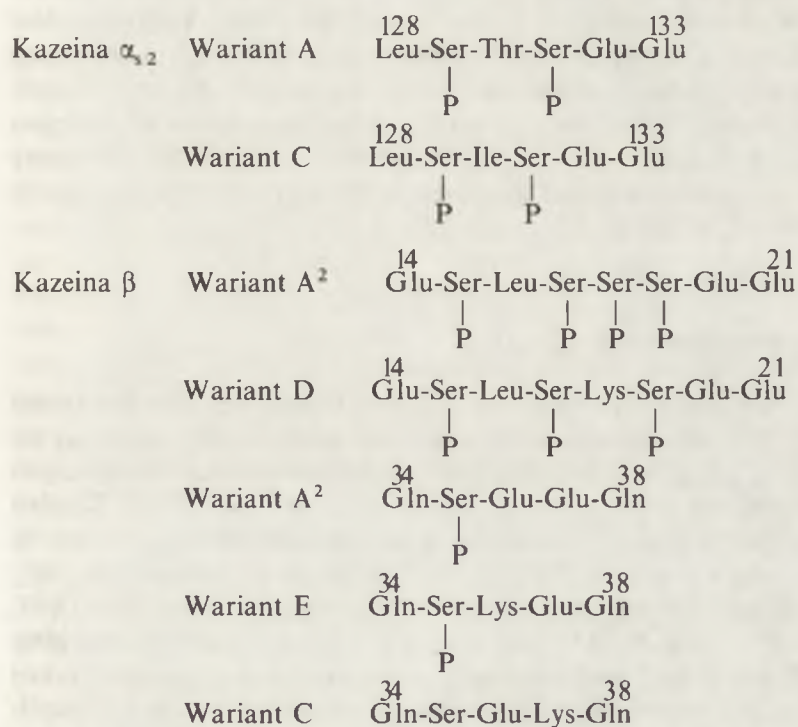
Kazeina β (wariant A²)



Kazeina κ (wariant B)



polipeptydowego, do fosforylacji następnych reszt aminokwasowych [33]. Tłumaczy to obecność występujących po sobie kolejnych ufosforylowanych reszt Ser w kazeinie α_{s1} , α_{s2} i β mleka krowiego (Ryc. 1) [5, 6, 8]. Kolejno występujące reszty Ser zabserwowano we wszystkich sekwencjach aminokwasowych dotychczas badanych form kazeiny, z wyjątkiem kazeiny α (Ryc. 1). W przypadku kazeiny β sekwencja reszt fosfoserylowych decyduje o dużym ujemnym ładunku N-końcowej części łańcucha polipeptydowego. Podobne skupiska fosfoseryny stwierdzono zarówno w α_{s1} jak i α_{s2} kazeinie, lecz ze względu na obecność wielu innych, ufosforylowanych reszt Ser, ujemne ładunki rozłożone są bardziej równomiernie w obrębie całego łańcucha [1]. Potwierdzenie tezy Merciera [33] dotyczącej specyficznego trypletów aminokwasowych, rozpoznawanych przez kinazę, uzyskano podczas badania sekwencji łańcucha polipeptydowego genetycznych wariantów kazeiny mleka krowiego.



Ryc. 2. Sekwencje aminokwasowe genetycznych wariantów kazeiny α_{s2} i β mleka krowiego, zawierające specyficzne tryplety aminokwasowe rozpoznawane przez kinazę kazeinową [1, 6, 8, 28, 29, 34, 35, 36, 37]

Ryc. 1. Sekwencje aminokwasowe części łańcuchów polipeptydowych kazeiny mleka krowiego, zawierających specyficzne tryplety aminokwasowe rozpoznawane przez kinazę kazeinową [1, 5, 6, 7, 8, 28, 29, 33, 38]. Podkreślone reszty Ser i Thr pomimo położenia w obrębie specyficznego trypletu aminokwasowego są bardzo rzadko lub nie są nigdy podstawione grupą fosforanową

Stwierdzono, że w wariancie D kazeiny β [35] brak jednej reszty fosforanowej wynika z zastąpienia fosforanu seryny w pozycji 18 (kazeina β -wariant A^2) lizyną (wariant D) (Ryc. 2). Zmiana ta nie wpływała na fosforylację sąsiadujących reszt Ser. Występowanie specyficznych trypletów aminokwasowych możemy zaobserwować również w przypadku genetycznych wariantów A^2 i E kazeiny β , w których Ser w pozycji 35 podstawiona jest grupą fosforanową (36, 37) (Ryc. 2). Wariant C kazeiny β różni się od wariantów A^2 i E występowaniem Lys w miejscu Glu w pozycji 37 i brakiem grupy fosforanowej w pozycji 35. Świadczy to o tym, że Glu w pozycji 37, a nie 36 jest resztą decydującą, umożliwiającą rozpoznanie miejsca fosforylacji przez kinazę. Wiele innych przykładów potwierdza tezę dotyczącą trypletów aminokwasowych rozpoznawanych przez kinazy [33, 38—44]. Na tej podstawie określono 15 ufosforylowanych reszt w kazeinie γ i α mleka szczura, myszy i świnki morskiej [19, 21, 22].

Pomimo dużej zmienności łańcuchów polipeptydowych kazeiny trzy specyficzne obszary w sekwencji mRNA wyizolowanego z tkanek czynnych gruczołów mlecznych różnych ssaków, są wysoce zachowawcze [19]. Są to sekwencje kodujące peptydy sygnałowe, obszar 5' niekodujący i obszar kodujący potencjalne miejsca fosforylacji. Zachowawczość sekwencji kodującej potencjalne miejsca fosforylacji, pomimo dużego stopnia zróżnicowania pozostałej części struktury I-rzędowej, musi wynikać z wpływu poszczególnych miejsc fosforylacji na funkcję kazeiny [1].

IV. Ograniczenia zakresu fosforylacji

Sekwencje łańcucha polipeptydowego kazeiny, które mogą ulec fosforylacji (zawierają tryplety aminokwasowe rozpoznawane przez kinazy) często jej nie ulegają. Formy α_{s1} i α_{s0} kazeiny mleka krowiego zbudowane są z identycznych łańcuchów polipeptydowych, a różnią się tylko stopniem fosforylacji. Kazeina α_{s0} zawiera o jedną grupę fosforanową więcej niż kazeina α_{s1} . Grupa ta połączona jest z Ser w pozycji 41 (Ryc. 1) [38]. Cztery frakcje kazeiny α_{s2} (α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} , α_{s6}) posiadają taką samą sekwencję aminokwasową lecz odpowiednio 13, 12, 11 i 10 reszt fosfoserylowych [33]. Kazeina β mleka krowiego zawiera pięć grup fosforanowych, a kazeina β mleka kobiecego może nie zawierać ani jednej takiej grupy, podczas gdy sekwencja aminokwasów w łańcuchach polipeptydowych tych kazein jest podobna (Ryc. 3) [14—16]. Kazeina κ , różnego pochodzenia, zawiera jedną lub więcej grup fosforanowych. Wszystkie kazeiny κ , których sekwencje zostały do tego czasu określone mają jedną resztę Ser w łańcuchu polipeptydowym, (pozycja 127), która nigdy nie ulega fosforylacji, pomimo, że wchodzi w skład specyficznego, rozpoznawanego przez kinazy trypletu aminokwasowego (Ryc. 1) [33]. Reszta Thr w pozycji 131 uważana jest za nośnika części cukrowej kazeiny κ (obok reszt Thr w pozycjach 133 i 135) [3]. Uważa się, że fosforylacja kazeiny zachodzi podczas przechodzenia kompletnych łańcuchów

V. Właściwości kinazy kazeinowej

Fosforylacja białek jest powszechnym procesem biologicznym. Z komórek ssaków wyizolowano wiele enzymów katalizujących przenoszenie γ -fosforanu ATP na odpowiednie reszty aminokwasowe w białkach. Enzymy te różnią się specyficznością [56]. W aparacie Golgiego komórek czynnego gruczołu mlecznego szczurów, znaleziono kinazę, która wykazuje maksymalną aktywność, niezależną od cyklicznego AMP, przy wysokim stężeniu Ca i Mg [57]. Kinazy, wyizolowane z czynnych gruczołów mlecznych szczura i krowy, katalizują nie tylko fosforylację tych reszt Ser i Thr w łańcuchu polipeptydowym kazeiny, które ulegają fosforylacji w gruczole mlecznym. Po denaturacji białek lub peptydów, fosforylacji ulegają również te reszty Ser i Thr, znajdujące się w sekwencji specyficznych trypletów aminokwasowych, które w gruczole mlecznym nie są fosforylowane [51, 58—61]. Wyizolowane kinazy nie są jednak zdolne do kompletnej refosforylacji kazeiny i jej fragmentów, co może wynikać z innych niż *in vivo* warunków działania [33]. Badania w układach *in vitro* wykazały, że transport ATP poprzez błony pęcherzyków Golgiego jest jednym z czynników kontrolujących proces fosforylacji kazeiny [62—64]. Kinazy kazeinowe wykazują określone zapotrzebowanie na Ca^{2+} i Mg^{2+} , których stężenie w prześwicie pęcherzyków Golgiego powinno być utrzymane na odpowiednim poziomie [65]. Również stężenie poliamin sperminy i spermidyny w gruczole mlecznym wywiera wpływ na działanie kinaz kazeinowych [66].

VI. Wpływ reszt fosfoserylowych na strukturę i funkcję kazeiny oraz właściwości mleka

Znaczna część kazeiny występuje w mleku w postaci miceli [3, 67]. Charakterystyka koloidalnych roztworów białek mleka poszczególnych ssaków jest różna. W mleku krowim, gdzie kazeina jest dominującym białkiem, micelle są bardzo stabilne, składają się z czterech form kazeiny, a ich struktura jest wynikiem specyficznych interakcji pomiędzy charakterystycznymi obszarami poszczególnych cząsteczek kazeiny. Białka te wykazują dużą hydrofobowość, z tym, że obszary hydrofobowe rozmieszczone są różnie w poszczególnych formach kazeiny [3, 68, 69]. Specyficzna struktura łańcuchów polipeptydowych kazeiny zapobiega tworzeniu przez nie globularnych cząsteczek, których obszary hydrofobowe ukryte są wewnątrz [70]. W wyniku tego w obrębie obszarów niepolarnych tworzą się energetycznie korzystne połączenia pomiędzy resztami aminokwasowymi poszczególnych cząsteczek [71]. Asocjacja cząsteczek prowadzi do powstawania kompleksów złożonych z wielu cząsteczek monomerycznych, w których obszary zawierające reszty polarne, w tym ujemnie naładowane reszty fosfoseryny, znajdują się na powierzchni [72]. Silna koncentracja ujemnego ładunku zapobiega agregacji kompleksów. Ca^{2+} przyłączony do reszt fosfoserylowych zmniejsza wielkość ładunku ujemnego, umożliwiając interakcje typu białko-białko pomiędzy obszarami hydrofobowymi, co ewentualnie może

spowodować utratę rozpuszczalności [73]. Zarówno kazeina α_1 jak i kazeina β ulegają strąceniu w roztworach, w których stężenie Ca^{2+} jest wyższe od 10 mmoli/l. Jednakże w kompleksach tworzonych pomiędzy hydrofobowymi obszarami kazeiny κ i form kazeiny wrażliwych na Ca^{2+} , obszary hydrofobowe położone są wewnątrz, a obszary hydrofilowe oraz fragmenty kazeiny κ o wysokim stopniu solwatacji, na zewnątrz kompleksu [3]. Kazeina κ stabilizuje więc kazeinę α_1 i β wobec jonów wapnia [3, 68].

Reszty fosfoserylowe w sposób oczywisty przyczyniają się do stabilności miceli kazeinowych. Jednak badanie ich wpływu na to zjawisko jest trudne w przypadku miceli naturalnych, ze względu na dużą zawartość w micelach koloidalnego fosforanu wapnia. W większości badań stosuje się sztuczne systemy micelarne. Badanie wpływu defosforylacji na stabilność miceli utworzonych z kazeiny κ i α_1 wykazało, że obecność reszt fosfoseryny nie jest warunkiem koniecznym do tworzenia stechiometrycznych kompleksów pomiędzy cząsteczkami tych form kazeiny [73]. Jednak aby micelle tworzyły trwały układ w mleku niezbędne jest określone minimum grup fosforanowych. Usunięcie grup fosforanowych z kazeiny α_1 obniża w sposób drastyczny zdolność kazeiny κ do stabilizowania kompleksów kazeiny κ i α_1 wobec jonów wapnia. Obniża także ilość kazeiny α_1 wbudowanej do miceli i zmniejsza rozmiary miceli [74, 75]. Chemiczna fosforylacja kazeiny α_1 i β nie zmienia ich zdolności do tworzenia miceli z kazeiną κ , natomiast zwiększa ich stabilność wobec jonów wapnia. Do wywołania precypitacji potrzebne jest wyższe stężenie Ca^{2+} niż w przypadku kazeiny α_1 i β nie poddanych chemicznej fosforylacji [76]. Należy jednak pamiętać, że w początkowym etapie precypitacji Ca^{2+} wiąże się z resztami fosfoserylowymi. Usunięcie tych grup zapobiega wiązaniu Ca^{2+} , a kazeina pozbawiona reszt fosforanowych nie jest wrażliwa na takie stężenie Ca^{2+} , które normalnie wywołuje jej niestabilność. Pozbawiona grup fosforanowych kazeina β zachowuje się podobnie jak kazeina κ , stabilizując kazeinę α_1 wobec jonów wapnia [77]. Sugeruje to, że do stabilizacji kazeiny α_1 i β konieczne jest, aby w białku, oprócz hydrofobowych i hydrofilowych obszarów, występowały niewielkie ilości reszt fosfoserylowych [76, 78, 79].

Takie wymagania strukturalne są dość specyficzne i jest godne uwagi to, że kazeina κ , wyizolowana z mleka różnych zwierząt, wykazuje niezwykle podobieństwo pod względem budowy łańcucha polipeptydowego. Ponadto kazeina κ wyizolowana z mleka różnych zwierząt zawiera dwie lub mniej reszt fosfoserylowych, potwierdzając, że niska zawartość fosforanu jest w tym przypadku korzystna, ponieważ jedną z funkcji kazeiny κ w mleku jest stabilizowanie pozostałych form kazeiny wobec jonów wapnia. Defosforylacja kazeiny κ nie ma żadnego wpływu na jej zdolność stabilizowania kazeiny α_1 i β , podczas gdy dodatkowe wprowadzenie reszt fosforanowych w wyraźny sposób ją zmniejsza [73, 76]. Mała liczba grup fosforanowych w kazeinie κ sugeruje konieczność takiego rozmieszczenia specyficznej kinazy białkowej wewnątrz aparatu Golgiego, które umożliwiłoby fosforylację składników kazeiny tylko w specyficznych miejscach rozpoznania [80, 81, 82].

VII. Technologiczne znaczenie fosforylacji kazeiny

Jedną z najbardziej stałych cech kazeiny κ jest podatność na proteolizę wiązania pomiędzy resztami w pozycjach 105 i 106 [83]. Rozszczepienie łańcucha w tym miejscu prowadzi do uwolnienia części C-końcowej, pozostawiając silnie hydrofobową część kazeiny κ w miceli kazeinowej. Destabilizacja układu koloidalnego kazeiny prowadzi do koagulacji miceli i precypitacji kazeiny. Koagulacja jest ważną właściwością mleka wykorzystywaną przy produkcji sera. Bardzo duże znaczenie ma prawidłowa zwięzłość skrzepu, pozwalająca uzyskać jak najwyższy odzysk białek mleka w masie serowej. Reszty fosfoserylowe kazeiny odgrywają znaczną rolę w formowaniu odpowiedniego skrzepu. Stwierdzono, że zwięzłość skrzepu maleje proporcjonalnie do wzrostu stopnia defosforylacji białek [84, 85]. Sugeruje to, że tworzenie miękkiego skrzepu może być spowodowane dezintegracją miceli kazeinowych do mniejszych rozmiarów, co wiąże się z ważnym znaczeniem grup fosforanowych w utrzymywaniu odpowiednich rozmiarów micel w mleku [86]. Wprowadzenie dodatkowych grup fosfoserylowych, poprzez dodatek kazeiny β do mleka, powoduje zwiększenie zwięzłości skrzepu [87]. Stwierdzono, że wzrost zwięzłości wywołany jest wprowadzeniem tej części łańcucha kazeiny β , która zawiera reszty fosfoserylowe [87—89]. Wzbogacenie mleka kazeiną α , nie wpływa w sposób istotny na zwięzłość skrzepu [85, 88]. Grupy fosforanowe występujące w kazeinie β decydują więc o zwięzłości koagulatu. Wynika stąd, że usunięcie ich, uniemożliwia zachodzenie znacznej części tych interakcji (łączenie się miceli poprzez mostki wapniowe pomiędzy grupami fosforanowymi kazeiny), które przyczyniają się do powstania skrzepu [87]. Z podobnym efektem mamy do czynienia podczas technologicznej homogenizacji mleka, która również powoduje obniżenie zwięzłości skrzepu przy produkcji sera. Homogenizacja mleka ma na celu wyeliminowanie zjawiska podstoju tłuszczu w mleku i polega na rozdrobieniu większych kuleczek tłuszczu mlecznego do przeciętnej średnicy 2—3 μm . Podczas homogenizacji mleka, submicelle (cząstki tworzące micelę, złożone z monomerycznych podjednostek czterech głównych form kazeiny [3]) zostają okryte otoczką tłuszczową, która osłaniając grupy fosforanowe, daje taki sam efekt jaki ma miejsce w przypadku usunięcia tych grup na drodze enzymatycznej [90].

Wpływ reszt fosfoserylowych kazeiny β na jakość skrzepu, uzyskanego w wyniku proteolizy miceli kazeinowych, jest szczególnie widoczny podczas tworzenia się koagulatu mleka krowiego i kobilego. W mleku kobiecym kazeina β stanowiąca główne białko ufosforylowana jest w niewielkim stopniu, co powoduje, że koagulat uzyskany z tego mleka jest znacznie luźniejszy [54]. Dzięki temu jest on łatwiej trawiony w żołądku dziecka niż koagulat mleka krowiego.

Obecność reszt fosfoserylowych wywiera także wpływ na inne technologiczne właściwości mleka. Alkaliczna obróbka mleka w podwyższonej temperaturze jest tradycyjnie stosowana podczas procesów przemysłowych. Jest także stale

wprowadzana w nowoczesnym przemyśle spożywczym przy produkcji białkowych izolatów (produkty wysokobiałkowe, zawierające 70–95% białka, w mleczarstwie reprezentowane przez kazeiniany i białczany) o specyficznych właściwościach funkcjonalnych (dobra rozpuszczalność, wysoka stabilność cieplna, zdolność wiązania wody i tłuszczu, wysoka aktywność powierzchniowa, wysoka lepkość) [91]. Stwierdzono, że działanie alkaliów i ogrzewania na reszty fosfoserylowe prowadzi do β -eliminacji grup fosforanowych. Powstające grupy dehydroalaniny mogą ulegać nukleofilowemu przyłączeniu do sąsiadujących reszt Lys tego samego łańcucha [92] lub przylegającej cząsteczki białka, tworząc pochodne lizyloalaninowe oraz poprzeczne wiązania pomiędzy łańcuchami białkowymi [89, 91]. I chociaż pochodne lizyloalaninowe mogą także tworzyć się pod nieobecność fosfoseryny, to stwierdzono, że defosforylacja kazeiny α znacznie ogranicza ich powstawanie w białkach traktowanych alkaliami [93, 94]. Tworzenie się reszt lizyloalaninowych, blokuje część grup aminowych Lys w kazeinie, co może powodować ograniczenie interakcji pomiędzy cząsteczkami kazeiny w miceli. Może również wywierać wpływ na podatność kazeiny na proteolizę [67]. (Zainteresowanie tworzeniem się reszt lizyloalaninowych, w mleku ogrzewanym, wzbudził fakt, że lizyloalanina podawana szczurom okazała się toksyczna. Stwierdzono jednak, że ryzyko związane ze spożywaniem kazeiny zawierającej reszty lizyloalaninowe przez człowieka, jest nieuzasadnione [91]).

Inny aspekt technologiczny, wynikający z obecności grup fosfoserylowych w mleku, związany jest z produkcją likierów śmietankowych. Chociaż micelle kazeinowe są stabilne, mogą ulegać koagulacji na skutek zmieszania z alkoholem. Główną rolę w stabilizowaniu miceli w roztworze odgrywa ich ładunek ujemny, tworzący barierę energetyczną zapobiegającą agregacji [95]. Wielkość tej bariery może być różna w zależności od stałej dielektrycznej ośrodka, w którym micelle są zawieszane. Ze zjawiskiem tym wiąże się mechanizm wywołanej alkoholem koagulacji micel [95]. Ładunek kazeiny spowodowany jest w dużej mierze obecnością grup fosfoserylowych, które stabilizują micelle [96].

VIII. Biologiczne znaczenie fosforylacji kazeiny

Biologiczną funkcją mleka jest dostarczenie składników pokarmowych młodym zwierzętom. Skład miceli kazeinowych jest idealnie dostosowany do tego celu [88, 74). Struktura micelarna kazeiny zapewnia sekrecję wysoko stężonego roztworu białka, Ca^{2+} i fosforanów, a otwarta, gąbczasta budowa miceli ułatwia odstęp enzymów trawiennych do łańcuchów białkowych. Zawartość Ca^{2+} w mleku jest wyższa od niezbędnej do wywołania precypitacji kazeiny α_1 i β , nawet w obecności kazeiny κ . Jest to możliwe dzięki temu, że Ca^{2+} występuje głównie w formie skompleksowanej z fosforanem w postaci koloidalnego fosforanu wapnia. Budowa miceli jest ciągle przedmiotem sporów, lecz większość badaczy sugeruje, że micela składa się z licznych podjednostek połączonych ze sobą za pomocą kompleksów fosforanowo-wapniowych. Praw-

dopodobnie część nieorganicznego fosforanu, znajdującego się w miejscach powierzchniowych sieci krystalicznej koloidalnego fosforanu wapnia, jest zastępowana grupami fosforanowymi reszt fosfoserylowych [97, 98]. Dzięki temu submicelle łączą się między sobą. Sieć krystaliczna kompleksu fosforanowo-wapniowego ulega zniekształceniu w takim stopniu, że może on występować w stanie przesylenia nie ulegając wytrąceniu. Fakt, że defosforylacja kazeiny powoduje dezintegrację micel kazeinowych do mniejszych jednostek, potwierdza tę hipotezę. Jeżeli grupy fosfoserylowe kazeiny rzeczywiście pełnią taką rolę, to wzrost ich zawartości w kazeinie, powinien pozwalać na wzrost stężenia wapnia w mleku. Nie jest to możliwe do osiągnięcia poprzez chemiczną fosforylację mleka krowiego. W świetle tych faktów ciekawe jest, że odpowiadające kazeinie α_s mleka krowiego formy kazeiny mleka szczurów i królików, charakteryzujące się znacznie większą niż mleko krowie zawartością wapnia, zawierają znacznie większą liczbę fosforylowanych reszt Ser [19].

Podczas proteolitycznego trawienia udało się ujawnić inną jeszcze rolę reszt fosfoserylowych i ich skupisk w specyficznych obszarach kazeiny. Z każdej kazeiny poddanej trawieniu można łatwo wyizolować fosfopeptydy, których reszty aminokwasowe zawierają grupy fosforanowe [24, 31]. Peptydy te, z powodu występowania w nich skupisk fosfoseryny, wykazują dużą odporność na dalszą proteolizę, a także ogromną zdolność do tworzenia kompleksów z Ca^{2+} . Enzymatyczne trawienie mleka w jelicie młodych zwierząt przebiega podobnie, o czym świadczy wykrycie analogicznych kazeinofosfopeptydów w jelicie cienkim szczura. Podczas podawania szczurom kazeiny defosforylowanej (w 80—85%), następowało znaczne obniżenie wchłaniania wapnia z jelita, co świadczy o tym, że obecność kazeinofosfopeptydów stymuluje adsorbcję Ca^{2+} [99—101]. Fakt, że oligopeptydy zawierające grupy fosfoserylowe przechodzą, niezmienione enzymatycznie, przez ściany jelita, może świadczyć o tym, że grupy fosforanowe w kazeinie obok pełnienia funkcji czysto żywieniowych pełnią również funkcje w metabolizmie komórkowym [1, 102].

IX. Uwagi końcowe

Kazeina jako fosfoproteina ma duże znaczenie zarówno z punktu widzenia fizjologicznego jak i technologicznego. Dotychczasowe badania wskazują na zależność pomiędzy funkcją fizjologiczną kazeiny a stopniem jej fosforylacji. Grupy fosforanowe związane z kazeiną wpływają w znacznym stopniu na jej właściwości chemiczne i funkcjonalne. Stopień fosforylacji reszt aminokwasowych kazeiny należy uwzględnić i odpowiednio wykorzystać w procesach technologicznych, związanych z przekształceniem białek mleka w bardziej trwałe produkty stosowane w żywieniu człowieka.

Artykuł otrzymano 4 stycznia 1988 r.

Zaakceptowano do druku 9 czerwca 1988 r.

PIŚMIENICTWO

1. West D. W., (1986), *J. Dairy Res.*, **53**, 333—352.
2. Whitney R., Brunner Mc L., Ebner J. R., Farrell K. E., Josephson R. V., Moor C. V., Swaisgood H. E., (1976), *J. Dairy Sci.*, **59**, 795—815.
3. Dziuba J., (1986), *Post. Biochem.*, **32**, 335—352.
4. Edman P., Beeg G., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80—91.
5. Mercier J. C., Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 41—51.
6. Ribadeau-Dumas B., Brignon G., Grosclaude F., Mercier J. C., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 505—514.
7. Mercier J. C., Brignon G., Ribadeau-Dumas B., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 222—235.
8. Brignon G., Ribadeau-Dumas B., Mercier J. C., Pelissier J. P., Das B. C., (1977), *FEBS Lett.*, **76**, 274—279.
9. Jollès J., Fiat A. M., Schoentgen F., Alais C., Jollès P., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 335—343.
10. Richardson B. C., Creamer L. K., (1976), *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, **11**, 46—53.
11. Richardson B. C., Mercier J. C., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 285—297.
12. Mercier J. C., Addeo F., Pelissier J. P., (1976), *Biochimie*, **58**, 1303—1310.
13. Petrilli P., Addeo F., Chianese L., (1983), *Ital. J. Biochem.*, **32**, 336—344.
14. Greenberg R., Groves M. L., Peterson R. F., (1976), *J. Dairy Sci.*, **59**, 1016—1018.
15. Monti J. C., Jollès P., (1982), *Experientia*, **38**, 1211—1213.
16. Greenberg R., Groves M. L., Dower H. J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5132—5138.
17. Hennighausen L. G., Sippel A. E., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **125**, 131—141.
18. Blackburn D. W., Hobbs A. A., Rosen J. M., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2295—2307.
19. Hobbs A. A., Rosen J. M., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 8079—8098.
20. Yu-Le L., Rosen J. M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 10794—10804.
21. Hennighausen L. G., Steudle A., Sippel A. E., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **126**, 569—572.
22. Hall L., Laird J. E., Pascall J. C., Craig R. K., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **138**, 585—589.
23. Suard Y. M. L., Tosi M., Kraehenbuhl J. P., (1982), *Biochem. J.*, **201**, 81—90.
24. Manson W., Annan W. D., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 16—26.
25. Hermodson M. A., Ericsson L. H., Titani K., Neurath H., Walsh K. A., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4493—4502.
26. Naughton M. A., Sanger F., Hartley B. S., Shaw D. G., (1960), *Biochem. J.*, **77**, 149—163.
27. Annan W. D., Manson W., Nimmo J. A., (1982), *Analyt. Biochem.*, **121**, 62—68.
28. Humphrey R. S., Jolley K. W., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **708**, 294—299.
29. Sleigh R. W., Mackinlay A. G., Pope J. M., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **742**, 175—183.
30. Morris H. R., Dell A., Etienne A. T., Judkins M., McDowell R. A., Pancio M., Taylor G. W., (1982), *Pure appl. Chem.*, **54**, 267—279.
31. West D. W., (1977), *J. Dairy Res.*, **44**, 373—376.
32. West D. W., Towers G. E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **453**, 383—390.
33. Mercier J. C., (1981), *Biochimie*, **63**, 1—17.
34. Mahé M. F., (1981), Tesis Univ. Paris-Sud, Centre D'Orsay.
35. Grosclaude F., Mahé M. F., Mercier J. C., (1974), *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **6**, 305—329.
36. Grosclaude F., Mahé M. F., Mercier J. C., Ribadeau-Dumas B., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 328—337.
37. Grosclaude F., Mahé M. F., Voglino G. F., (1974), *FEBS Lett.*, **45**, 3—5.
38. Manson W., Carolan T., Annan W. D., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 411—417.

39. McKenzie R. M., Larson B. L., (1978), *J. Dairy Sci.*, **61**, 723—728.
40. Qasba P. K., Chakrabartty P. K., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1167—1173.
41. Dandekar A. M., Robinson E. A., Appella E., Qasba P. K., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3987—3991.
42. Henninghausen L. G., Sippel A. E., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2677—2684.
43. Henninghausen L. G., Sippel A. E., Hobbs A. A., Rosen J. M., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3733—3744.
44. Qasba P. K., Dandekar A. M., Horn T. M., Losonczy I., Siegel M., Sobiech K. A., Nakashi H. L., Devinoy E., (1982), *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **16**, 165—186.
45. Turkington R. W., Topper Y. J., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 366—372.
46. Singh V. N., Dave S. S., Venkitasubramanian T. A., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 48C—50C.
47. Mercier J. C., Gaye P., (1980), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **343**, 232—251.
48. Hanover J. A., Lennarz W. J., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 1—19.
49. Lingappa V. A., Lingappa J. R., Prasad R., Ebner K. E., Blobel G., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2338—2342.
50. Pless D. D., Lennarz W. J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**, 134—138.
51. Bingham E. W., Groves M. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4510—4515.
52. Azuma N., Yamauchi K., (1983), *Jap. J. Dairy Food Sci.*, **32**, A 111—A 112.
53. Davies D. T., Law A. J. R., (1977), *J. Dairy Res.*, **44**, 213—221.
54. Rüegg M., Blane B., (1982), *Food Microstruct.*, **1**, 25—47.
55. Ribadeau-Dumas B., (1983), *Endeavour New Ser.*, **7**, 80—87.
56. Greengard P., (1978), *Science Wash.*, **199**, 146—152.
57. Bingham E. W., Farrell H. M., Basch J. J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 8193—8194.
58. Bingham E. W., Farrell H. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3647—3651.
59. Mackinlay A. G., West D. W., Manson W., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **76**, 233—243.
60. Szymański E. S., Farrell H. M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **702**, 163—172.
61. Bingham E. W., Farrell H. M., (1977), *J. Dairy Sci.*, **60**, 1199—1207.
62. Pascall J. C., Bulton A. P., Craig R. K., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **119**, 91—99.
63. West D. W., Clegg R. A., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **137**, 215—220.
64. West D. W., Clegg R. A., (1984), *Biochem. J.*, **219**, 181—187.
65. West D. W., Clegg R. A., (1981), *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 468—469.
66. West D. W., Clegg R. A., (1984), *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 1046—1047.
67. Fox P. F., Mulvihill D. M., (1982), *J. Dairy Res.*, **49**, 679—693.
68. McMahon D. J., Brown R. J., (1984), *J. Dairy Sci.*, **67**, 499—512.
69. Swaisgood H. E., (1973), *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, **3**, 375—414.
70. Schmidt D. G., Payens T. A. J., (1976), w *Surface and Colloidal Science*, red. Matijevic E., t. 9, str. 165—229; Wiley, Amsterdam.
71. Nemethy G., Scheraga M. A., (1962), *J. Phys. Chem. Wash.*, **66**, 1773—1789.
72. Schmidt D. G., (1980), *Neth. Milk Dairy J.*, **34**, 42—64.
73. Pepper L., Thompson M. P., (1963), *J. Dairy Sci.*, **46**, 764—767.
74. Bingham E. W., Farrell H. M., Carroll R. J., (1972), *Biochemistry N. Y.*, **11**, 2450—2454.
75. Whikehart D. R., Rafter G. W., (1970), *J. Dairy Sci.*, **53**, 1171—1176.
76. Yoshikawa M., Sasaki R., Chiba H., (1981), *Agric. Biol., Chem. Jap.*, **45**, 909—914.
77. Yoshikawa M., Tamaki M., Suqimoto E., Chiba H., (1974), *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **38**, 2051—2052.
78. Yamauchi K., Takemoto S., Tsugot T., (1967), *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **31**, 54—63.
79. Schmidt D. G., van der Spek C. A., Buchheim W., Hinz A., (1974), *Milchwiss.*, **29**, 455—459.
80. Mercier J. C., Gay P., (1983), w *Biochemistry of Lactation* red. Mephram T. B., str. 177—227, Elsevier, Amsterdam.
81. De Paoli-Roach A. A., Bingham E. W., Roach P. J., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 229—236.

82. Donella-Deana A., Pinna L.A., Hemmings B., Cohen P., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **745**, 149—153.
83. McMahon D.J., Brown R.J., (1984), *J. Dairy Sci.*, **67**, 919—929.
84. Reimerdes E.H., Roggenbuck G., (1980), *Milchwiss.*, **35**, 195—201.
85. Yun S.E., Ohmiya K., Shimizu S., (1982), *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **46**, 1505—1511.
86. Knoop A.M., Peters K.H., (1975), *Milchwiss.*, **30**, 674—680.
87. Yun S.E., Ohmiya K., Shimizu S., (1982), *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **46**, 443—449.
88. Ohmiya K., Yun S.E., Kobayashi T., Shimizu S., (1981), *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 318—322.
89. Hasegawa K., Okamoto N., Ozawa H., Kitajima S., Tokado Y., (1981), *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **45**, 1645—1651.
90. Ohmiya K., Sugano S., Yun S.E., Shimizu S., (1983), *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **47**, 535—542.
91. De Konning P.J., Van Rooijen P.J., (1982), *J. Dairy Res.*, **49**, 725—736.
92. Manson W., Carolan T., (1980), *J. Dairy Res.*, **47**, 193—198.
93. Meyer M., Klostermeyer H., Kleyn D.H., (1981), *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, **172**, 446—448.
94. Isohata T., Abe K., Homma S., Fujimaki M., Arai S., (1983), *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **47**, 2633—2635.
95. Payens T.A.J., (1977), *Biophys. Chem.*, **6**, 263—270.
96. Horne D.S., Parker T.G., (1981), *J. Dairy Res.*, **48**, 285—291.
97. Holt C., Hasmain S.S., Hukins D.W.L., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **719**, 299—303.
98. McGann T.C.A., Kearney R.D., Buchheim W., Posner A.S., Betts F., Blumenthal N.C., (1983), *Calcif. Tissue Int.*, **35**, 821—823.
99. Naito H., Suzuki H., (1974), *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **38**, 1543—1545.
100. Lee Y.S., Noguchi T., Naito H., (1983), *Br. J. Nutr.*, **49**, 67—76.
101. Sato R., Noguchi T., Naito H., (1983), *Agric. Biol. Chem., Jap.*, **47**, 2415—2417.
102. West D.W., Dalgleish D.G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **438**, 169—175.

- 101. ...
- 102. ...
- 103. ...
- 104. ...
- 105. ...
- 106. ...
- 107. ...
- 108. ...
- 109. ...
- 110. ...
- 111. ...
- 112. ...
- 113. ...
- 114. ...
- 115. ...
- 116. ...
- 117. ...
- 118. ...
- 119. ...
- 120. ...
- 121. ...
- 122. ...
- 123. ...
- 124. ...
- 125. ...
- 126. ...
- 127. ...
- 128. ...
- 129. ...
- 130. ...
- 131. ...
- 132. ...
- 133. ...
- 134. ...
- 135. ...
- 136. ...
- 137. ...
- 138. ...
- 139. ...
- 140. ...
- 141. ...
- 142. ...
- 143. ...
- 144. ...
- 145. ...
- 146. ...
- 147. ...
- 148. ...
- 149. ...
- 150. ...
- 151. ...
- 152. ...
- 153. ...
- 154. ...
- 155. ...
- 156. ...
- 157. ...
- 158. ...
- 159. ...
- 160. ...
- 161. ...
- 162. ...
- 163. ...
- 164. ...
- 165. ...
- 166. ...
- 167. ...
- 168. ...
- 169. ...
- 170. ...
- 171. ...
- 172. ...
- 173. ...
- 174. ...
- 175. ...
- 176. ...
- 177. ...
- 178. ...
- 179. ...
- 180. ...
- 181. ...
- 182. ...
- 183. ...
- 184. ...
- 185. ...
- 186. ...
- 187. ...
- 188. ...
- 189. ...
- 190. ...
- 191. ...
- 192. ...
- 193. ...
- 194. ...
- 195. ...
- 196. ...
- 197. ...
- 198. ...
- 199. ...
- 200. ...

SŁOWNICTWO

Słownictwo tokoferoli i związków pokrewnych

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji Nomenklatury Biochemicznej (JCBN) IUPAC-IUB: „Nomenclature of tocopherols and related compounds. Recommendation 1981”, ogłoszonego w Eur. J. Biochem. (1982), 123, 473—475 i innych czasopismach.

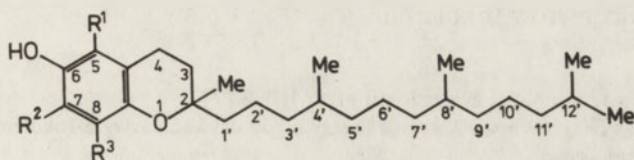
opracowała Janina Kwiatkowska

Komisja Słownictwa Biochemicznego uprzejmie dziękuje prof. dr Osmanowi Achmatowiczowi za konsultację przy opracowaniu dokumentu

W 1966 r. ogłoszono słownictwo witamin, z tokoferolem włącznie [1, 2]. Zalecenia określały konfigurację jedynie α -tokoferolu (jako 2*R*, 4'*R*, 8'*R*). Wprawdzie następnie opisano konfigurację wszystkich związków tej klasy, ale opracowanie systemu ich słownictwa nastęrczało trudności ze względu na występowanie niektórych ważnych tokoferoli w postaci mieszaniny diastereoizomerów. Tym niemniej, w 1974 r. ogłoszono zalecenia [3, 4], wprowadzające system *RS* dla opisu stereoizomerii [5, 6]. Obecne zalecenia uwzględniają zarzuty, wysuwane przeciw poprzednim dokumentom. Nie zawierając nowych reguł, zalecenia te w sposób bardziej pełny tłumaczą odniesienie obecnie zalecanych określeń (zwłaszcza dotyczących stereochemii, w punkcie 12) do dawniejszych. Obejmują też uzgodnienia osiągnięte w 1976 r. pomiędzy JCNB i Komisją 1/I Międzynarodowej Unii Nauk Żywności (IUNS) i są zgodne z zaleceniami IUNS z 1976 r. [7]

Zalecenia

1.1. Witamina E. Nazwę witamina E należy stosować jako określenie rodzajowe wszystkich pochodnych tokoli i tokotrienoli, wykazujących jakościo-wo aktywność biologiczną α -tokoferolu. Nazwę tę należy stosować także w określeniach pochodnych, takich jak niedobór witaminy E, aktywność witaminy E, antagoniści witaminy E.



(I)

1.2. Tokol. Nazwa tokol jest nazwą zwyczajową 2-metylo-2-(4, 8,12-trimetylotridecylo)chroman-6-olu (związek I, w którym $R^1 = R^2 = R^3 = H$).

1.3. Tokoferol(e). Nazwę tokoferol(e) należy stosować jako nazwę ogólną wszystkich mono-, di-, i trimetylotokoli. A zatem nazwa ta nie jest synonimem określenia: witamina E.

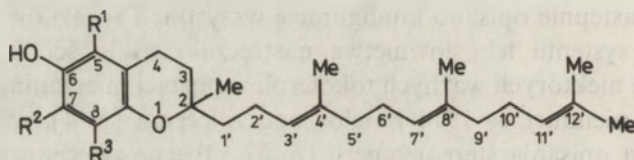
2. Związek I, w którym $R^1 = R^2 = R^3 = Me$, znany jako α -tokoferol, nosi nazwę α -tokoferol¹⁾ lub 5,7,8-trimetylotokol. Przy określaniu konfiguracji α -tokoferolu patrz Zalecenia 11 i 12²⁾.

3. Związek I, w którym $R^1 = R^3 = Me$; $R^2 = H$, znany jako β -tokoferol nosi nazwę β -tokoferol¹⁾ lub 5,8-dimetylotokol.

4. Związek I, w którym $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = Me$, znany jako γ -tokoferol nosi nazwę γ -tokoferol¹⁾ lub 7,8-dimetylotokol.

5. Związek I, w którym $R^1 = R^2 = H$; $R^3 = Me$, znany jako δ -tokoferol, nosi nazwę δ -tokoferol¹⁾ lub 8-metylotokol³⁾.

6. Związek II, w którym $R^1 = R^2 = R^3 = H$, czyli 2-metylo-2-(4,8,12-trimetylotrideka-3,7,11-trienilo)chroman-6-ol nosi nazwę tokotrienol (w naturze znaleziono tylko *all-trans* (*E*, *E*)-tokotrienole).



(II)

7. Związek II, w którym $R^1 = R^2 = R^3 = Me$, znany dawniej jako ζ_1 albo ζ_2 -tokoferol nosi nazwę 5,7,8-trimetylotokotrienol³⁾ lub α -tokotrienol¹⁾. Stosowano także nazwę plastochromanol-3 (porównaj pkt 3.2 w (8)).

8. Związek II, w którym $R^1 = R^3 = Me$; $R^2 = H$, znany dawniej jako ϵ -tokoferol, nosi nazwę 5,8-dimetylotokotrienol³⁾ lub β -tokotrienol¹⁾.

9. Związek II, w którym $R^1 = H$; $R^2 = R^3 = Me$, znany dawniej jako η -tokoferol nosi nazwę 7,8-dimetylotokotrienol³⁾ lub γ -tokotrienol¹⁾. Używano także określenia plastochromanol-3 (por. pkt 3.2 w (8) i 16.2.3.2 w (9)).

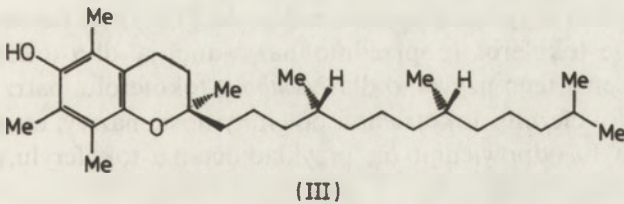
10. Związek II, w którym $R^1 = R^2 = H$; $R^3 = Me$, nosi nazwę 8-metylotokotrienol³⁾ lub δ -tokotrienol¹⁾.

11. Jedyny dotychczas wykryty, występujący naturalnie stereoizomer α -tokoferolu (III) ma konfigurację 2,*R* 4'*R*, 8'*R*, zgodnie z systemem reguły pierwszeństwa. Dlatego też jego semisystematyczna nazwa brzmi (2*R*, 4'*R*, 8'*R*)- α -tokoferol. Tę samą zasadę słownictwa można stosować do wszystkich innych stereoizomerów tokoferoli.

¹⁾ zalecana w terminologii żywieniowej przez IUNS [7]

²⁾ mówiąc o konkretnym związku nie należy nigdy używać nazwy α -tokoferol bez określenia stereochemicznego

³⁾ zalecana w terminologii chemicznej



12. Aby możliwie krótko określić konfigurację ważniejszych stereoisomerów α -tokoferolu, a zwłaszcza mieszanin tych stereoisomerów stosuje się nazwy zwyczajowe. Wiele z tych związków ma znaczenie handlowe i lecznicze. Zaleca się stosowanie następujących nazw zwyczajowych na określenie najważniejszych związków tej klasy:

a). Wyżej wzmiankowany α -tokoferol o konfiguracji $2R, 4'R, 8'R$, dawniej zwany d - α -tokoferolem powinien nosić nazwę RRR - α -tokoferol

b). Diastereoizomer RRR - α -tokoferolu, dawniej znany jako l - α -tokoferol, będący epimerem RRR - α -tokoferolu przy C-2, mający konfigurację $2S, 4'R, 8'R$, powinien nosić nazwę 2 - epi - α -tokoferol.

c). Mieszanina RRR - α -tokoferolu i 2 - epi - α -tokoferolu (otrzymywana drogą syntezy z użyciem fitolu⁴⁾ i odpowiedniej achiralnej pochodnej hydrochinonu) powinna nosić nazwę 2 - $ambo$ - α -tokoferol^{5,6)}. Do czasu poznania aktywności optycznej fitolu, kiedy to ograniczono użycie nazwy dl - α -tokoferol do all - rac - α -tokoferolu (patrz 12e), mieszaninę tę nazywano dl - α -tokoferol. Jest prawdopodobne, że asymetryczna reakcja zachodząca w częściowej syntezie może jedynie przypadkowo prowadzić do utworzenia równomolowych proporcji dwu możliwych epimerów [10]. Tym niemniej, 2 - $ambo$ - α -tokoferol, otrzymywany tą metodą występuje w proporcjach bliskich równomolowym [11—14]. Octan 2 - $ambo$ - α -tokoferolu był dawniej międzynarodowym standardem witaminy E [15].

d). Produkt redukcji naturalnego 5,7,8-tokotrienolu, w którym podwójne wiązania przy 3', 7' i 11' są uwodornione, a przy C-4 i C-8 powstają dwa nowe centra asymetrii, jest mieszaniną czterech diastereoizomerycznych α -tokoferoli, mających konfiguracje $2R, 4'R, 8'R$; $2R, 4'S, 8'R$, $2R, 4'S, 8'S$ i $2R, 4'R, 8'S$. Materiał ten powinien nosić nazwę $4'$ - $ambo, 8'$ - $ambo$ - α -tokoferol.

e). Całkowicie syntetyczna witamina E, otrzymana bez stereochemicznej kontroli, jest mieszaniną o nieokreślonych proporcjach (w badanych preparatach proporcje czterech recematów lub par enancjomerów (to jest ośmiu

⁴⁾ Nazwa „fitol” oznacza substancję o konfiguracji $7R, 11R$.

⁵⁾ od „ambo”, z języka łacińskiego „oba”.

⁶⁾ Pełniejsza nazwa powinna brzmieć: 2 - $ambo$ -($4'R, 8'R$)- α -tokoferol, ale w celu skrócenia nazw zwyczajowych przyjęto, że jeśli nie zaznaczono inaczej, każde centrum w tokoferolach ma konfigurację R . A więc nazwa α -tokoferol, będąca nazwą ogólną bez implikacji stereochemicznych, nabiera stereochemicznego znaczenia, jeśli poprzedza ją stereochemiczny przedrostek w rodzaju $ambo$ lub epi .

diastereoizomerów) były bliskie równomolowym [11—14]. Powinna ona nosić nazwę all-rac- α -tokoferol (poprzednio nazywano ją dl- α -tokoferol, chociaż dawniej określenia tego używano dla 2-*ambo*- α -tokoferolu, patrz 12c).

13. Estry tokoferoli i tokotrienoli powinny nosić nazwy: estry tokoferylu i estry tokotrienylu, odpowiednio (na przykład octan α -tokoferylu, octan α -tokotrienylu).

Zalecane nazwy zebrano w tabeli 1.

Tabela 1

Zwyczajowe nazwy niektórych α -tokoferoli

Lp.	Opis produktu	Konfiguracja	Zalecana nazwa zwyczajowa
1.	Związek o konfiguracji określonej w następnej kolumnie, jedyny izomer α -tokoferolu znaleziony jak dotąd w przyrodzie	2 <i>R</i> , 4' <i>R</i> , 8' <i>R</i>	<i>RRR</i> - α -tokoferol
2.	Izomer epimeryczny względem <i>RRR</i> - α -tokoferolu jedynie przy C-2	2 <i>S</i> , 4' <i>R</i> , 8' <i>R</i>	2- <i>epi</i> - α -tokoferol
3.	α -tokoferol o naturalnej konfiguracji przy C-4' i C-8', ale o obu konfiguracjach przy C-2; taki, który można otrzymać półsyntetycznie z fitolu	2 <i>R</i> , 4' <i>R</i> , 8' <i>R</i> i 2 <i>S</i> , 4' <i>R</i> , 8' <i>R</i> mieszanina niekoniecznie równomolowa	2- <i>ambo</i> - α -tokoferol
4.	Syntetyczny α -tokoferol, otrzymany bez kontrolowania konfiguracji przy C-2, C-4' i C-8'.	mieszanina, niekoniecznie równomolowa, wszystkich 4 możliwych racematów (to jest wszystkich 4 par enancjomerów)	<i>all-rac</i> - α -tokoferol
5.	Syntetyczny α -tokoferol, o naturalnej konfiguracji przy C-2, ale o obu konfiguracjach przy C-4' i C-8'	mieszanina, niekoniecznie równomolowa, czterech izomerów: 2 <i>R</i> , 4' <i>R</i> , 8' <i>R</i> ; 2 <i>R</i> , 4' <i>S</i> , 8' <i>R</i> ; 2 <i>R</i> , 4' <i>R</i> , 8' <i>S</i> ; 2 <i>R</i> , 4' <i>S</i> , 8' <i>S</i>	4'- <i>ambo</i> -8'- <i>ambo</i> - α -tokoferol

PIŚMIENICTWO

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Tentative rules, section on Trivial names of miscellaneous compounds of importance in Biochemistry, 1964. (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 1—2.
2. Potoczne nazwy witamin i koenzymów. w: Polskie słownictwo biochemiczne. Red. A. Morawiecki, PWN, Warszawa 1974, s. 169—172.
3. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of tocopherols and related compounds. Recommendations 1973. (1974), *Eur. J. Biochem.*, **46**, 217—219.
4. Słownictwo tokoferoli i związków pokrewnych. W: Nowe polskie słownictwo biochemiczne. Red. A. Morawiecki, PWN Warszawa, 1983, s. 249—253.

5. IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (1976). Rules for the nomenclature of organic chemistry, section E: Stereochemistry (Recommendations 1974). (1976), *Pure Appl. Chem.*, **45**, 11—30.
6. Nomenklatura Związków Organicznych. Część E. Stereochemia. PWN, Warszawa-Łódź, 1979.
7. International Union of Nutritional Sciences, Committee 1/I, Nomenclature (1978). *Nutr. Abstr. Rev.* **48A**, 831—835.
8. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of quinones with isoprenoid side-chains. Recommendations 1973. (1975), *Eur. J. Biochem.*, **53**, 15—18.
9. Słownictwo chinonów z izoprenoidowymi łańcuchami bocznymi. W: Nowe polskie słownictwo biochemiczne. Red. A. Morawiecki, PWN, Warszawa 1983, s. 231—238.
10. Morrison J. D., Mosher H. S., *Asymmetric organic reactions*. Prentice Hall, Englewood Cliffs N.J., 1971.
11. Ames S. R., (1979), *J. Nutr.*, **109**, 2198—2204.
12. Slover H. T., Thompson R. H. Jr., (1981), *Lipids*, **16**, 268—275.
13. Weiser H., Vecchi M., (1981), *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **51**, 100—113.
14. Cohen N., Scott C. G., Neukom C., Lopresti R. J., Weber G., Saucy G., (1981), *Helv. Chim. Acta*, **64**, 1158—1173.
15. Hume E. M., (1941), *Nature (Lond.)*, **148**, 472—473.

1. The Commission on the Status of Women, established in 1946, was the first of its kind. It was created by the Economic and Social Council of the United Nations to address the needs and interests of women in the post-war world. The Commission has since become a permanent body, and its work is carried out through various mechanisms, including the Commission's annual sessions, the Commission's Working Group on the Status of Women, and the Commission's Expert Group on the Status of Women.

2. The Commission's work is based on the principle of equality between men and women. It seeks to identify and address the various forms of discrimination against women, and to promote their full and equal participation in all spheres of life. The Commission's work is guided by the Declaration on the Elimination of Discrimination against Women, adopted by the General Assembly of the United Nations in 1965, and the Convention on the Elimination of All Forms of Discrimination against Women, adopted in 1979.

3. The Commission's work is also guided by the Beijing Declaration and Platform for Action, adopted by the World Conference on Women in 1995. This document sets out a comprehensive agenda for women's advancement in the twenty-first century, and provides a framework for the Commission's work.

4. The Commission's work is carried out through various mechanisms, including the Commission's annual sessions, the Commission's Working Group on the Status of Women, and the Commission's Expert Group on the Status of Women. The Commission also works closely with other United Nations bodies, such as the United Nations Development Programme (UNDP), the United Nations Children's Fund (UNICEF), and the United Nations Population Fund (UNFPA), to address the various challenges facing women.

5. The Commission's work is also supported by a network of national commissions on the status of women, which are established in many countries around the world. These commissions play a crucial role in promoting women's rights and advancing their status in their respective countries.

SPRAWOZDANIA ZE ZJAZDÓW I KONFERENCJI NAUKOWYCH

Konferencja dydaktyczna wykładowców biochemii akademii medycznych

Kolejna konferencja wykładowców biochemii akademii medycznych odbyła się w Szczecinie, dnia 14 maja 1988 roku w zabytkowym Klubie Pracowników Służby Zdrowia „Remedium”, usytuowanym w willowej dzielnicy — Pogodno. Po konferencjach w Gdańsku, Warszawie, Białymstoku i Wrocławiu, do Szczecina zjechali przedstawiciele wszystkich ośrodków akademickich (z wyjątkiem Łodzi), nauczających studentów medycyny, stomatologii i pielęgniarstwa. W spotkaniu szczecińskim przedstawiono dwa programy nauczania. Jeden realizowany w Pomorskiej Akademii Medycznej, drugi w Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Oba programy różnią się od siebie układem organizacyjnym. W Szczecinie realizuje się zaliczenia tygodniowe, w Katowicach obowiązuje program kolokwialny. W czasie konferencji poddano pod dyskusję wszystkie aspekty dotyczące nauczania biochemii przyszłych lekarzy, a więc: program wykładów, program ćwiczeń (seminariów i zajęć laboratoryjnych), regulaminy zakładowe, kontrole wyników nauczania, systemy egzaminacyjne, dostępność podręczników do nauki biochemii i wydawane skrypty przez poszczególne ośrodki.



Siedzą od lewej: prof. dr H. Karoń (Poznań), prof. dr Z. Zielińska (Warszawa), prof. dr M. Dróżdż (Katowice), doc. dr Z. Poremska (Warszawa), prof. dr T. Borkowski (Lublin), prof. dr E. Bańkowski (Białystok).

Dane te były zawarte w starannie wydanych materiałach przygotowanych przez oba ośrodki prowadzące konferencję. Materiały otrzymali wszyscy uczestnicy i stanowiły one podstawę do dyskusji. Dyskusja stanowiła najważniejszy punkt programu konferencji. W swobodnej i miłej atmosferze wszyscy uczestnicy mieli nieograniczony czas wypowiedzi swoich poglądów. Liczne pytania i sugestie, oceny wartości dydaktycznych prezentowanych programów, odslanianie słabych

ogni i braku spójności programów, własne dotychczasowe doświadczenia — to wszystko świadczyło o dużym zaangażowaniu uczestników i chęci jak najlepszego przekazywania wiedzy. Wzrasta ranga problemu praktycznego nauczania biochemii w akademiach medycznych. Większość dostępnych podręczników do ćwiczeń preferuje analityczny charakter ćwiczeń laboratoryjnych. Wyodrębnienie przed paru laty analityki z diagnostyką i biochemią kliniczną, jako osobnego przedmiotu o zwiększonej ilości godzin oraz brak w zakładach biochemii nowoczesnej aparatury do ćwiczeń, stwarza dysproporcję między możliwościami dydaktycznymi zakładów teoretycznych a szkoleniem klinicznym. Wprowadzenie nowocześniejszych ćwiczeń biochemicznych jest trudne z powodu ograniczonego zakupu odczynników zwłaszcza importowanych, braku odpowiedniego wyposażenia oraz dużej ilości studentów na II roku studiów w stosunku do posiadanej bazy lokalowej. W przedstawionych na konferencji w szczegółowych opracowaniach ze Szczecina i Katowic, organizatorzy proponują własne rozwiązania i postulują, aby programy ćwiczeń były stałym punktem wymiany poglądów pracowników dydaktycznych uczących biochemię w akademiach medycznych.

Na jednej z poprzednich konferencji przedyskutowano zakresy zajęć dydaktycznych dla zakładów chemii ogólnej i zakładów biochemii. Obecnie wyłania się taki sam problem między zakładami biochemii a zakładami biochemii klinicznej i diagnostyki laboratoryjnej. Zazwyczaj o wszystkim decydują warunki lokalne, ale ramowe programy biochemii i biochemii klinicznej z diagnostyką winne być wspólnie przedyskutowane. Dlatego zaproponowano, że na następną konferencję w roku 1989 zostaną zaproszeni niektórzy wykładowcy biochemii klinicznej.

Istotną rolę w nauczaniu biochemii odgrywają dostępne do nauki podręczniki. Podręczniki autorów polskich, jak i tłumaczenia podręczników zagranicznych, są z reguły opóźnione o szereg lat i dlatego nie zaspakajają potrzeb. Dlatego niektóre zakłady biochemii w Polsce wydają własne skrypty, monografie, wypisy i inne pomoce — w ramach własnej bazy poligraficznej. Podkreślono celowość i korzyści płynące z wymiany tych materiałów między poszczególnymi zakładami biochemii, co jednak nie rozwiązuje istoty problemu. Przy dyskusowaniu wyników nauczania w poszczególnych akademiach mówiono o złym przygotowaniu teoretycznym i językowym studentów zagranicznych. W większości przypadków powtarzają oni dwu lub trzykrotnie poszczególne lata studiów.

Wiele miejsca poświęcono kadrcze nauczającej. Przygotowanie asystenta, ze względu na stopień trudności przedmiotu, trwa parę lat. Zespół nauczający w zakładach biochemii winien reprezentować różne specjalności. Zgodzono się, że w szkoleniu przyszłych lekarzy winni uczestniczyć w dużej mierze asystenci — absolwenci akademii medycznych. W Katowicach i Szczecinie stanowią oni połowę kadry nauczającej. Organizatorzy przekazali także swoje doświadczenia przy naborze asystentów z własnych kół naukowych. Członkowie kół naukowych, zwłaszcza ci, których prace były nagradzane na sesjach uczelnianych, środowiskowych lub krajowych, decydują się zazwyczaj, po ukończeniu studiów, na podjęcie pracy w tym zakładzie. Wymaga to przychylności Władz Uczelni w przydzielaniu etatów absolwentom. Tym młodym ludziom, aby chcieli pracować w zakładzie teoretycznym, trzeba było zapewnić start naukowy w roku stażowym, a lekarzom start zawodowy w formie zgody na specjalizację. Duży udział w adaptacji młodych ludzi mają starsi koledzy, zwłaszcza adiunkci, którzy opiekując się nimi wprowadzają ich stopniowo w zagadnienia i problemy dydaktyki. Narastającym problemem ograniczającym dopływ chętnych do pracy w zakładach teoretycznych są niskie płace. W dyskusji wskazano na niezrozumiałe różnice interpretacji możliwości finansowych uczelni lub na opieszale wprowadzanie w życie tych samych zasad w różnych uczelniach. Różnice za stawki godzin naukowych i dydaktycznych wynosiły w poszczególnych uczelniach blisko 100%. Ma to znaczenie szczególnie w zakładach teoretycznych akademii medycznych, w których nie ma dodatków usługowych.

W końcowej fazie dyskusji powrócono do postulatów wcześniej sformułowanych na poprzednich konferencjach i przesłanych do Władz. Na pierwszej konferencji w Gdańsku zajęto stanowisko w sprawie zmniejszenia ilości godzin przeznaczonych na nauczanie biochemii. Niektóre Rady Wydziałowe, w ramach swoich uprawnień, zwiększyły limity określone przez MZiOS. Ministerstwo ustosunkowało się negatywnie do propozycji sformułowanych we Wrocławiu dotyczących jednolitego planu studiów dla pierwszych dwóch lat. Ministerstwo uważa, że układ i rozłożenie przedmiotów



W pierwszym rzędzie od lewej: doc. dr R. Tarnawski (Zabrze), prof. dr Z. Zielińska (Warszawa), doc. dr Z. Porembka (Warszawa), dr A. Mandat (Szczecin), prof. dr H. Karoń (Poznań), prof. dr J. Kwiatkowska (Wrocław), dr T. Stelmaszyńska-Gliczyńska (Kraków), prof. dr T. Borkowski (Lublin), prof. dr E. Bańkowski (Białystok).

W drugim rzędzie od lewej: prof. dr Z. Machoy (Szczecin), dr K. Ciechanowski (Szczecin), doc. dr Z. Aleksandrowicz (Gdańsk), doc. dr T. Gałamar (Szczecin), prof. dr B. Zachara (Bydgoszcz), prof. dr M. Dróżdź (Katowice).

na Wydziałach Lekarskich może być różnorodne, dostosowane do możliwości danej akademii, natomiast treści zawarte w programie muszą się mieścić w ramowych programach nauczania. Na zakończenie konferencji w Szczecinie także sformułowano postulaty przesłane do MZiOS. Dotyczyły one: zwiększenia wynagrodzeń dla pracowników teoretycznych nauk medycznych, wliczenia czasu przeznaczonego na egzaminy do pensum dydaktycznego oraz wprowadzenia kursu chemii ogólnej na Wydziałach Pielęgniarskich przed nauczaniem biochemii.

Podczas konferencji, która trwała w sumie około 5 godzin, były przerwy na relaks, rozmowy w kularach i swobodną wymianę poglądów, także towarzyskich. W czasie jednej z przerw prof. Z. Zielińska, redaktor naczelny *Postępów Biochemii*, mówiła o pracach nadsyłanych do Redakcji, o najczęściej spotykanych brakach, błędach i niedociągnięciach oraz o tematyce prac, które ukażą się w najbliższych numerach czasopisma. Jeszcze przed rozpoczęciem konferencji uczestnicy, w drodze z hotelu do miejsca obrad, odbyli półgodzinną wycieczkę mikrobusem po mieście Szczecinie (z przewodnikiem), a między prezentacją szczecińskiego i katowickiego programu dydaktycznego obejrzeli udźwiękowaną diaporamę Szczecina, przygotowaną przez dr Surówkę (30 min.). W czasie krótkich spacerów wśród majowej zieleni i kwitnących drzew uczestnicy brali udział we wspólnych zdjęciach. Zorganizowanie następnej konferencji zaproponowano Instytutowi prof. W. Ostrowskiego w Krakowie, a współorganizatorem ma być Zakład Biochemii z Zabrza prowadzony przez doc. dr R. Tarnawskiego. Przewidywany termin spotkania — 13 maja 1989 r. Konferencja nauczających biochemii w akademiach medycznych stanowi dobrą formę wymiany doświadczeń dydaktycznych, pozwala nawiązać bezpośrednio kontakty oraz posłuchać jak inni radzą sobie z realizacją programów i z trudnościami, od których trudno się dzisiaj uwolnić.

*Zygmunt Machoy
Kazimierz Ciechanowski*



1. *Introduction*
2. *Methodology*
3. *Results*
4. *Discussion*
5. *Conclusion*

The first part of the paper discusses the background of the study and the objectives of the research. It also outlines the methodology used in the study, including the data collection and analysis methods. The results of the study are presented in the third part, followed by a discussion of the findings and their implications. The paper concludes with a summary of the main points and a final conclusion.

The study was supported by the National Science Foundation (NSF) Grant #1234567. The authors would like to thank the anonymous reviewers for their helpful comments and suggestions.

CONTENTS

An editorial note	259
ARTICLES	
R. Farbiszewski—Brain-derived growth factors (Dept. of Inorganic and Analytical Chemistry, Medical Academy, Białystok)	261
W. Korohoda—Studies on growth, differentiation and neoplastic transformation of animal and human cells — views and trends: Kraków 1985—1988 (Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University)	262
A. E. Liczmański—Oxygen toxicity. I. Damage of living cells (Zamość College of Agriculture, Agricultural Academy of Lublin, Zamość)	273
A. E. Liczmański—Oxygen toxicity. II. Defence mechanisms (Zamość College of Agriculture, Agricultural Academy of Lublin, Zamość)	293
J. M. Kwiatowski—Superoxide dismutase — structure, function phylogenesis (Dept. of Plant Systematics and Geopraphy, University of Warsaw, Warszawa)	311
P. Lipiński, T. Zagulski—Ferritin in iron ions metabolism (Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec)	335
B. Sieliwanowicz—Splicing of nuclear mRNA precursors (Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa)	351
E. Wiland—Characteristic of ubiquitin (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Science, Poznań)	361
M. Porębska-Budny, J. P. Dworzański—Tyrosinase-oxidoreductase; monophenol, o-diphenol: O ₂ (Dept. of Biochemistry and Biophysics, Silesian Medical Academy, Sosnowiec)	375
T. Pacuszka—Gangliosides — structure and some properties (Dept. of Biochemistry, Institute of Hematology, Warszawa)	395
M. Balińska—Amethopterin metabolism in the mammalian cells (Dept. of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa)	417
J. Dziuba, A. Żbikowska—Enzymic coagulation of casein micelles (Dept. of Food Biochemistry, Institute of Physics and Food Chemistry, Academy of Agriculture and Technology, Olsztyn)	429
A. Żbikowska, J. Dziuba—Phosphorylation of casein and its properties (Dept. of Food Biochemistry, Institute of Physics and Food Chemistry, Academy of Agriculture and Technology, Olsztyn)	445
NOMENCLATURE	
Nomenclature of tocopherols and related compounds (J. Kwiatkowska)	461
SCIENTIFIC MEETING AND CONFERENCES	
A report of a local Meeting	467

SPIS TREŚCI

Od redakcji	259
ARTYKUŁY	
R. Farbiszewski — Czynniki wzrostowe pochodzenia mózgowego	261
W. Korohada — Badania wzrostu, różnicowania i transformacji nowotworowej komórek zwierzęcych i ludzkich — poglądy i tendencje: 1986—1988	269
A. E. Liczmański — Toksyczność tlenu. I. Uszkodzenia żywych komórek	273
A. E. Liczmański — Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne	293
J. M. Kwiatowski — Dysmutaza ponadtlenkowa — struktura, funkcja i lilogeneza	311
P. Lipiński, T. Zagulski — Ferytyna w metabolizmie jonów żelaza	335
B. Sieliwanowicz — Składanie jądrowych prekursorów mRNA	351
E. Wiland — Charakterystyka ubikwityny	361
M. Porębska-Budny, J. P. Dworzanski — Tyrozynaza-oksydoreduktaza; monfenol, o-difenol: O ₂	375
T. Pacuszka — Gangliozydy — budowa i niektóre właściwości	395
M. Balińska — Metabolizm amepteryny w komórkach ssaków	417
J. Dziuba, A. Żbikowska — Enzymatyczna koagulacja miceli kazeiny	429
A. Żbikowska, J. Dziuba — Fosforylacja kazeiny a jej właściwości	445
SŁOWNICTWO	
Słownictwo tokoferoli i związków pokrewnych (oprac. J. Kwiatkowska)	461
SPRAWOZDANIA ZE ZJAZDÓW I KONFERENCJI NAUKOWYCH	
Konferencja dydaktyczna wykładowców biochemii Akademii Medycznych, Szczecin, 1988	467

WARUNKI PRENUMERATY

Prenumeratę **na kraj** przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki **za granicę** przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, OO-958 Warszawa, konto PBK XII Oddział w Warszawie Nr 370044-1195-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do dnia 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 1 czerwca na II półrocze 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.